

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

00581
1
29.

FACULTAD DE QUIMICA

" CARACTERIZACION BIOQUIMICA E INMUNOCITOQUIMICA DEL ACIDO
GAMMA AMINO BUTIRICO Y LA ACETILCOLINA COMO NEUROTRANSMISORES
VESTIBULARES EN EL CUY "

TESIS QUE PRESENTA

EL M. EN C. IVAN AXEL LOPEZ BAJONERO

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCION	3
III	MODELO Y ENFOQUE EXPERIMENTAL	27
IV	BREVE DESCRIPCION DEL OIDO INTERNO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION	36
V	PARAMETROS ESTUDIADOS	39
VI	MATERIALES Y METODOS	44
VII	RESULTADOS Y DISCUSION	61
VIII	CONCLUSIONES	78
IX	REFERENCIAS	81
X	APENDICE. TRABAJOS PRESENTADOS BASE DE ESTA TESIS	107

I RESUMEN

Las células receptoras (pilosas) del epitelio sensorial vestibular se comunican con el sistema nervioso central (SNC) a través de conexiones aferentes y reciben información central por medio de sinapsis eferentes.

Existen amplias evidencias de que la comunicación tanto aferente como eferente es de naturaleza química y se ha postulado al ácido gammaaminobutírico (GABA) como el transmisor aferente (el que la célula pilosa libera y con el que se comunica con la fibra aferente) y la acetilcolina (ACh), como uno de los eferentes (el que se liberaría de la terminal eferente para comunicarse con la célula pilosa).

Con el propósito de aportar evidencias en favor del GABA y la ACh como neurotransmisores en el vestibulo se investigaron algunos parámetros relativos a ellos utilizando dos tipos de enfoques: el enfoque bioquímico-enzimático y el enfoque inmunocitoquímico.

Con el primer enfoque se analizó con algunos parámetros bioquímicos la evolución de la neurotransmisión de la periferia sensorial vestibular en animales representativos de tres grupos de vertebrados: anfibios, aves y mamíferos (rana, pollo, rata y cuy) con el fin de encontrar una correlación entre la constancia de las células pilosas tipo I en todos los vertebrados y la aparición de las células pilosas tipo I en animales terrestres con la presencia y magnitud de las actividades enzimáticas de las enzimas de síntesis del GABA y la ACh (la glutamato descarboxilasa, GAD y la colina acetiltransferasa, ChAT). Por lo que se midieron las actividades específicas de estas dos enzimas utilizando este parámetro como el criterio bioquímico más importante para postular a una célula como GABAérgica o colinérgica) y se investigó además si sus características eran semejantes a las encontradas en tejido nervioso donde el GABA y la ACh están comprobados como neurotransmisores.

Se encontró actividad de la GAD y la ChAT en el vestibulo de las cuatro especies estudiadas. La actividad más baja tanto de la GAD como de la ChAT se encontró en el vestibulo de la rana mientras que las más altas fueron las del pollo, el cuy y la rata mostraron valores intermedios. Estos datos se encuentran en el mismo intervalo que la GAD y la ChAT reportada en el sistema nervioso central y la retina de estos cuatro vertebrados. Sin embargo a diferencia de la GAD cuyos valores están en el mismo orden de magnitud (en el intervalo nanomolar) la actividad de la ChAT en el vestibulo, la retina y el sistema nervioso de la rana es considerablemente menor con respecto a las otras tres especies estudiadas.

El incremento de la GAD de las especies terrestres se puede atribuir a la aparición de las células pilosas tipo I, mientras que el incremento de la actividad de la ChAT en las mismas especies pudiera adscribirse a un incremento en el número de terminales eferentes que contiene acetilcolina. Estos resultados apoyan fuertemente al GABA y a la ACh como neurotransmisores vestibulares.

Con el segundo enfoque se investigó la localización celular tanto del sistema del GABA, como el sistema de la ACh, con la técnica inmunocitoquímica indirecta, utilizando como modelo el vestibulo del cuy (mamífero).

Para el sistema del GABA se utilizaron anticuerpos anti-GABA,

anticuerpos anti-GAD y anticuerpos anti-GABA-T (GABA-transaminasa, GABA-T) la enzima que degrada al GABA. Para el sistema de la Ach, se utilizaron anticuerpos anti-CAT y con técnicas citoquímicas, se investigó la presencia de la enzima de inactivación (degradación) de la Ach, la acetilcolinesterasa (AChE).

Con este tipo de enfoque pudo demostrarse, que existe inmunoreactividad positiva al GABA en el citoplasma de las células pilosas I y II en algunas fibras nerviosas que llegan al epitelio, incluyendo al caliz nervioso aferente que envuelve a las células pilosas tipo I, se demostró también que existe inmunoreactividad positiva a la GAD exclusivamente localizada en el citoplasma de las células pilosas mientras que la de la GABA-T se encontraba en el caliz nervioso aferente, las fibras nerviosas provenientes de las células bipolares del ganglio vestibular y en el citoplasma de estas.

Para el sistema de la acetilcolina se demostró que la CAT se encontraba en los botones eferentes que contactan a las células pilosas tipo II y a las fibras aferentes (calices nerviosos aferentes) que envuelven a las células pilosas tipo I. Adicionalmente se demostró la presencia de la AChE en la base de las células pilosas.

Con base a estos resultados se puede postular la existencia de un sistema GABAérgico y un sistema colinérgico en el vestibulo de los vertebrados, en el cual el GABA estaría funcionando como el neurotransmisor aferente y la acetilcolina como el neurotransmisor eferente.

ABSTRACT

The receptor cells (hair cells) of the vestibular sensory epithelium send information to central nervous system(CNS) through afferent connections and receive central information via efferent synapses .

Numerous evidences suggest that afferent and efferent communication is chemical in nature and it has been postulated that γ -aminobutyric acid (GABA) is the afferent mediator (with which the vestibular hair cell communicates with the contact of the afferent fiber) and acetylcholine (ACh) as the efferent one(which is released from this terminal to communicate with the hair cell). With the aim to contribute with some evidences in favor of GABA and ACh as the vestibular neurotransmitters, some parameters related to them were investigated using two kinds of strategies: the evolutionary-biochemical one and the immunocytochemical one. With the first, analyzes of some biochemical parameters were made relative to the evolution of the neurotransmission of the vestibular sensory periphery in representative animals of three vertebrate groups: amphibians, birds and mammals (frog, chick, rat and guinea pig) in the hope to find a correlation between the constancy of the type II hair cells in all vertebrates and the appearance of the type I hair cell in terrestrial animals, with the presence and magnitude of the enzymes of synthesis of GABA and ACh (glutamic acid decarboxylase GAD and choline acetyltransferase ChAT, respectively). Activities were measured in homogenates of the complete labyrinth of these vertebrates (using GAD and ChAT activities as the more important biochemical criteria to postulate a cell as GABAergic or cholinergic) and it was investigated whether their characteristics were similar to those found in nervous tissue in which GABA and ACh has been probe has neurotransmitters.

GAD and ChAT activities were found in the vestibule of the four species studied with approximately the same order of magnitude. The lower activities for GAD and ChAT were found in the frog vestibule, and the higher in the chick. Intermediate values were found in guinea pigs and rats. These data were in the same range for GAD and ChAT activities reported in CNS and retina of this species. In regard to GAD values they were of the same order of magnitude (in the nanomolar range). ChAT activity in the vestibule, retina and nervous system of the frog was considerably low in regard to the other species. The increase observed from the frog to terrestrial animals might be attributed to the acquisition of a new type of receptor cell which also used GABA to communicate with its afferent synapse (hair cell type I) and the increment of ChAT activity in the terrestrial species could be ascribed to a notable increase of efferent synaptic contacts which contain ACh. These results strongly support the role of GABA and ACh as vestibular neurotransmitters.

With the second strategy the cellular localization of the GABA and ACh system by immunocytochemical techniques was investigated using the guinea pig vestibular system as a model for a mammal. For the GABA system, anti-GABA, anti-GAD and anti-GABA-T (GABA-transaminase, the GABA degradation enzyme GABA-T) antibodies were used. For the ACh system anti-ChAT antibodies were used to localize ChAT and the inactivation (degradation) enzyme of ACh, acetylcholinesterase (AChE), was localized by cytochemical

techniques.

GABA-like immunoreactivity was found in the hair cell cytoplasm, in some nerve fibers running through the stroma including the afferent nerve calyx which surrounds hair cell type I; GAD-like immunoreactivity was found exclusively in the hair cell cytoplasm and GABA-1-like immunoreactivity was found in the afferent nerve calyx, some nerve fibers coming from the bipolar cells of vestibular ganglia and in the ganglion cell cytoplasm.

For the ACh system, positive immunoreactivity for ChA1 was found in the efferent bouton contacting the hair cell type II and in punctae which contact the afferent calyx. AChE was present at the base of the hair cells.

With these results the existence of a GABAergic and a Cholinergic system could be postulated in the vestibule of vertebrates in which GABA could be the afferent neurotransmitter and ACh the efferent one.

II INTRODUCCION

Todos los organismos multicelulares mantienen una orientacion particular en el espacio causada por la fuerza de gravedad que les permite orientarse apropiadamente y poder llevar a cabo sus funciones .

La mayoría de los organismos posee un gran número de sistemas receptores complejos que llevan a cabo estas funciones, por lo que se dice que este sistema de mantenimiento del equilibrio y orientacion es multimodal, ya que además recibe informacion del sentido de la vista y de los receptores somaticos. Sin embargo, esta informacion no es suficiente , y la mayoría de los organismos han desarrollado organos sensoriales que están especialmente adaptados para esta función . Estos organos forman parte del oido interno, el cual ha sufrido pocos cambios durante el curso de la evolucion (15) .

El estudio filogenetico del organo del equilibrio puede seguirse hasta las plantas, en las cuales si bien no encontramos un organo del equilibrio como tal, si encontramos un fenomeno de geotropismo. Esto es las diferentes formas de vida desde sus origenes han utilizado a la atraccion gravitatoria como un indicador preciso de su posicion en el espacio (37) .

Previamente al desarrollo del oido, se le pierde la pista que indique inequivocamente su origen filogenetico . En algunos invertebrados como en los bivalvos, gasteropodos o en los crustaceos encontramos un organo especializado en la deteccion de la posicion, como el estatocisto (16) .

Es dificil rastrear con precision la evolucion ulterior

de este órgano: sin embargo, parece razonable considerar al estatocisto como el ancestro filogenético del oído interno. En los primeros vertebrados (ostracodermos), se encuentra ya un órgano del equilibrio desarrollado y localizado en el oído. En estos animales el oído interno tiene ya como elemento sensorial las células pilosas sensitivas localizadas tanto en los órganos vestibulares como en el auditivo indicando con ello cierta similitud y continuidad (161) .

Las evidencias proporcionadas por el estudio en estos animales y la estrecha relación entre los órganos del equilibrio y la audición hacen pensar que éste último se originó por evolución del órgano primitivo del equilibrio (157) .

Quando los animales empezaron a vivir en medio terrestre, en el cual se transmite el sonido a menor velocidad que en el agua, el oído primitivo sufrió una evolución adaptativa a su nuevo medio. Se formó una prominencia en el saco del equilibrio que en el curso de la evolución dio lugar a un apéndice que posteriormente se convirtió en el órgano de la audición. Juntos forman un órgano de complicada geometría, denominado laberinto membranoso (oído interno) (fig 1 y 2), el cual se encuentra protegido por un análogo óseo (laberinto óseo) lleno de un líquido de composición semejante al líquido cefalorraquídeo llamado perilinfa y el laberinto membranoso a su vez está lleno de otro líquido rico en potasio llamado endolinfa . Algunas etapas en la evolución del laberinto se pueden ver en la figura 3 .

Las porciones sensitivas del aparato vestibular están

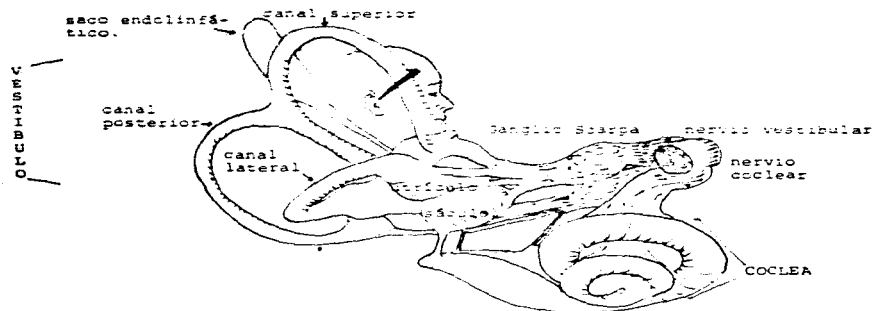


Figura 1. Partes que constituyen al oído interno mostrando la relación del órgano del equilibrio (vestíbulo) con el órgano auditivo (cóclea).

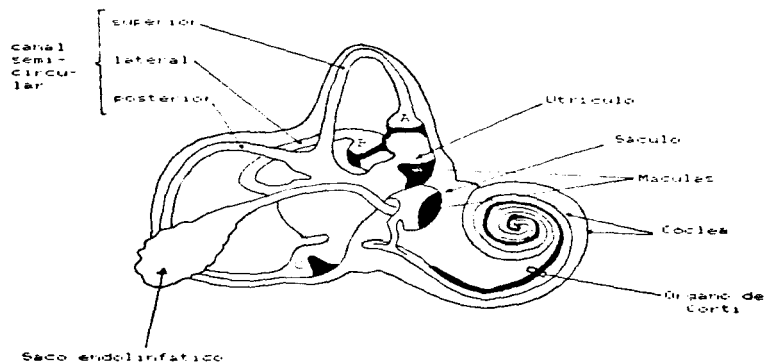


Figura 2. Esquema que representa al oído interno y sus porciones sensitivas (en negro): A, B y C son las crestas vestibulares (Modificado de Tissues and Organs de Kessel y Kardon (1979) W.H. Freeman and Company, San Fco USA .

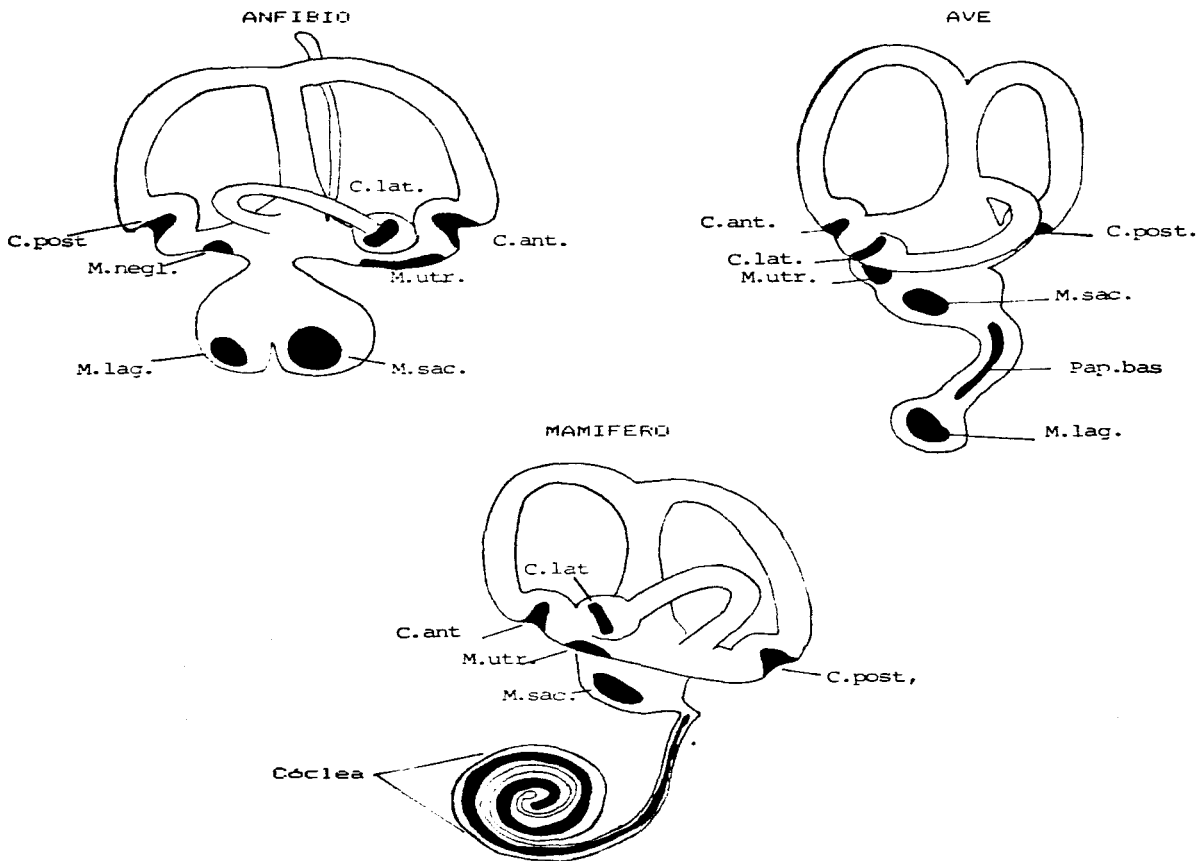


FIGURA 3. Esquema que representa el laberinto de tres grupos de vertebrados. C. ant., cresta anterior; C. lat., cresta lateral; C. post., cresta posterior; M. lag., macula de la lagena; M. negl., macula neglecta; M. sac., macula del saculo; M. utr., macula del utrículo; Pap. Bas., papila basilar (Modificado de Wersall y Bepper-Sjotack, 1974). Las porciones sensitivas se representan en negro.

organizadas de la siguiente manera: en el utrículo y el sáculo formando manchas de células especializadas que forman las maculas (estos órganos responden a movimientos lineales de la cabeza y a la fuerza de gravedad); en los canales semicirculares, la cresta ampular (en ellas, las células responden a aceleraciones angulares de la cabeza), y en la cóclea, el órgano de Corti (el cual responde a ondas sonoras) (fig 4).

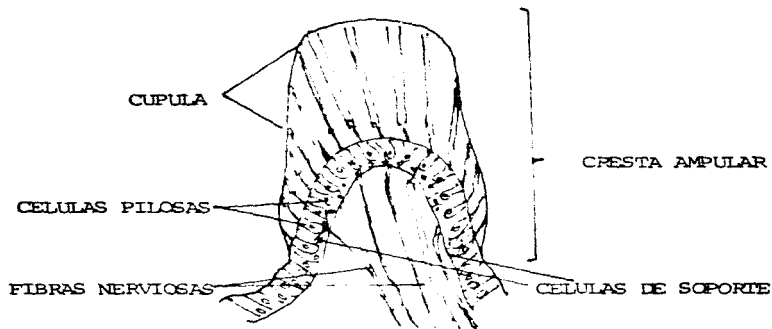
ESTRUCTURA DEL EPITELIO SENSORIAL

La estructura básica de este epitelio ha sido la misma a través del desarrollo filogenético desde el laberinto de los peces hasta el de los mamíferos (Fig. 5). En el vestibulo se encuentran las células pilosas sensitivas de la cresta de los canales semicirculares, las del utrículo y el sáculo, ubicadas en las maculas y en el órgano auditivo se encuentran las células pilosas externas e internas del órgano de Corti todas son semejantes. Además, el epitelio sensorial posee células de soporte que se extienden por toda la superficie endolinfática hasta la porción basal excepto durante el desarrollo y en las fibras nerviosas (aférentes y eférentes) que inervan a las células pilosas. Por encima del epitelio sensorial se encuentra un sistema de acoplamiento mecánico que casi siempre es una masa inerte (la cúpula y la membrana otolítica en el caso de los órganos vestibulares y la membrana tectoria en el caso del órgano de Corti) (Fig 4).

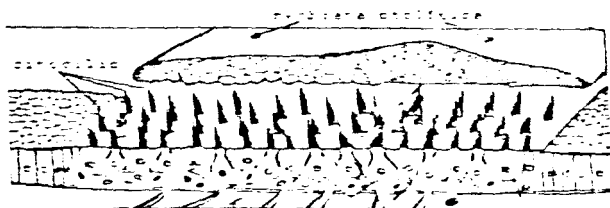
Tipos de células pilosas

En la porción vestibular, la célula pilosa tipo I, presente sólo en los vertebrados superiores, esta inervada por

(A)

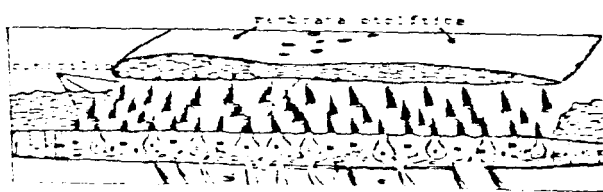


SACULO



(B)

UTRICULO



(C) ORGANO DE CORTI

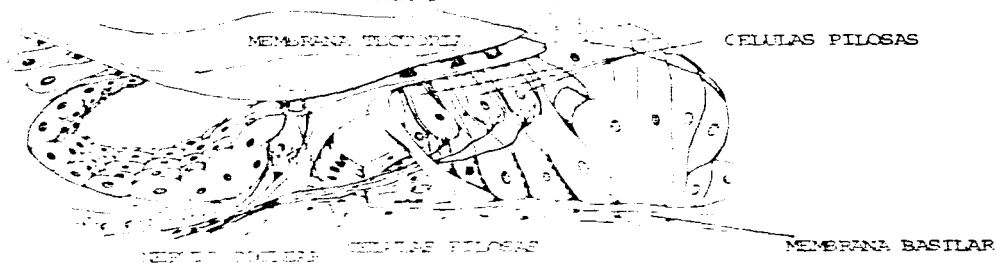


Figura 4. Esquema representativo de las áreas sensibles ubicadas en: (A) Las áreas ampulares de los canales semicirculares. (B) Las maculas de los órganos otoliticos del vestibulo. (C) En el organo de Corti coclear. En todos los casos se muestran los elementos fundamentales y los sistemas de acoplamiento mecanico y celular. membrana otolitica y membrana tectoria.

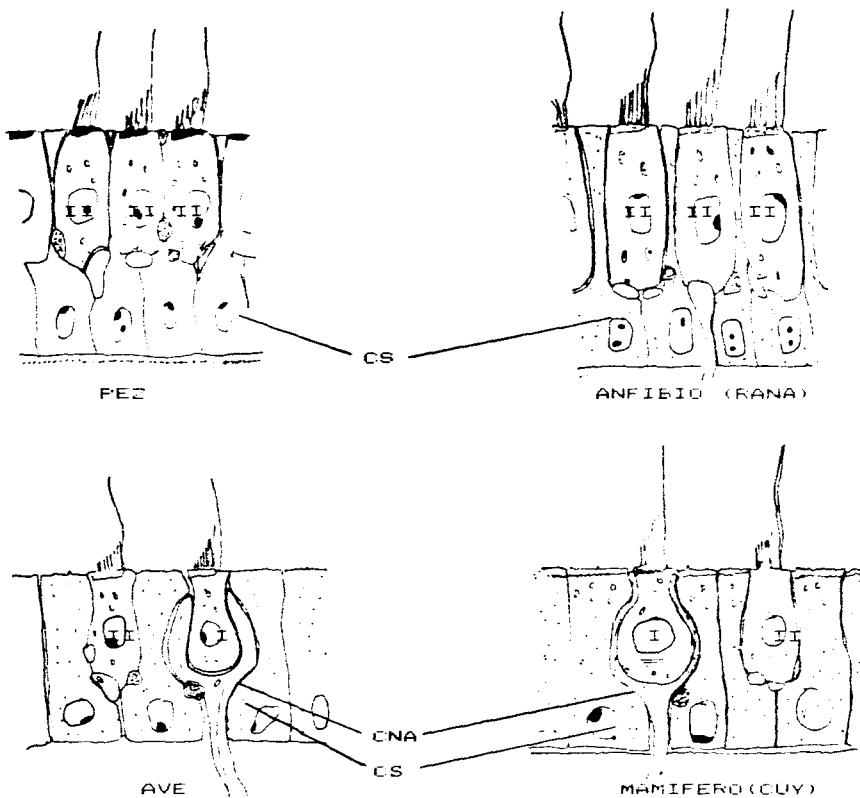


Figura 5. Esquema que ilustra a los diferentes tipos de epitelios sensoriales en los vertebrados: los peces y los anfibios tiene un solo tipo de célula pilosa, la tipo II, mientras que las aves y los mamíferos tiene los dos tipos (I y II) (tomado de Wersell y Berger-Sjoberg, 1974, pp. 144). C = células de soporte, CN = caliz nervioso aferente.

una terminal en la que en forma de cáliz, termina la fibra aferente. Este recibe información central por medio de botones sinápticos eferentes que lo contactan. La célula pilosa tipo II, común a todos los vertebrados, es contactada en su parte basal directamente por terminales nerviosas tanto de fibras aferentes como de las eferentes (Fig 6).

En la porción auditiva, las células pilosas son de dos tipos : las internas y las externas, y se clasifican por su colocación con respecto a un eje óseo llamado modiolos. En su parte basal se encuentran contactadas por sinapsis aferentes (centrípetas) y sinapsis eferentes (centríugas) (Fig 6).

Embriológicamente, las células pilosas se originan en la superficie del ectodermo y mantienen su carácter de epitelio en los órganos maduros del oído interno. Un rasgo estructural de estas células es el haz de prolongaciones citoplasmáticas en su porción apical denominados pelos sensorios o estereocilios y poseen además un cilio verdadero o cinocilio(fig 6), excepto en las células del órgano de Corti que lo pierden al madurar.

No obstante la variedad de estímulos a los cuales las células pilosas responden en los diferentes órganos, como son el sonido en la cóclea, la aceleración lineal y las vibraciones en el utrículo y el sáculo y la aceleración angular en los canales semicirculares, cada célula pilosa es esencialmente un mecanorreceptor.

El cilio de los receptores vestibulares tiene la misma orientación con respecto a algún punto de referencia por

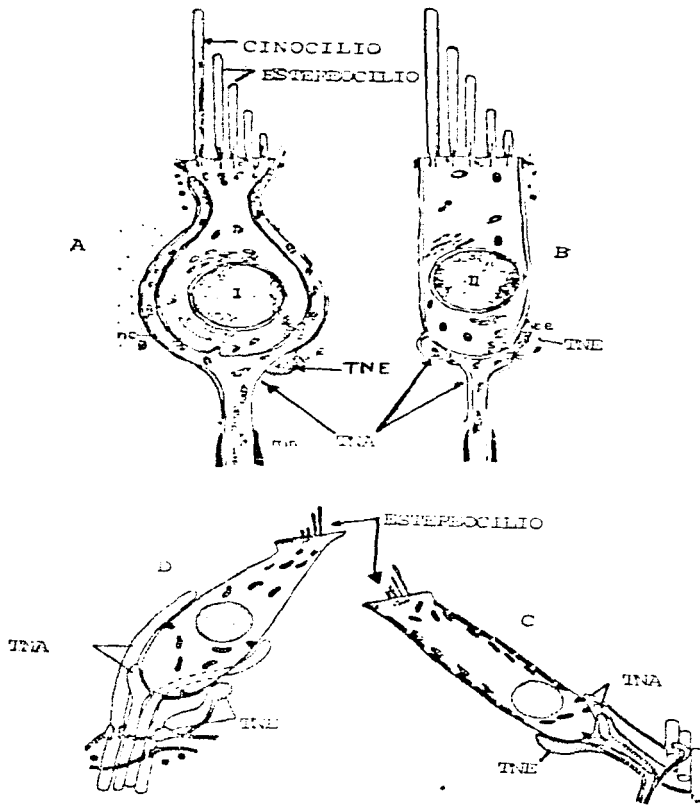


Figura 6. Esquema de los diferentes tipos de células pilosas que se encuentran en el epitelio sensorial vestibular y coclear.

A y B : células pilosas Tipo I y II (vestibulario).
 C y D : células pilosas externa e interna (coclear).
 TNA = terminal nerviosa aferente.
 TNE = terminal nerviosa eferente.

lo que la polarización morfológica es paralela a la polarización funcional i.e. todas las células pilosas muestran la misma polarización morfológica y reaccionan a un estímulo de la misma manera. Los principios de la polarización funcional (respuesta eléctrica) se resumen de la siguiente forma : cuando el haz de pelos sensorios se dobla hacia el extremo en donde se encuentra el cinocilio se produce una depolarización, mientras que la deflexión en dirección opuesta ocasiona una hiperpolarización. Los estímulos aplicados en dirección ortogonal (es decir un desplazamiento perpendicular a su eje) no producen respuesta (61) (Fig 7) .

MECANISMO DE TRANSDUCCION

Las células pilosas de los órganos vestibulares son excitadas por la deflexión de los pelos sensorios o estereocilios en la dirección del incremento de su longitud hacia el cinocilio y es inhibida por el movimiento en la dirección opuesta. El sitio en donde el estímulo mecánico de la deflexión de los pelos sensorios es transducido a un cambio eléctrico en el potencial de membrana ha estado sujeto a mucha especulación. Se ha descartado al cinocilio, ya que está presente solo durante las etapas tempranas en la cóclea en desarrollo de los mamíferos, y puede ser removido por microdissección en los anfibios sin ningún efecto sobre el potencial receptor, por lo que se ha puesto mayor atención sobre los estereocilios(36-38, 116, 117).

A.J. Hudspeth, David Corey y colaboradores han propuesto varios mecanismos posibles en relación a

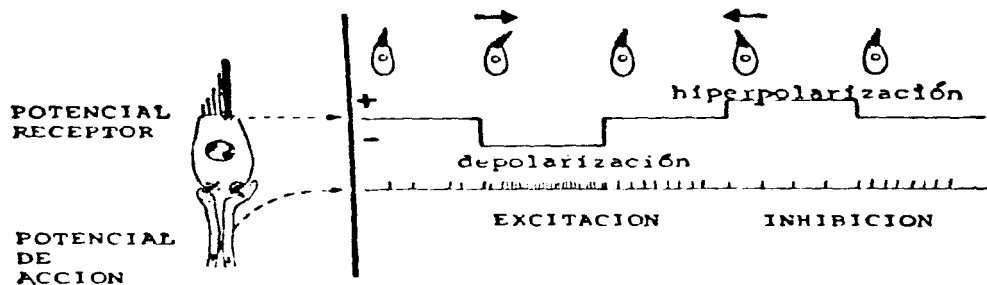


Figura 7.- Ilustración diagramática de la función de la célula pilosa.

Tomado de : Flock, A. (1965) Transducing mechanisms in lateral line canal organ receptor. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 30, 133-146.

los estereocilios (38,81,84,129).

1.- Cada estereocilio está formado en su interior por un bastón rígido de filamentos de actina fasciculados y rodeados por la prolongación de la membrana(139) . Los estereocilios se encuentran en una disposición hexagonal y su tamaño se va incrementando de una orilla del haz hacia el lado opuesto en donde se encuentra el cinocilio. Una posibilidad es que la disposición del citoesqueleto en el interior de los estereocilios libere un segundo mensajero cuando hay una deflexión . dicho mensajero actuaría sobre un canal en la membrana de los cilios para generar una respuesta sensorial similar a lo que ocurre con los fotorreceptores o los receptores olfatorios. Esto se ha descartado ya que las reacciones enzimáticas involucradas serían demasiado lentas para responder al estímulo mecánico , el cual tarda pocos microsegundos .

2.- El ordenamiento de la actina del interior de los cilios debería actuar sobre el canal de la membrana directamente para que se lleve a cabo la respuesta sensorial. Una dificultad es que no se tendría en cuenta la direccionalidad de la respuesta.

3.- También se ha propuesto que es en la base de los estereocilios en donde se hallan anclados a la célula pilosa por una placa cuticular compleja compuesta de proteínas contractiles como el sitio de transducción . Este sitio es poco adecuado ya que, por registros electrofisiológicos en el medio que rodea a las células pilosas se ha demostrado que el sitio de entrada de corriente durante la respuesta sensorial se encuentra en la punta del estereocilio y no en

la base.

Algunas evidencias sobre el mecanismo de transducción Proviene de estudios con microscopia electronica en los cuales se ha demostrado que existen filamentos muy finos que conectan a un cilio con otro en la punta del lado de su vecino de mayor tamaño (84). Utilizando esta informacion el mecanismo de transduccion se ha explicado que ocurre de la siguiente forma (83) :

El movimiento del cilio en direccion del incremento en su longitud empuja a los microfilamentos que conectan a las puntas de los cilios. Esto causa una distorsion mecanica de un canal selectivo a K^+ , el cual penetra a la celula (Figura 8) y la diferencia de potencial disminuye a -40 mv, por lo que la celula se despolariza (el potencial de membrana de la celula pilosa en estado de reposo es de -60 mv) .Si el haz de pelos se mueve en la direccion opuesta, el potencial de membrana se incrementa de -60 mv a -65 mv, causando una hiperpolarizacion . El principal ion cargado positivamente en la endolinfa es el K^+ , por lo que se ha senalado como el principal transportador de carga electrica a traves de la membrana. La endolinfa contiene 150 mM de K^+ , solamente 1 mM de Na^+ , 10 μ M de Mg^{2+} y 10 - 300 μ M de Ca^{2+} libre (27).

La despolarizacion provocada por la flexion de los estereocilios activa a los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje(80), provocando un aumento de la despolarizacion . Al mismo tiempo la entrada de Ca^{2+} eleva la concentracion local de este cerca de la superficie de la membrana. La alta

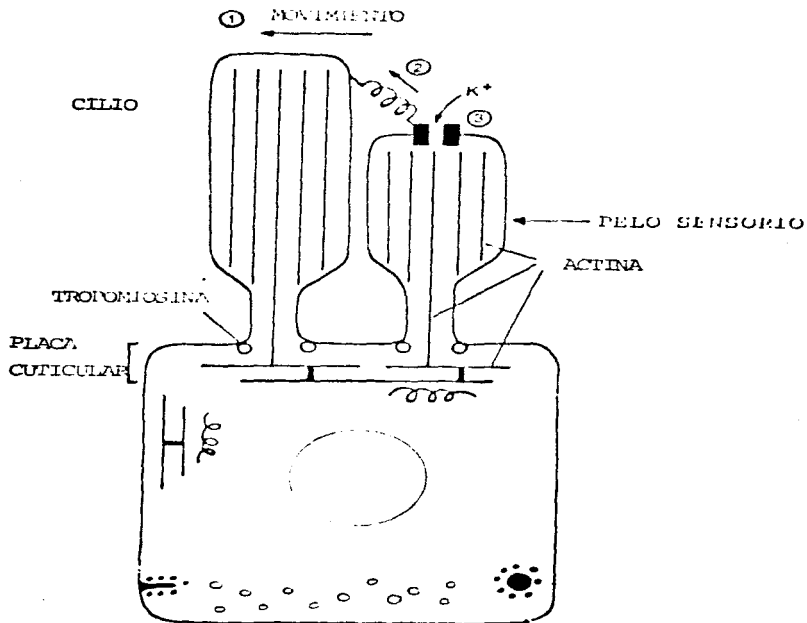


Figura 8 . Proceso inicial de la transducción en la célula pilosa vestibular. (1) Cuando el haz de estereocilios es desplazado, los canales de transducción se abren (2) y los iones K^+ entran a la célula (3)

concentración de Ca^{2+} activa a los canales de K^+ sensibles al Ca^{2+} y el K^+ sale y repolariza a la membrana disminuyendo la activación de los canales de Ca^{2+} . El fluido en la superficie apical de la célula pilosa tiene una concentración de K^+ mucho más elevada que la superficie basolateral de ésta, como consecuencia el K^+ puede entrar y salir de la célula. Con el tiempo el potencial de membrana se vuelve más negativo y regresa a su estado estacionario, y el contenido de Ca^{2+} intracelular se reduce por su captura dentro de los organelos de la célula y por la expulsión de este ion. Por último cuando el canal de K^+ sensible a Ca^{2+} se cierra, la célula pilosa retorna a su condición inicial (fig. 9).

En el área basal de la célula se encuentran canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, cuando ocurre la despolarización, estos canales se abren y permiten su entrada a la célula. Recientemente se ha descrito que estos canales y los canales de calcio activados por potasio se encuentran muy cerca de la región sináptica (130). Durante la rápida activación de las conductas de K^+ reactivan para la estimulación eléctrica y la transmisión en la sinapsis aferente (130) (1). Una vez que entra el Ca^{2+} ocasiona la liberación del neurotransmisor a la región intersináptica por un mecanismo todavía desconocido. Cuando el neurotransmisor atraviesa este espacio y llega a la terminal nerviosa aferente, se combina con receptores presentes en la membrana postsináptica y causa un cambio de permeabilidad, lo que resulta en un potencial generador que a su vez llega al axón y provoca un potencial de acción, transformándose en una señal eléctrica que

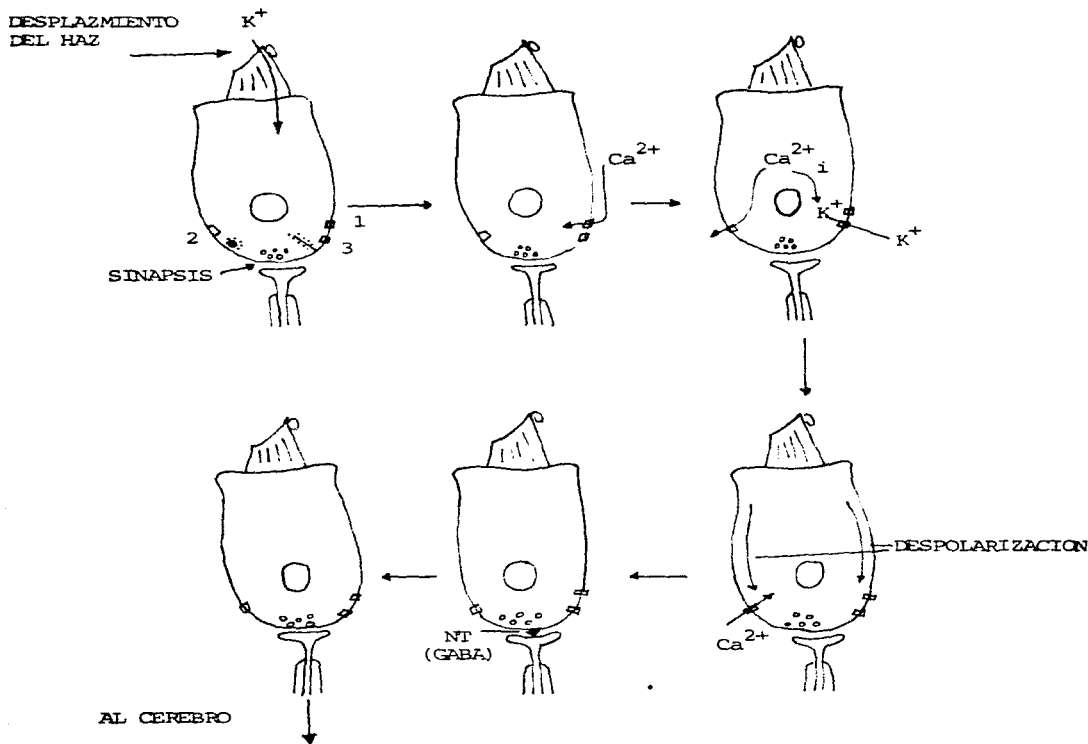


Fig 9 . Representación esquemática de los eventos que desencadena un estímulo sobre el haz de estereocilios de la célula pilosa. (1) y (2) canales de calcio. (3) canal de potasio sensible a calcio modificado de Hudspeth, A. J. (1985). The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells. Science. 230. 745-752. (1) y (3) se colocaron muy cercanos a propósito, ya que recientemente se ha descrito una probable colocalización de estos dos canales en la base de las células pilosas y cercanas a los cuerpos sinápticos (ca). NT= neurotransmisor Roberts et al (1990). J. Neurosci. 10. 3664-3684 .

viaja al cerebro (fig 8).

MECANISMO DE TRANSMISION SINAPTICA EN EL OIDO

Existen numerosas evidencias tanto morfológicas como fisiológicas que indican que la transmisión sináptica entre las células pilosas y las fibras aferentes y eferentes es de naturaleza química (48,65,66,85,122,131,132,154,169).

Evidencias morfológicas

Estudios ultraestructurales han revelado que el espacio sináptico entre la célula receptora y la fibra aferente es de aproximadamente 200 Å. La célula pilosa (presinápsis en este caso) contiene un cuerpo típicamente presináptico, mientras que la membrana de la terminal postsináptica (fibra aferente) muestra un engrosamiento. Los cuerpos presinápticos fueron descritos por primera vez por Sjostrand en la retina y han sido encontrados en los receptores vestibulares por varios grupos (140,141,162,163) (fig 10).

En cuanto a la sinápsis eferente, ha sido descrita por estudios morfológicos con microscopía electrónica. Generalmente las terminales eferentes (botones) contienen muchas vesículas algunas de ellas con centro denso, mientras que en las células pilosas que contactan se ha encontrado una cisterna subsináptica (68,164,164) (fig 10).

Así mismo, las distancias que median entre las terminales eferentes (presinápsis) y la célula pilosa y la que existe entre esta y la terminal aferente miden cerca de 200 Å por lo que parece tratarse de la estructura de una sinápsis química (9,62,113). Hasta el momento no se ha descrito la existencia de sinápsis eléctricas .

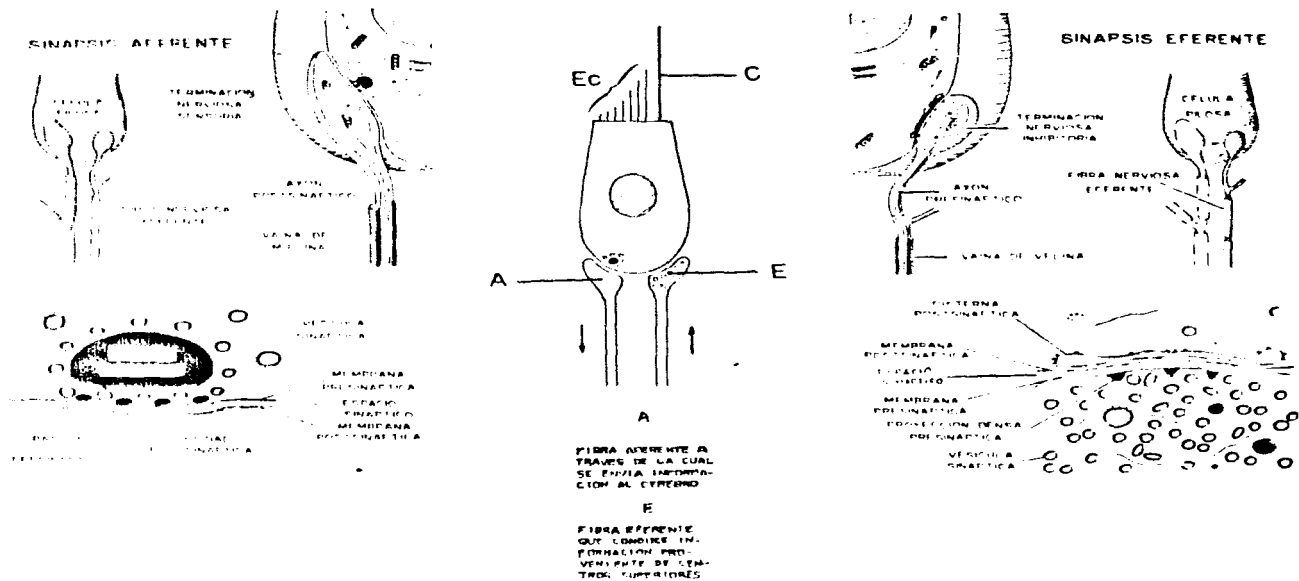


Figura 10 Representación esquemática de las partes que constituyen a la célula pilosa y sus contactos neurales. Ec: estereocilios; T: cinocilios; A: terminación nerviosa aferente; E: terminación nerviosa eferente (porción central). Las porciones laterales derecha e izquierda de esta figura, representan la estructura microscópica de las uniones sinápticas que contactan a la célula pilosa (modificado de Benshalon, G. y Flock, A. (1980) Ultrastructure of synapses in the lateral line canal organ. Acta Otolaryngol. (Stockh.) 90:11).

Evidencias Fisiológicas:

Para la transmisión sináptica aferente diversas investigaciones fisiológicas han demostrado potenciales postsinápticos excitatorios en las fibras primarias aferentes en el sáculo del pez dorado y en el canal semicircular de la rana (65,71,135). También se ha descrito un retraso en el potencial sináptico cuando se registra la fibra aferente después de la estimulación de la célula pilosa en el pez dorado (65,66) y se ha comprobado la existencia de una neurotransmisión de tipo cuantico (85). Asimismo, los potenciales unitarios registrados en las fibras aferentes provenientes de las áreas sensoriales vestibulares de algunos elasmobranchios y anfibios se modifican por movimientos de la cabeza o desaparecen por la supresión del ion calcio en el medio (122).

Muy recientemente se han registrado potenciales postsinápticos excitatorios en las fibras aferentes que inervan a la cresta ampular aislada en el polio (169). También en diferentes mamíferos (i.e. chinchilla, gato, mono) se han estudiado las propiedades morfo-fisiológicas de las terminales aferentes y se ha visto que tienen diferentes propiedades de descarga (regular e irregular) y se ha involucrado a la descarga irregular con una transmisión sináptica de tipo cuantico (11,55,72).

En cuanto a la sinapsis eferente, numerosos estudios han demostrado que existen en el laberinto de la rana, potenciales postsinápticos inhibitorios, registrados en las fibras aferentes inducidos por estimulación de las fibras eferentes (132), y existen evidencias fisiológicas revisadas por Frecht y col. (122) que sugieren que la

comunicación entre la célula pilosa y la terminal eferente es de naturaleza química.

A pesar de todos estos hallazgos experimentales no se ha demostrado claramente la identidad de los neurotransmisores que actúan entre las células pilosas y las terminales nerviosas aferentes y los que median la comunicación entre la célula pilosa y los botones eferentes. Por tanto, han sido necesarias una serie de estrategias utilizando diversos criterios para tratar de acumular evidencias en favor de los candidatos a neurotransmisores. Para propósitos prácticos, deben existir reglas homogéneas de manera que se puedan comparar los resultados de diferentes investigaciones.

Basándose en las características mostradas por un neurotransmisor en una sinapsis bien definida, varios autores han propuesto criterios que debe llenar un compuesto para ser considerado como candidato a neurotransmisor.

Dichos criterios, que fueron definidos por Warman (161), pueden dividirse en pre-sinápticos y post-sinápticos.

Los pre-sinápticos son:

- (a) Presencia de la sustancia en concentraciones apropiadas en la terminal nerviosa.
- (b) Disponibilidad de los precursores de esta.
- (c) La presencia de su enzima sintetizadora.
- (d) La existencia de un mecanismo específico de liberación dependiente de calcio, en respuesta a una estimulación de la terminal.
- (e) La existencia de mecanismos de inactivación.

Entre los criterios postsinápticos se encuentran :

(a) La sustancia aplicada en el sistema debe tener los mismos efectos que la estimulación presináptica .

(b) Que las drogas (antagonistas del candidato a neurotransmisor) aplicadas, deben bloquear los efectos de dicha estimulación .

(c) La sustancia debe producir cambios en las propiedades eléctricas de la membrana similares a los que produce la estimulación .

En general estos requisitos pueden ser estudiados por métodos bioquímicos o inmunocitoquímicos, aunque los postsinápticos requieren además de métodos electrofisiológicos .

En el sistema vestibulo-auditivo, la identidad de los neurotransmisores no se conoce con certeza aunque se han propuesto algunas sustancias que clásicamente se han descrito como tales en el sistema nervioso, las que se han investigado tratando de cumplir con los criterios antes mencionados .

Entre las sustancias que se han postulado como neurotransmisor(es) aferentes se encuentran principalmente :

(a) El ácido glutámico

(b) El ácido gammaminobutírico (GABA)

Como neurotransmisores eferentes:

(a) La acetilcolina

(b) Algunos neuropeptidos como las encefalinas y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) .

A continuación se revisarán los datos experimentales que se han descrito en la literatura, obtenidos en el sistema vestibular, además los de algunas investigaciones en la cóclea y en el sistema de la línea lateral (de algunos animales acuáticos ,antecedentes evolutivos del oído interno).

ACIDO GLUTAMICO

Vestibulo de anfibios

Las evidencias a favor del ácido glutámico como el neurotransmisor aferente en el vestibulo de los anfibios son las siguientes:

El ácido glutámico imita la acción del neurotransmisor natural en los canales semicirculares de la rana. Se ha encontrado que el ácido N-metil-D aspártico (NMDA), el ácido kainico (KA) y el ácido quisqualico(QA) (agonistas del receptor al ácido glutámico) tienen un efecto activador en las aferentes de los canales semicirculares de la rana (76,160). En el saculo, la lagena y los canales semicirculares del ajojote *Ambystoma mexicanum* se han estudiado los efectos del ácido glutámico, el cual cumple con el criterio de similitud de acción , ya que la respuesta evocada por el mimetiza la producida por estimulación fisiológica; además, los antagonistas del ácido glutámico bloquean la respuesta a la estimulación mecánica (142).

En contraposición a estos resultados , se ha reportado que la actividad producida por el ácido glutámico en las aferentes primarias en los canales semicirculares de la rana se asocia con una despolarización de las células pilosas (7), y más recientemente se ha propuesto un papel del ácido glutámico

como modulador (pero no como neurotransmisor) en el canal semicircular de la rana (123) .

Vestibulo de mamiferos

En el gato la aplicación de ácido L-glutámico en el canal semicircular posterior imita al transmisor excitador en la sinapsis entre las células pilosas y las terminales aferentes (37) .

Recientemente se ha descrito en la literatura que existe inmunoreactividad positiva al ácido glutámico en las células pilosas y los cálices nerviosos aferentes que las envuelven en el vestibulo de la rata, el cuy y el gato(42) .

Cóclea

Las evidencias que se han obtenido en la cóclea son las siguientes :

Usando concentraciones despolarizantes de K^+ para inducir una liberación sincrónica del transmisor en las células pilosas en la cóclea de cuy, se ha demostrado la liberación de ácido glutámico dependiente de Ca^{2+} y estimulada por Potasio (94) .

También se ha encontrado que las células pilosas de la cóclea son capaces de transportar ácido glutámico y glutamina por un sistema de alta afinidad dependiente de Na^+ (73). Así se ha reportado captación de 3H -glutamato y 3H -glutamina en las células pilosas internas de la cóclea(52,136) .

En la cóclea se ha encontrado que la enzima asociada a la síntesis del glutamato (glutaminasa) se encuentra en altas concentraciones (150,100) . La glutaminasa se localiza especialmente en las células cocleares internas (4) .

En la cóclea del cuy el glutamato produce un efecto

excitatorio sobre las fibras aferentes (17,20,21). La perfusion del oido interno con glutamato produce un aumento significativo en la frecuencia de descarga de las neuronas aferentes secundarias a nivel del nuclei colicini (97).

En la coclea del cuy, el KA y el QA son potentes activadores de las fibras aferentes (124), mientras que el NMDA produce poco o ningun efecto (11). La administracion local de KA por un periodo prolongado en la coclea produce alteraciones morfologicas de las fibras aferentes asociadas a las celulas pilosas internas, sugiriendo la existencia de receptores glutamatergicos en estas fibras (13,93).

Se ha reportado inmunoreactividad de una sustancia parecida al acido glutamico en el citoplasma de las celulas pilosas externas e internas en la coclea del cuy (6).

En contraposición a estos resultados, por estudios con HPLC no se ha demostrado un aumento significativo en la liberación de glutamato y aspartato ante estimulación auditiva en la coclea del cuy (103), y se ha reportado que el NMDA no tiene ningun efecto sobre los potenciales cocleares en el cuy (24,25).

Línea Lateral

Las evidencias que se han obtenido en la línea lateral a favor del acido glutamico y el acido aspártico como neurotransmisores aferentes son las siguientes :

La estimulación fisiológica de la línea lateral de la rana produce un aumento significativo en la liberación de glutamato (115). También se ha demostrado que el glutamato se libera de una manera dependiente de Ca^{2+} y estimulando con Potasio (19).

Se ha reportado que el glutamato mimetiza la acción del estímulo natural en los electrorreceptores de los peces y en la línea lateral de la rana (22, 23, 26, 77, 155). El ácido glutámico y el ácido aspártico fueron las primeras sustancias que se demostró inducen un incremento en la frecuencias de descarga de las fibras aferentes en la línea lateral de *Xenopus laevis* (15, 26). Se ha encontrado que el NMDA, KA, y el QA tienen un efecto activador en las aferentes de la línea lateral de la rana. El *cis*-2,3-piperidín dicarboxílico (*cis*-2,3-PDA) y el *gamma*-D-glutamil-glicina (DGG), que son antagonistas de los aminoácidos excitadores, suprimen la actividad espontánea y la excitación inducida por el movimiento del agua en la línea lateral de *Xenopus laevis*, a concentraciones tan bajas como 50-100 μ M. (24). El ácido kinurenico (KYN) es un poco menos potente (125-250 μ M) (14). Las tres drogas actúan competitivamente a concentraciones menores de 500 μ M. El *trans*-2,3-PDA no tiene ningún efecto sobre la actividad de la línea lateral a concentraciones de 1-2 mM, indicando que la acción del *cis*-2,3-PDA es estructuralmente específica. Puesto que el *cis*-2,3-PDA, DGG y KYN actúan sobre los tres subtipos de receptores (NMDA, KA, QA), estos hallazgos sugieren que además de los receptores NMDA, también están involucrados los receptores KA y posiblemente los QA en la transmisión aferente en la línea lateral (18).

Aunque existen evidencias parciales, no se cumplen los criterios que permiten afirmar que el ácido glutámico es el

transmisor aferente. Entre ellos, no se ha logrado demostrar de manera convincente que el ácido glutámico realmente se libere durante la estimulación (al menos en la cóclea). La existencia de mecanismos de síntesis y degradación del ácido glutámico no indican que estos estén asociados necesariamente a su función como neurotransmisor, ya que pueden asociarse al metabolismo normal de la célula (8) . Por lo tanto, ya que el ácido glutámico es un potente agente despolarizante, es difícil concluir definitivamente sobre la especificidad de su acción en las aferentes primarias : así el ácido glutámico puede activar directamente las células sensoriales o inducir efectos secundarios como la liberación de otras sustancias. Por otro lado, a pesar de las evidencias que indican que el ácido glutámico pudiera ser el transmisor en las células pilosas, no se ha logrado caracterizar con precisión la acción de diferentes agonistas y antagonistas en un determinado sistema, así como estudiar su efecto en la descarga basal y en la respuesta ante la estimulación fisiológica (102) .

Acido γ -aminobutírico (GABA)

Vestibulo de anfibios y peces

Se ha reportado síntesis de GABA en el canal semicircular de la raya y en la papila anfibiana la cual carece de inervación eferente (63) .

En homogeneizados de vestibulo de rana se ha detectado actividad de la GAD y se ha visto que esta actividad no cambia al cortar el VIII nervio vestibular, lo que indica que esta

actividad pudiera localizarse en un compartimento del epitelio sensorial que bien podrían ser las células pilosas (99).

La picrotoxina inhibe la actividad espontánea y evocada en el nervio aferente del canal semicircular de la raya (63).

En contraposición, el GABA no tiene un efecto excitador en la respuesta evocada de las crestas ampulares de la rana (160), el GABA ni el muscimol tienen un efecto significativo sobre el potencial de reposo de las terminales aferentes en el laberinto de la rana y el axolote ,mientras que la aplicación de picrotoxina bloquea parcialmente la actividad espontánea (7,74,142) .

Vestibulo de aves

En el vestibulo del pollo se ha detectado actividad de la GABA en las crestas ampulares (105). Los niveles de la GABA aumentan durante el desarrollo de manera paralela a la maduración de las células pilosas del epitelio sensorial en el vestibulo del pollo (110) .

En las crestas ampulares del pollo, se ha reportado la existencia de un sistema de captación de alta afinidad dependiente de sodio y energía, posiblemente representando un sistema inactivador de GABA (104) .

También se ha demostrado la unión específica de ³H-GABA a una fracción membranial cruda de crestas ampulares de pollo, sugiriendo la presencia de un receptor sináptico a GABA (107).

Experimentos inmunocitoquímicos han demostrado reactividad parecida al GABA en las células pilosas del vestibulo de pollo (152). En estudios muy recientes se demostró que esta inmunoreactividad estaba asociada a algunas fibras. Sin embargo,

al investigar la inmunoreactividad a la GAD solo se encontró en las células pilosas (153) . En el mismo estudio se demostró inmunoreactividad positiva a la GABA-Transaminasa (enzima de degradación del GABA) tanto en las terminales aferentes como en las células del ganglio vestibular.

Vestibulo de mamíferos

Se ha descrito que los niveles de la GAD aumentan durante el desarrollo de manera paralela a la maduración de las células pilosas del epitelio sensorial en el vestibulo del cuy (87). Además el tratamiento con estreptomocina provoca un decremento en la actividad de la GAD vestibular (86,112) .

Se ha demostrado que la aplicación iontoforética de GABA incrementa la actividad espontánea en la macula del saculo del gato ; la bicuculina y la picrotoxina bloquean esta respuesta (54). El tratamiento exitoso con picrotoxina, de pacientes que sufren crisis de vertigo de origen periférico, puede correlacionarse con la existencia de un receptor a GABA en la periferia sensorial del laberinto (46) .

Contradictoriamente a este cúmulo de evidencias, en el mono araña se ha encontrado inmunoreactividad parecida al GABA en las terminales nerviosas eferentes vestibulares y en las células de soporte (151) , mientras que en el vestibulo del cuy se ha reportado inmunoreactividad positiva al GABA únicamente en los calices nerviosos aferentes (43) .

Coclea

Existen evidencias que asocian a la función del GABA con la innervación eferente del oído interno .

Así, se han encontrado gránulos radiactivos en la terminales eferentes de la cóclea, cuando esta se incubaba con ^3H -GABA y la captación de GABA se ha localizado preferentemente entre las terminales de las fibras eferentes (125) .

Estudios por inmunocitoquímica han asociado al GABA y a la GAD a los sistemas eferentes en la cóclea del cuy y del mono araña (59,60,147) .

La Picrotoxina y la bicuculina reducen la influencia de la estimulación eferente en la cóclea (98) .

Recientemente se ha descrito inmunorreactividad positiva a las subunidades α y β del receptor a GABA_A en la base de algunas células pilosas externas aisladas de la cóclea del cuy (121) .

En controversia a estos resultados, se ha demostrado que en la cóclea del gato y el cuy no existen niveles suficientes de las enzimas claves asociadas a la síntesis y degradación del GABA (56) y estudios con agonistas del GABA no modifican la respuesta de las fibras eferentes cocleares en el gato (96). Sin embargo se ha visto que sustancias parecidas al GABA (como el ácido glutámico y el ácido aspártico) se incrementan en la perilinfa de cuyes después de estimulación sonora, lo que podría apoyar su participación en la transmisión aferente (44,45) .

Cabe mencionar que también se ha implicado al aspártato (58), las catecolaminas (70,94,118,148), la sustancia activadora del nervio auditivo (ANAS) (137) y algunos péptidos de naturaleza desconocida como posibles transmisores aferentes, aunque los datos experimentales que los

apoyen como el (los) neurotransmisores son escasos (138).

ACETILCOLINA (ACh)

Existen considerables evidencias que indican que la acetilcolina es uno de los transmisores eferentes en el vestibulo de los vertebrados.

Antibios y peces

Se ha encontrado actividad de la colina acetiltransferasa (CAI), la enzima de síntesis de la acetilcolina, en el laberinto aislado del pez y la rana(63,100).

En posteriores estudios en la rana se encontro tambien que la CAI desaparece despues de escindir este nervio, lo cual sugiere su localización en la terminal eferente (99).

Se ha reportado que existe un mecanismo de captación de ³H-ACh que es dependiente de sodio y energía y liberación de ³H-ACh dependiente de calcio en el laberinto de la rana (108,109). y se ha detectado tambien actividad de la acetilcolinesterasa en el vestibulo de la rana(100).

Las terminales eferentes de probable naturaleza colinérgica en el sistema vestibular de la rana ejercen un efecto tónico inhibitorio sobre la actividad aferente proveniente del receptor vestibular (11,30,75).

Vestibulo de aves

Se ha demostrado actividad de la CAI en crestas aisladas del vestibulo del pollo (111) y se ha visto que durante su desarrollo la actividad de la CAI aparece tardíamente coincidiendo con la llegada de las terminales eferentes al epitelio sensorial vestibular(110). tambien se ha demostrado actividad de la

acetilcolinesterasa en membranas aisladas del vestibulo del pollo (106) .

Vestibulo de mamiferos

Se ha demostrado un sistema de transporte de ^3H -colina por las sinapsis eferentes en el laberinto de gato (41,125) .

Por técnicas histoquímicas se ha descrito la presencia de acetilcolinesterasa en la base de las células pilosas y entre los botones eferentes en varios mamíferos (chinchilla, gato y rata) (45,66,81-83) .

Cóclea

Se ha detectado actividad de la CAT en homogenizados de cóclea en cuy (56) y se ha demostrado por inmunocitoquímica que la CAT se encuentra exclusivamente en las terminales nerviosas eferentes en la cóclea y que esta disminuye hasta desaparecer después de que las eferentes son seccionadas y degeneran (5) . Por histoquímica se ha demostrado la presencia de la enzima que degrada a la acetilcolina, la AChE, en las terminales eferentes en la cóclea de varias especies (88-90,133) .

Cuando se aplican atropina, ortubocurarina, ortubuganotoxina y otros agentes anticolinérgicos intracoclearmente , bloquean los efectos de la estimulación eferente, sin afectar ninguno de los potenciales asociados con la transmisión aferente (95) .

Recientemente se ha descrito inmunoreactividad positiva al receptor nicotínico en la base de las células pilosas externas (aisladas) de la cóclea del cuy (120) .

NEUROPEPTIDOS

Al parecer, estas sustancias sólo participan ya sea solos ó

coexistiendo con otros neurotransmisores en la neurotransmisión eferente, pues no se ha encontrado una función clara en la transmisión aferente .

Vestibulo

Por inmunocitoquímica , y a nivel de las terminales eferentes por microscopía electrónica se observó la existencia del péptido relacionado al gen de la calcitonina(CGRP)(en inglés calcitonin-gene related peptide)* en el vestibulo de la rata (145) .

*Este péptido proviene del RNA mensajero de la calcitonina, el cual sufre un procesamiento alternativo, esto es del gen de la calcitonina se forma el transcrito primario, el cual se procesa de manera diferente, produciendo en las células C de la tiroides calcitonina y en el cerebro el CGRP. Este péptido se ha utilizado como un modelo para estudiar procesamientos alternativos de RNA mensajero, los cuales en el cerebro pueden determinar el fenotipo neuronal(ver Rosenfeld, M.G. et al (1984) Alternative RNA processing: Determining neuronal phenotype. Science 225, 1315-1320).

Cóclea

En la literatura se encuentran algunas evidencias que involucren a las encefalinas como posibles transmisores eferentes, implicando que sus sistemas coexisten con el de la acetilcolina : La existencia de péptidos neuroactivos en la cóclea fue descrita por primera vez por Fax y Altschuler; ellos demostraron inmunoreactividad de una sustancia parecida a las encefalinas en las neuronas olivococleares eferentes de la cóclea del cuy. (3,57). Posteriormente Hoffman

y col.(78,79) identificaron dos fracciones que contenían metionina-encefalina en la cóclea del cuy utilizando separación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y posterior radioinmunoensayo. Frescher y sus colaboradores también detectaron un compuesto semejante a metionina-encefalina en la perilinfa y encontraron que aumenta después de la estimulación con sonido (42,43). Además se ha demostrado la localización de este péptido por inmunocitoquímica en la cóclea del cuy (46).

Estudios adicionales utilizando HPLC han demostrado la existencia de diferentes péptidos derivados de la proencefalina -A asociados al sistema olivococlear del cuy (50,51).

La inmunoreactividad a las encefalinas desaparece en cuyes a los cuales se les escindió el octavo nervio (vestibulo auditivo), indicando la asociación de estas sustancias al sistema eferente (47). Así mismo, se ha encontrado inmunoreactividad asociada a péptidos derivados de la proencefalina B (prodinorfinas) en la cóclea del cuy (50).

En la línea lateral de la rana se ha encontrado inmunoreactividad positiva al CGRP en el sistema eferente(1) .

III MODELO Y ENFOQUE EXPERIMENTAL

Por lo anterior, es evidente que solo existen datos incompletos que apoyen al GABA y a la acetilcolina como probables neurotransmisores vestibulares, por lo que en este trabajo se pretende aportar evidencias experimentales en apoyo a este postulado, utilizando dos tipos de enfoques: el evolutivo, estudiando parámetros bioquímicos (enfoque bioquímico-evolutivo) y el enfoque inmunocitoquímico.

ENFOQUE BIOQUÍMICO-EVOLUTIVO

En este enfoque se analizó con algunos parámetros bioquímicos la evolución de la neurotransmisión de la periferia sensorial vestibular en animales representativos de tres grupos de vertebrados: anfibios, aves y mamíferos, esperando encontrar una correlación entre la constancia de las células pilosas tipo II en todos los vertebrados, la aparición de las células pilosas tipo I en animales terrestres (aves y mamíferos), la presencia y magnitud de las actividades enzimáticas de las enzimas de síntesis del GABA y la ACh como candidatos a neurotransmisores en el vestibulo.

Este enfoque ha probado ser muy útil para entender algunos problemas de la química del cerebro, especialmente aquellos que estudian (analizan) los cambios estructurales que acompañan de un cambio de especificidad química regional (158).

Para estudiar este enfoque se midieron las actividades enzimáticas de las enzimas de síntesis del GABA y la acetilcolina, que son: la glutamato descarboxilasa (GAD);

L-glutamato 1-carboxil-lasa (E C 4.1.1.15) y la colina acetiltransferasa (CAI : acetil-CoA: colina-o acetiltransferasa E C 2.3.1.6) , en homogeneizados de laberinto completo de rana, pollo, rata y cuy (es importante señalar que dado que el estudio fue también comparativo, el utilizar a la rata y al cuy los vertebrados mamíferos, nos permitiría conocer que tan semejantes eran las actividades de la enzimas y así poder extrapolar los resultados a otros modelos) . Se investigó, además si sus actividades específicas y características eran semejantes a las encontrados en tejido nervioso donde el GABA y la Ach están comprobados como neurotransmisores .

El criterio bioquímico más importante para postular a una célula como GABAérgica o colinérgica es la demostración de su enzima de síntesis; la GAD y la CAI son ampliamente aceptadas como marcadores específicos de estas células (31,127,128,149) . En cambio los niveles del GABA o la Ach y sus enzimas de degradación pueden o no encontrarse en la misma célula (146) .

Este criterio es importante no solo porque la velocidad de formación del transmisor como de cualquier metabolito depende de la actividad de la enzima sintetizante , sino también porque la poza metabólica de la cual se liberan preferentemente los neurotransmisores es una poza de neurotransmisor recientemente sintetizado(146) .

La GAD como marcadora de células GABAérgicas

La GAD es la principal enzima limitante de velocidad en el cerebro para la síntesis del GABA (Fig 11A) .

La actividad total de la GAD en cerebro es 10-20 veces mayor

que la síntesis del GABA (34), lo cual nos dice que la GAD opera a una fracción de su capacidad. Aunque se han sugerido otras vías de síntesis para el GABA estas no participan de una manera importante (13). En el cerebro la GAD tiene una distribución regional precisa, la cual es paralela a la distribución regional del GABA, esto es de esperarse en una enzima biosintética limitante por su velocidad (53). En virtud de que la GAD es la principal enzima que sintetiza al GABA, esta es utilizada como uno de los principales marcadores para células GABAérgicas. La GAD se encuentra en las terminales presinápticas de las neuronas GABAérgicas aunque también se ha detectado en sus cuerpos celulares, por fraccionamiento celular (64). En células gliales no se encuentra en cantidades apreciables (135). Estudios inmunocitoquímicos con tejidos lesionados utilizando a la GAD como marcador han puesto en evidencia neuronas GABAérgicas con largos axones que se proyectan entre diversas regiones del cerebro, citando como ejemplo proyecciones que van del hipotálamo (núcleo caudal magnocelular) a la neocórtex, o del cerebelo (córteza cerebelosa) a los núcleos cerebelares (134 y Muganini and Bertel, W (1985) Atlas de la distribución de neuronas GABAérgicas y terminales en el CNS de la rata por inmunocitoquímica. En Handbook of Chemical Neuroanatomy, Ed. por A. Bjorklund y I. Hokfelt vol 4. Elsevier, Amsterdam).

Degradación metabólica del GABA:

Una vez sintetizado el GABA puede ser liberado ante un estímulo; esta liberación y su subsiguiente unión a su receptor es seguida por una rápida inactivación. Este proceso es

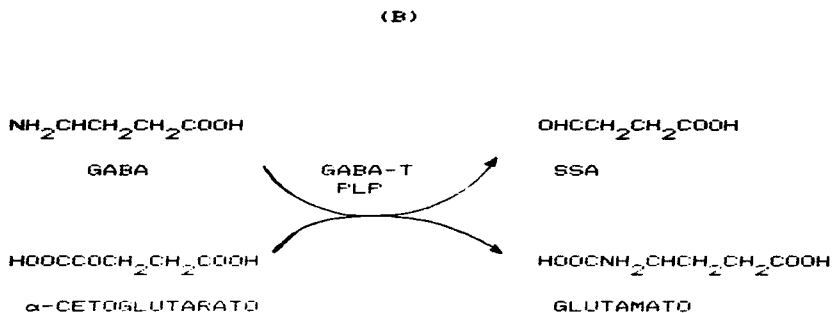
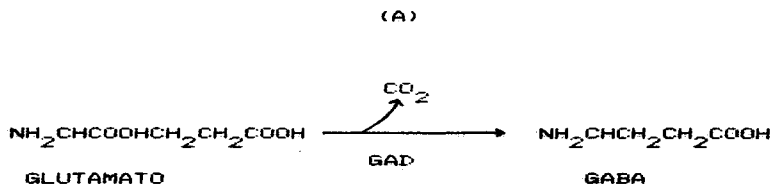


Figura 1.1. Síntesis (A) y degradación del GABA (B).
 FLF = FURIFONAL 5'-FOSFATO; SSA = SEMIALDEHIDO SUCCINICO;
 SSADH = SEMIALDEHIDO SUCCINICO DESHIDROGENASA
 GABA-T = GABA-TRANSAMINASA.

un sistema de captación activo, que se ha demostrado en sinaptosomas, rebanadas de cerebro, fracciones gliales y en la retina. El GABA liberado al espacio sináptico es captado por tres sitios morfológicamente distintos: la neurona presináptica, la neurona postsináptica y las células gliales. Posteriormente es metabolizado por la γ -aminobutirato α -cetoglutarato aminotransferasa (GABA-Transaminasa: GABA-T; EC 2.6.1.19) de la siguiente manera: El GABA se convierte primero a semialdehído succínico (SSA) por transaminación y este a su vez se oxida a ácido succínico (Fig 11B). Esta vía constituye la principal ruta de degradación del GABA (presente sólo en el sistema nervioso), además de ser su vía de entrada al ciclo de los ácidos tricarbónicos(12) . Se ha sugerido que la GABA-T se encuentra localizada en la matriz mitocondrial(135). Por tal motivo es muy importante estudiar la localización de esta enzima. Aunque no podría utilizarse como marcador de células GABAérgicas, su estudio complementa a la demostración de la enzima de síntesis.

La ChAT como marcador de células colinérgicas

La síntesis de la acetilcolina depende de la presencia de la colina acetiltransferasa, enzima que transfiere el grupo acetilo de la acetil-CoA a la colina (Fig 12A). Esta enzima está confinada a las terminales colinérgicas: es producida en el soma de la neurona y es transportada a través del axón hasta llegar a la terminal en donde es acumulada (Fig 13). Se ha visto que la ChAT sintetiza acetilcolina regulada por el tráfico de impulsos nerviosos, lo cual habla de que esta enzima está acoplada a la función colinérgica(47) .

La purificación de la CAT ha permitido la producción de anticuerpos específicos y ahora es posible llevar a cabo estudios inmunocitoquímicos para mapear vías colinérgicas, utilizando a la CAT como un marcador específico(31). La CAT se encuentra en el sistema nervioso, específicamente en sitios en donde hay una intensa actividad colinérgica. Por ejemplo la enzima se encuentra en altas concentraciones en el núcleo caudado y relativamente en bajas concentraciones en el cerebelo(39).

Por lo anterior podemos pues considerar a la CAT como un marcador específico de sinapsis o células colinérgicas.

Degradación de la acetilcolina:

La acetilcolinesterasa (acetilcolina acetil-hidrolasa, AChE; EC 3.1.1.7) se encuentra ampliamente distribuida en el sistema nervioso central(SNC) y el sistema nervioso periférico(SNP), en el músculo esquelético y en el sistema digestivo. Tiene un papel esencial en la neurotransmisión colinérgica ya que lleva a cabo una rápida degradación de la acetilcolina sintética natural en acetato y colina (Fig 12B). Esta enzima es producida tanto por células que contienen sitios colinoceptivos como por células colinérgicas (Fig 13). Si bien la presencia de la AChE no es una prueba concluyente de que una neurona es colinérgica, existen evidencias que sugieren que la AChE ontogenéticamente es la primera enzima que aparece en neuronas colinérgicas(69) por lo que en estudios del desarrollo es un mejor marcador que la CAT.

Por tanto, el conocer el sistema de síntesis complementado con el sistema de degradación es importante para postular

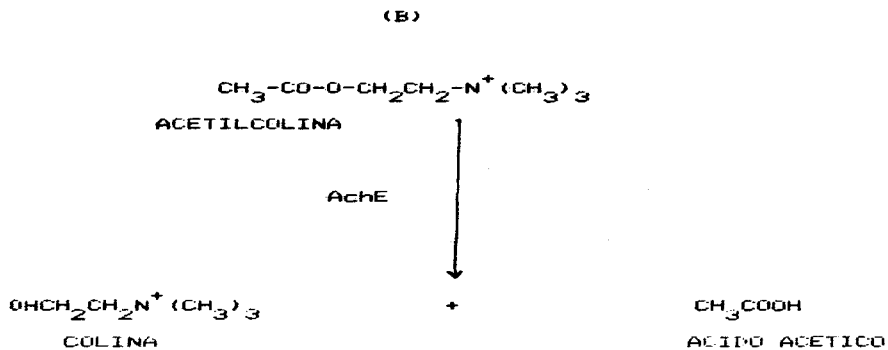
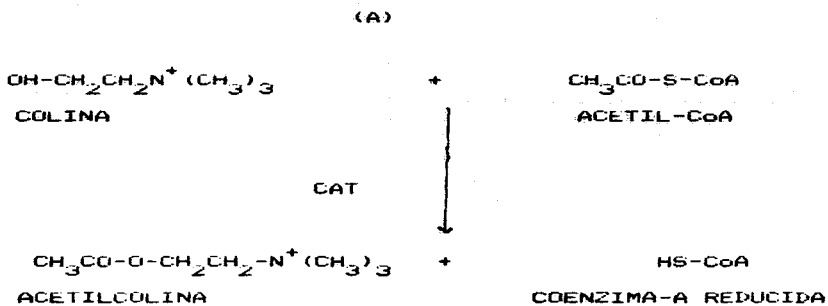


FIGURA 12 Síntesis y degradación de la acetilcolina

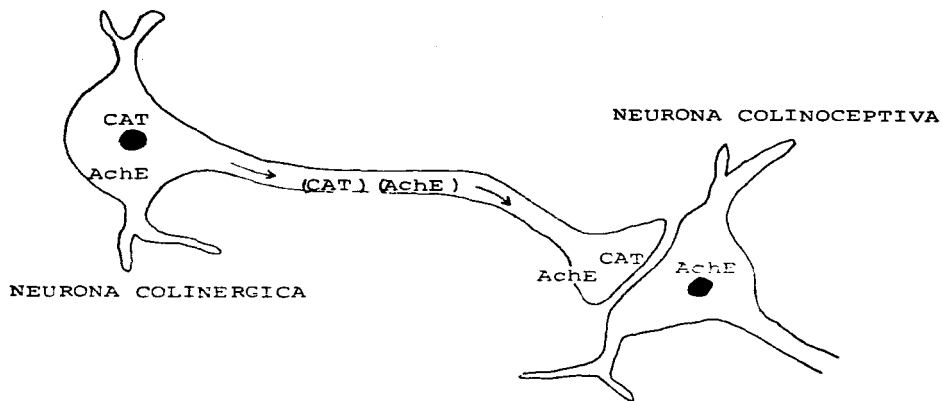


Figura 13. Esquema que representa a una célula (neurona) colinérgica y a una célula (neurona) colinoceptiva y la ubicación de la enzima de síntesis de la Ach, la CAT y la enzima de degradación, la AchE. CAT= colina acetiltransferasa
 AchE= acetilcolinesterasa.

a la Ach como un transmisor eferente .

Antecedentes que validan al enfoque Bioquímico

Con objeto de justificar este enfoque se describen las siguientes evidencias bioquímicas en el sistema vestibular descritos por el grupo de la Dra. Meza pionero en este tipo de estudios, Precedidos por un solo artículo en el que se demuestra síntesis de GABA y acetilcolina en peces y antibios por Flock & Lam en 1974 (63).

Para el vestibulo del pollo se demostró síntesis de GABA por dos métodos: (1) Desprendimiento de CO_2 radiactivo de un homogenado de crestas vestibulares cuando se incubaba con ácido glutámico marcado en el carbono 1 y (2) incubación de las crestas vestibulares con ácido glutámico uniformemente marcado con carbono 14 y separación posterior de los aminoácidos formados extrayendolos con alcohol del tejido. Se observó que este extracto alcohólico contenia GABA marcado con el isotopo ^{14}C .

Con estos resultados se postulaba la existencia, en el tejido de estudio de la enzima sintetizante del GABA, la GAD (105) .

Para confirmarlo se hicieron experimentos paralelos incluyendo en ellos al ácido aminooxiacético(AOA) que es un inhibidor de la GAD, que actua indirectamente en la enzima atrapando el grupo carbonilo del fosfato de piridoxal(PLP) que es la coenzima. Se encontro una inhibición de mas de un 50% cuando el AOA se incluía en el medio de incubación concluyendo por tanto que la reacción era mediada por una enzima la GAD (106).

Tambien se estudiaron las propiedades cineticas de la GAD vestibular en presencia del sustrato y de inhibidores como el AOA. Se encontro que la Km aparente para el glutamato era de 5 mM,

cifra que coincide con los valores encontrados por otros investigadores en el SNC. El pH óptimo (7.3) se asemeja al encontrado para la misma enzima en otras preparaciones del SNC (106).

Estudios similares se realizaron en homogeneizados de vestibulo del cuy. Se encontro una Km aparente para el acido glutámico de 4.5 mM. un pH óptimo para la GAD de 7.3 (Iturbe A.G. (1966) Neuroquímica del oído interno de cuyes tratados con estreptomidina. Tesis de Licenciatura). También se midió la actividad de la GAD en condiciones óptimas y a concentraciones saturantes de sustrato en pollos ratas y cuyes durante su desarrollo, con objeto de ver cuando alcanzaba su máxima actividad, independientemente de la probable localización celular de esta enzima (Sv. 110 y Lenon M.L. (1967) Ubicación celular del acido γ -aminobutírico y la Ach en el oído interno de ratas tratadas con propiltiouracilo, tesis de Licenciatura).

Adicionalmente se demostraron otros parámetros bioquímicos (neuroquímicos) como son la existencia de un sistema de captación de ^3H -GABA en crestas vestibulares de pollo, dependiente de Na^+ y energía, esto pudiera representar un mecanismo de inactivación para el GABA. También se demostró unión de ^3H -GABA en una preparación membranial congelada y descongelada de crestas vestibulares del pollo (107), sugiriendo esto la existencia de un receptor de tipo postsináptico .

Para la enzima de síntesis de la Ach se estudiaron algunas de sus propiedades en el pollo y la rana. Se demostró que la actividad de la CAI era sensible al ion fosfato y dependiente del ion cloro, de manera similar a la descrita para la CAI en

tejido nervioso (100,108). Se realizaron además curvas de actividad enzimática contra concentración de proteína, mostrándose lineal hasta 0.8 mg de proteína, contra tipo de incubación mostrándose lineal hasta 60 minutos, contra concentración de TritonX-100 mostrándose activa por una concentración de 0.33%. También se estudio el efecto del PH sobre la actividad de la CAT mostrando un PH óptimo de 7.4(100). Todas estas propiedades fueron similares a las descritas en sistema nervioso de las especies estudiadas.

De igual forma se midió la actividad de la CAT en condiciones óptimas y a concentraciones saturantes de sustrato en polios, ratas y cuyes durante su desarrollo.

Se estudio también a la enzima de degradación de la ACh, la acetilcolinesterasa (AChE) en fracciones membranales crudas de polio y rana y se estudio su inhibición por eserina (inhibidor específico de la AChE) (100,108).

Todos estos parámetros y los que justifican que se pueda utilizar a la GAD y la CAT como el criterio bioquímico más importante(descritos de la pagina 28 a la 31) para decir que una célula es GABAérgica o Colinérgica, nos permitieron desarrollar el enfoque Bioquímico-Evolutivo.

ENFOQUE INMUNOCITOQUIMICO

Por último teniendo en cuenta que conociendo la localización celular de las enzimas de síntesis puede correlacionarse bastante bien con la función sináptica del neurotransmisor, se utilizó el enfoque inmunocitoquímico, mediante el cual con la utilización de anticuerpos contra GABA, contra la GAD y su enzima de degradación la GABA-Transaminasa (GABA-T), contra la colina

acetiltransferasa (CAT) y la técnica histoquímica de la enzima de degradación de la acetilcolina (la acetilcolinesterasa, AchE) se identificaron los tipos celulares en donde se ubicarían estas enzimas .

El conocer la ubicación celular de las enzimas sintetizantes desde el punto de vista de su distribución tanto regional como subcelular se correlaciona bastante bien con la función sináptica del neurotransmisor (146).

Para este enfoque se utilizó como modelo de mamíferos el vestibulo del cuy, ya que como se vio anteriormente los estudios que implican al GABA como neurotransmisor aferente sólo han sido realizados en el vestibulo del gato (54), el cual podría utilizarse también como modelo. Pero tiene la desventaja de que el acceso al sistema vestibulo-auditivo es muy difícil, por encontrarse inmerso en el hueso temporal , sumamente duro, mientras que en el cuy el laberinto se encuentra dentro de la bula auditiva, la cual se puede separar del craneo fácilmente por ser muy frágil. Lo anterior recalca la importancia de realizar este tipo de estudios en el vestibulo del cuy lo que nos permitiría extrapolar más directamente lo que podría suceder en el vestibulo del hombre. A este respecto cabe señalar que tanto el vestibulo del cuy como el del hombre (los dos vertebrados mamíferos) posee el mismo tipo de órganos(tres canales semicirculares, utrículo y sáculo) el mismo tipo de células pilosas (I y II), e inervaciones en el epitelio sensorial vestibular y también se ha visto que el vestibulo de ambos vertebrados es muy sensible a los antibióticos aminoglicosídicos (112, y Nadol, J.B. (1981) Histopathology of human aminoglycoside

ototoxicity. En Aminoglycoside ototoxicity, Editado por Lerner, S, Matz, G y Hawkins, J. E. Little, Brown and Company Boston, pp 409-435).

IV BREVE DESCRIPCION DEL OIDO INTERNO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Para el primer enfoque se utilizaron los respectivos vestibulos de la rana (anfibio), del pollo (ave) y de dos roedores: la rata y el cuy (mamiferos), modelos que son de fácil acceso para estudios bioquimicos. A continuacion se describe la anatomia del vestibulo de estos animales .

Rana : el aparato vestibular de la rana esta constituido por un laberinto membranoso el cual se encuentra suspendido dentro de una capsula ósea por tejido conectivo. Esta capsula ótica se separa de la cavidad que contiene al tallo cerebral por una lámina delgada por la cual atraviesan la rama anterior y posterior del octavo nervio (vestibular). El laberinto está constituido por dos porciones: la vestibular y la auditiva, la primera esta formada por tres canales semicirculares, utriculo , saculo y la lagena, la segunda por la papila anfibia y la papila auditiva (Figura 14A).

El epitelio sensorial vestibular de la rana posee un sólo tipo de célula pilosa sensitiva (la tipo II) rodeada por células de soporte e innervada basalmente por terminales nerviosas aferentes y eferentes en la parte basal , provenientes de la rama vestibular del octavo nervio craneal. De este modelo se utilizó el vestibulo completo, del cual se eliminó el otolito .

Folle : el oido interno del pollo está incluido en tres huesos porosos: el proótico, epistótico y el epiótico que son

equivalentes a la porción ptreá del hueso temporal en los mamíferos.

El laberinto membranoso está formado por tres canales semicirculares, el utrículo y el sáculo, cuyas cavidades conectan a través del ductus reuniens con el conducto coclear y la lagena que son equivalentes a la cóclea de los mamíferos. Las estructuras sensoriales están localizadas, como en otros vertebrados, en las crestas de la ampolla de los canales semicirculares y en las maculas de los órganos otolíticos (utrículo, sáculo, lagena). El órgano sensorial del conducto coclear se llama papila basilar, En las aves el laberinto óseo sigue la forma del laberinto membranoso (fig 148).

El epitelio sensorial vestibular consiste en células pilosas sensitivas tipo I y II inervadas por la rama vestibular del octavo par craneal.

De este modelo se utilizó el vestibulo completo, al cual se le eliminó el otolito, de la macula de la lagena.

Rata y cuy: Al igual que el oído interno de la rana y el pollo, en la rata y el cuy el aparato vestibular está constituido por un laberinto membranoso, el cual se encuentra localizado en una porción ósea, equivalente al hueso temporal en el humano denominado bula timpánica, en la cual se encuentra inmerso. El laberinto membranoso está constituido por dos porciones la vestibular y la auditiva, la primera está formada por tres canales semicirculares: el utrículo y el sáculo, la segunda por la cóclea (fig 149).

En el vestibulo, el epitelio sensorial de la rata y el del

cuyos poseen las fibras de células pilosas la I y la II, inervadas por terminales nerviosas aferente y eferentes en la parte basal, que provienen del octavo nervio vestibular.

De estos dos modelos se utilizaron, los tres canales semicirculares y el utrículo .

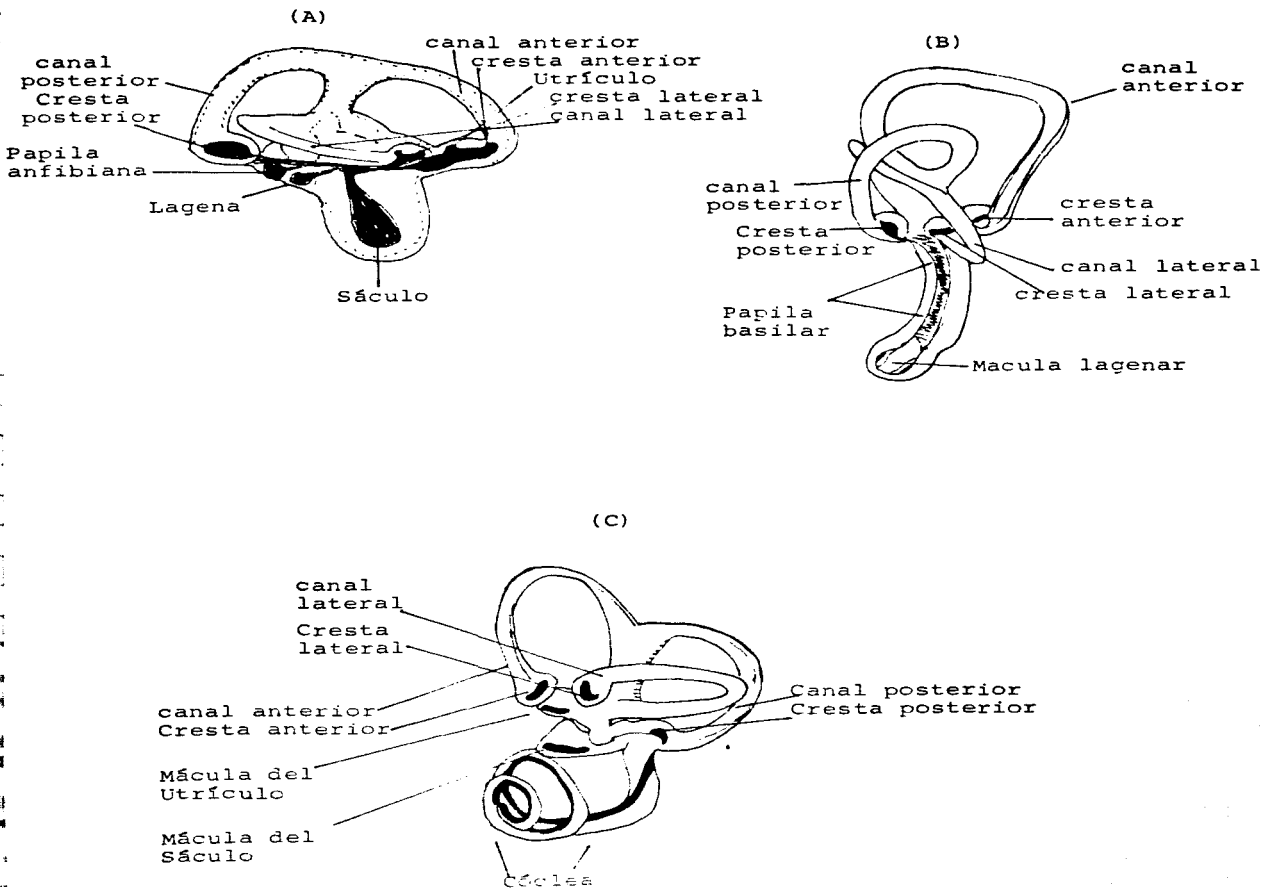


Figura 14. Representación esquemática de las partes que conforman el oído interno de la rana (A), el pollo(B) cuy y rata(C).

V PARAMETROS ESTUDIADOS

1.-PROCEDIMIENTO DE DISECCION DEL VESTIBULO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Para realizar los estudios bioquimicos e inmunocitoquimicos se tuvieron que desarrollar técnicas especiales para la disección de cada uno de los órganos del aparato vestibular de los animales de experimentación. Para la bioquímica era necesario extraer el tejido lo más rápido posible con objeto de realizar las determinaciones enzimáticas. Para la inmunocitoquímica, a pesar de estar el tejido fijado previamente, era también necesario exponer lo más pronto posible la estructura vestibular para lograr la fijación completa de todo el epitelio. Paso importante en el caso de la utilización de este material para el estudio inmunocitoquímico con anticuerpos anti-GABA. (Artículo II).

Procedimiento de disección del vestibulo del pollo.

Se usaron Pollos machos (Rhode Island rojos) de un día de edad. Se sacrificaron por decapitación y el cráneo se cortó por la línea sagital. Al exponer la cavidad craneana se removió toda la masa encefálica y se colocó bajo el microscopio estereoscópico para realizar la microdisección. Los huesos que contienen al oído interno se localizaron por su proximidad a la cavidad cerebelosa y se cortaron hacia adentro hasta alcanzar la cápsula periótica. Los canales semicirculares, que no son visibles a través del hueso se extrajeron introduciendo unas finzas finas de disección a los conductos óseos que se localizan como rampas laterales al cerebelo. Inmediatamente después de extraídos,

los canales semicirculares que contiene a las crestas ampulares se colocaron en amortiguador de fosfatos de sodio (0.01 M, pH 7.4) o de potasio (0.2 M, pH 7.3) en hielo. El tiempo de disección para cada canal fue de aproximadamente 15 segundos. Se extrajeron órganos de ambos oídos de 2 a 4 animales, para cada determinación enzimática.

Rana : Para este estudio se utilizaron ranas adultas (*Rana moctezuma*) de 50-100 gramos de peso a las cuales se les extrajo el laberinto.

El animal es decapitado y la cabeza se recibe en una caja de Petri sobre hielo, que contiene amortiguador de fosfato de sodio (0.01 M, pH 7.4) para la CAT y de potasio para la GAD (0.2M, pH 7.3). Para evitar la deshidratación del tejido . Bajo el microscopio estereoscópico se procede entonces a remover la mandíbula inferior de la cabeza y a localizar la porción del hueso temporal, dentro del cual se encuentra el órgano vestibular; se remueve el músculo y el hueso y se abre la capsula ótica que contienen al laberinto, el cual se encuentra separado del tallo cerebral. Posteriormente, se remueve el otolito del vestibulo y se extrae el órgano completo con unas micropinzas . Al extraer el vestibulo se tiene cuidado de no incluir el ganglio vestibular. El tiempo de disección para cada vestibulo fue de aproximadamente 20 segundos y se extrajeron vestibulos de 5 a 20 animales . Para cada determinación enzimática .

Rata y cuy : Se utilizaron ratas Long Evans (*Rattus*

norvegicus) de ambos sexos de 100-150 g , y cuyes de ambos sexos (Cavia cobaya) de 150-200 g , los cuales se sacrificaron por decapitación .

Se abrió el cráneo sagitalmente y se removió el cerebro. Se separaron las bulas auditivas de la porción temporal de cráneo y se colocaron en una caja de Petri sobre hielo bajo el microscopio estereoscópico. Rompiéndose en dos partes, con objeto de remover la membrana timpánica y los huesecillos del oído medio; a continuación se separó la cóclea y se extrajeron los tres canales semicirculares y el utrículo . El laberinto disectado se colocó en amortiguador de fosfato de sodio (0.01M, PH 7.4) o de potasio (0.2M, PH 7.3). El tiempo de disección para cada laberinto fue de aproximadamente 2 minutos. Se extrajeron los órganos de 2-4 animales para cada determinación enzimática .

2.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GAD Y LA CAT.

Los métodos utilizados para la determinación de la actividad de la GAD y la CAT en el vestibulo de las cuatro especies de vertebrados se describen detalladamente en el artículo (I) y en la página 49 de Materiales y métodos.

3.- LOCALIZACION INMUNOCITOQUIMICA DEL SISTEMA DEL GABA Y LA ACETILCOLINA .

Los métodos inmunocitoquímicos para la localización del GABA, la GAD y la GABA-T se describen detalladamente en los artículos (ii) y (iii) y en la página 51 de Materiales y Métodos.

Los métodos inmunocitoquímicos e histoquímicos para la

inmunotinción que producen estos anticuerpos son consistentes con los datos bioquímicos de distribución del GABA en el sistema nervioso (28,128) .

En el caso de la ubicación inmunocitoquímica de la GAD, GABA-T y la CAT , los anticuerpos utilizados tienen las siguientes características :

Anticuerpos anti-GAD y anti GABA-T: Son anticuerpos policlonales producidos en conejo , utilizando como antígenos a la GAD y a la GABA-T purificada de cerebro de ratón (167, 168) . Estos anticuerpos se han caracterizado utilizando las siguientes pruebas inmunológicas: inmunodifusión, inmunoelectroforesis, neutralización de las actividades enzimáticas por anticuerpos, fijación del complemento e inmunoensayo enzimático (167,168).

Anticuerpos anti-CAT : los anticuerpos anti-CAT fueron producidos en conejo utilizando como antígeno a la CAT purificada de placenta humana, la cual ha probado ser idéntica a la CAT de cerebro de humano (29), con la ventaja de que la primera se puede obtener en grandes cantidades. Por estudios de inmunotransferencia se ha probado que estos anticuerpos son monoespecíficos al incubarlos a una preparación de CAT de placenta sometida a un gel de poliacrilamida y posteriormente electrotransferida(29).

Los anticuerpos anti-GABA fueron donados por el Dr. Robert Wenthold, del Laboratorio de Neurobiología Molecular del NIH en Bethesda, Maryland, USA; los anticuerpos anti-GAD y anti-GABA-T fueron donados por el Dr. Jangshen Wu del laboratorio de Biología Celular de la Universidad de Lawrence en Kansas, USA y los anticuerpos anti-CAT por el Dr. Louis E. Hersh de la Universidad de Texas en Dallas, Texas, USA.

VI MATERIALES Y METODOS

Para el artículo 1 se utilizaron los siguientes reactivos:

Determinación de la GAD:

- 1.- Amortiguador de KH_2PO_4 (MRC), 0.2M pH 7.3, 1.361 g/50ml.
- 2.- Fosfato de Piridoxal (PLP) (SIG), 0.1mM (final) 0.11 g / 5 ml.
- 3.- Mercaptoetanol (SIG), 10 mM (final 0.1755 ml/25 ml) .
- 4.- Acido L-glutámico (SIG), 10 mM (final) pH 7.3 (0.2646 g/ 50 ml).
- 5.- Acido D-L (^{14}C) glutámico (New England Nuclear, Chicago, USA) 0.06 μCi (final), 0.01 ml/0.5 ml, actividad específica 54 mCi/mmol .
- 6.-Liquifluor 250 ml (1 g de difeniloxazol(SIG), 0.0125 g de 1,4 bis 2-5 feniloxazolil) en 250 ml de tolueno (J.T.M.B.).
- 7.- H_2SO_4 (J.T.M.B.), 3.6N, 9.8 ml/100 ml de H_2O .
- 8.- Hidróxido de niamina en metanol 1M (AMER).

Clave de la fuente de reactivos: SIG.- proveniente de la compañía Sigma, San Luis Missouri, E.U.A.; J.T.M.B.-J.T. Baker, México; MRC.- Merck, México y AMER.- Amersham.

Determinación de la LAT

- 1.- Amortiguador de NaH_2PO_4 (MRC) 0.30M, pH 7.4, 2.626 g/500 ml.
- 2.- NaCl (Mallinkrodt, México) 3.6 M, 21 g/100ml .
- 3.- EDTA(SIG) 0.66 M, 2.457 g/100 ml ajustado a pH 7.4 con NaOH 0.5M.
- 4.- Sulfato de eserina (SIG) 1 mM. 3.82 mg / 5ml de EDTA, pH 7.4 .
- 5.- Cloruro de colina (SIG) 0.2 M, 0.46 g/ 10 ml .

6.- Tritón X-100 (SIG) 10 % en agua destilada desionizada.

7.- Tetrafenilbora (SIG) 500 mg en 100 ml de acetonitrilo (J.T.M.B.).

8.- Liquifluor 500 ml (2g de 2,5 difeniloxazol (SIG) 0.025 g de 1,4 bis 2-5 feniloxazolil) benceno ; 2,2, p-fenileno bis (5-feniloxazol (SIG), en 500 ml de tolueno (J.T.M.B.).

9.- S-acetil-Coenzima A (SIG) 0.6 M, 1.21g/1ml de H₂O.

10.- Coenzima-A, acetil³H-acetil (New England Nuclear, Chicago USA) 0.05 mCi, 0.05 mCi, 0.05 mg / 5 ml, actividad especifica 850 mCi/ mMol, en solución acuosa pH 5 .

Las claves de los reactivos son las mismas que las de la GAD .

Para los artículos II, III y IV se utilizaron los siguientes reactivos :

1.- Paraformaldehido en polvo (Polysciences, Warrington, Filadelfia, USA: PFWUSA).

2.- Cacodilato de sodio (PFWUSA).

3.- Óxido de propileno (PFWUSA).

4.- Glutaraldehido, solución al 50% (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Filadelfia, USA: EMS) .

5.- Tetroxido de osmio (EMS) .

6.-Resina para inclusion, Embed-812 :el kit(juego) contiene cuatro sustancias: DUBA (anhidrido dodecenil succinico) resina, NMA (anhidrido metil naftilico) endurecedor, DMP-30 (2,4,6,-tri (dimetil aminometil)fenil)acelerador y EM bed-812(resina) .

7.- Parafinatheresaplast (PFWUSA).

8.-Azul de toluidina (EMSA).

9.-Resina para montar cubreobjetos, Poly-Mount, mounting media (PFWUSA).

10.-Alcohol etílico absoluto (J. T. Baker, Xalostoc, México).

B) Reactivos para la inmunocitoquímica:

1.-Anticuerpo Primario anti-GABA, policlonal, donado por el Dr. Robert Wenthold del NIH, Bethesda, Maryland, USA (Artículo I).

2.-Anticuerpo anti-glutamato descarboxilasa (anti-GAD), policlonal, y anticuerpo anti-GABA-transaminasa (anti-GABA-T) policlonal, donado por el Dr. Jang-yen Wu, de la Univ de Kansas, Lawrence USA (artículos II, y IV).

3.-Anticuerpo anti-colina acetiltransferasa (anti-CAT) policlonal, donado por el Dr. Louis B. Hersh de la Univ de Texas, USA (artículo IV).

4.-Juego (kit) ABC, Vector-Vectastain .Este kit contiene :

4.1.Suero normal de cabra.

4.2.Anticuerpo secundario anti-conejo, producido en cabra .

4.3.Avidina (reactivo A).

4.4.Biotina-peroxidasa (reactivo B).

(Fuente: Vector Labs, Burlingame, California, USA).

3.-Anticuerpo secundario anti-conejo producido en cabra , marcado con partículas de oro coloidal de 15 nanómetros de diámetro (Janssen Life Sciences Products, Olen, Belgica).

4.-3,3, Diaminobenzidina (PWFUSA).

5.-Metaperiodato de sodio (Sigma, St.Louis Missouri, U S A : SSLMUSA).

6.-Triton X-100 (SSLMUSA).

7.-Ácido gamma-aminobutírico (GABA) (SSLMUSA).

8.-Peroxido de hidrogeno al 30% (Merck, México).

C) Sales:

1.-Hidroxido de sodio (J. T. Baker, Xalostoc, México: JTMBXM).

2.-Cloruro de sodio(JTMBXM).

3.-Fosfato de sodio monobásico,monohidratado(JTMBXM).

4.-Fosfato de sodio dibásico,heptahidratado (JTMBXM).

Soluciones:

1.-Etóxido de sodio:solución saturada de hidróxido de sodio en alcohol etílico absoluto. Preparar 15 días antes, ó usar hasta que la solución tenga un color ambar. Se utiliza diluida en alcohol etílico absoluto (1:1).

2.-Metaperiodato de sodio al 1% (1 g. diluido en 100 ml de agua destilada,desionizada).

3.-Solución salina isotónica (SSI) (0.9 g de NaCl en 100 ml de agua destilada,desionizada).

4.-Paraformaldehido al 8%(solución Stock)(80 g de Paraformaldehido en 1000 mililitros de agua destilada, desionizada).

Manera de prepararse:se adicionan 80 g de paraformaldehido a 900 ml de agua destilada desionizada, previamente calentada a ebullición y se agita .a continuación se adicionan aproximadamente 4 ml de una solución de hidróxido de sodio 3 molar,hasta que la solución se aclara.Se deja enfriar y se filtra . Preparar el mismo día,ó un día antes.

5.-Amortiguador de cacodilato de sodio,0.2M,PH 7.4.(42.84g en 1000 ml de agua destilada desionizada.Ajustando el PH con una solución de ácido clorhídrico 0.1M).

6.-Solución fijadora : se prepara mezclando 500 ml de paraformaldehido al 8% con 500ml de amortiguador de cacodilatos solución 0.1 y adicionando 4 ml de glutaraldehido al 50% . quedara una solución fijadora, al 4% de

paraformaldehído , 0.2 glutaraldehído en amortiguador de caocodilato 0.1M . Esta solución fijadora se ajusta a pH 7.2-7.3.

7.-Amortiguador de solución salina y fosfatos (PBS),0.1M,pH 7.4.Se preparan dos litros(Cloruro de sodio 16g,Fosfato de sodio monobásico monohidratado 2.43g. y fosfato de sodio dibásico, heptahidratado 27g).

8.-PBS con Triton X-100 al 0.3%(PBS-T):a 100 ml de PBS,se le adicionan 0.3 ml de Triton X-100.

9.-Suero normal de cabra al 10% en PBS-T.

10.-Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) : a 5 mililitros de PBS-T se le adicionan 50 microlitros del reactivo A del kit de Vector y 50 microlitros del reactivo B(se prepara media hora antes de usarse).

11.-Diluciones de los anticuerpos (para diluir estos anticuerpos se utiliza PBS filtrado con filtro Millex-GS,con poro de 0.22 micras(Millipore,Bedford,MA,USA).

12.-Diluciones de los anticuerpos secundarios. Se realizan de la misma manera que con el anticuerpo Primario solo que se utiliza PBS-T.

13.-Azul de toluidina(solución acuosa al 0.5 % en borato de sodio al 1%) .

14.-Diaminobenzidina(DAB).Se prepara la DAB disolviendo 20 mg de esta sustancia en 20 ml de PBS(filtrandolo) y adicionando 5 microlitros de agua oxigenada al 30 % .

15.-Preparación de la resina EM bed-812:EM bed-812,10ml;DfSA,8ml;NMA,7 ml;IMP-30,1.6ml.Adicionar uno por uno en ese orden en agitación.

Animales : Se usaron pollos machos Rhode Island (*Gallus Domesticus*) de un día de edad, ranas adultas (*Rana Moctezuma*) de 50-100 gramos de peso, ratas pigmentadas (*Rattus norvegicus*) de 50-100 g de peso (artículo I) y cuyes machos sanos pigmentados (*Cavia cobaya*) de 200-250 g. (artículos I-IV), de una colonia ubicada en el laboratorio de Otoneurobioquímica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, México .

M E T O D O S

Para el artículo I se procedió de la siguiente forma :

Los animales para la determinación de la actividad GAD y la CAT se sacrificaron por decapitación , extrayéndoseles el vestibulo completo (crestas ampoliares, utrículo y lagena(en el pollo)) como se describe en la página 39. El laberinto disecado se colocó en amortiguador de fosfato de sodio frío (4°C), 0.1M, PH 7.4 (para el ensayo de la CAT) ó en amortiguador de fosfato de potasio 0.20 M PH 7.3 (para el ensayo de la GAD). En el caso de la rana , esta se decapitó y se recibió la cabeza en una caja de Petri que contenía 10 ml de amortiguador de fosfato de potasio 0.2M (GAD) ó 10 ml de amortiguador de fosfato de sodio 0.01M, PH 7.4 (CAT) para prevenir la deshidratación del tejido. Para el ensayo de la CAT se adicionó además 1mM de sulfato de eserina con objeto de inhibir la acción de la acetilcolinesterasa. La disección del vestibulo completo se llevo a cabo como se describió de la página 37-41 .

(A) Ensayo de la GAD: La actividad de la GAD se determinó por el método radioquímico de Albers y Brady (ref.1 artículo I) con algunas modificaciones . Todas las

determinaciones se realizaron por triplicado (0.3mg de proteína para el pollo y la rana y 0.05-0.07 mg para el cuy y la rata) de homogenados de los órganos vestibulares de cada animal, los cuales se colocaron en un medio que contenía (concentración milimolar mM) : ácido L-glutámico 10; 2-mercapto-etanol 10; fosfato de Piridoxal 0.1; fosfato de sodio 200. PH 7.3. La reacción se inicia al adicionar 30 ul de DL (1-¹⁴C) ácido glutámico (0.24 uCi) ó L (1-¹⁴C) ácido glutámico (0.12 uCi) con una actividad específica de 100 ó 50 mCi/mmol respectivamente e incubándose a 30^o C (en la rana) y a 37^o C (para el pollo, cuy y rata) por 20 minutos. Esta se paro por la inyección de 0.2ml de H₂SO₄ 1.8 M . El ¹⁴CO₂ liberado se capturo en 0.1ml de hidroxido de amonina 1M contenida en un microtubo conactado con una manguera al microtubo que contenia el medio de reacción(30 ul volumen total). Se utilizaron como blancos tubos cuya reacción se paro al tiempo cero . luego los tubos se post-incubaron a 30^o C ó 37^o C por 60 minutos para que se equilibrara la reacción. La actividad de la GAD se expresó como nanomoles de ácido glutámico descarboxilado / hr / mg de proteína.

(B) Ensayo para la GAT : Esta se determinó por el método radioquímico de Fonnum. (Ref 8 artículo 1) con ligeras modificaciones. Las determinaciones se realizaron por triplicado , para lo cual se utilizaron de 0.05,0.05,0.07 ó 0.4 mg de proteína de un homogenado de vestibulo completo de pollo, rata, cuy o rana respectivamente en un medio que contenía (en mM): amortiguador ó fosfato de sodio 10; cloruro de colina 10; sulfato de eserina 0.1; ácido etileno-diamino-tetra-acético(EDTA) 10; cloruro de sodio 300; Triton X 100 0.33% ; 1³H]acetil-coenzima -A

0.06 (0.26 μCi) con una actividad específica de 850 mCi/mmol . Este medio de reacción se ajustó a un pH final de 7.4. El tiempo de incubación fue de 15 minutos a 30°C (para la rana) o 37°C (Pollo, rata y cuy). La reacción se paro por adición de 10ml de amortiguador de fosfato de sodio 10 mM a cada microtubo colocado en un vial. A continuación se adicionan 2 ml de tetrafenilborato en acetonitrilo (2mg/ml) a cada vial para separar a la ^3H acetilcolina formada de la ^3H acetil-coenzima-A que no reaccionó y 8 ml de liquido de centelleo. Los blancos se pararon a tiempo cero. La actividad de la CAI se expreso como pmoles de acetilcolina sintetizada/mg de proteína/minuto .

La radiactividad de ambos (CAI o CAE) se determinó en un espectrómetro de centelleo liquido Packard Tricarb .

(C) Determinación de proteínas: La concentración de proteínas de cada homogenado se determino por el metodo de Lowry y col (ref articulo 1) usando albumina sérica bovina como estandar y llevando acabo el analisis en un espectrofotómetro marca Beckman modelo DU-6.

Para los articulos II, III y IV se procedió de la siguiente forma:

Perfusión y fijación del tejido:

a) Se anestesió al animal con una solución de hidrato de cloral (300 mg /kg de peso) por via intraperitoneal.

b) Se realizó la perfusión cardiaca, primeramente con 100 ml de una solución de lavado (solución salina isotónica), seguido de la solución fijadora (4% paraformaldehído, 0.1-0.2 % de glutaraldehído , en amortiguador de cacodilatos, pH 7.4, 0.1M).

Técnica de disección del tejido : terminada la perfusión se decapitó al animal, se abrió el cráneo sagitalmente y se removió el cerebro. Se separaron las bulas auditivas, las cuales se abrieron y se sumergieron en la misma solución fijadora, y bajo el microscopio estereoscópico, se extrajeron los tres canales semicirculares y el utrículo. Se dejó el tejido sumergido en la solución fijadora por tres horas a 4 ° C (segunda fijación).

Procesamiento de las muestras hasta su inclusión en resina (microscopía óptica y electrónica) (artículo II) :

a) Terminada la segunda fijación, se lavó el tejido con amortiguador de cacodilatos, 0.1 M, pH 7.4 tres veces por 20 minutos (en adelante los lavados se indicarán X, es decir : 3X20 significa, que se lavó tres veces por 20 minutos).

b) Post-fijación : se realizó sumergiendo el tejido lavado en una solución de tetroxido de osmio al 0.1% (preparado en amortiguador de cacodilatos, 0.1 M, pH 7.4) durante una hora.

c) A continuación se lavó en amortiguador de cacodilatos (0.1 M, pH 7.4) .

d) Deshidratación: se deshidrató el tejido con alcohol etílico, en concentraciones ascendentes (35%, 50%, 70%, 80%, 95%) por 10 minutos cada uno a 4 ° C. Finalizando con alcohol al 100% (3 X 10 minutos) y se transfirió finalmente a óxido de propileno al 100% (2 X 5 minutos).

e) Freinclusión del tejido en resina : el tejido se transfirió cuidadosamente a una mezcla de resina : óxido de propileno 1 : 1 por tres horas . Posteriormente a resina : óxido de propileno 3 : 1 durante toda la noche; al final a resina pura por cuatro horas.

f) Inclusion del tejido en resina: en estas condiciones se incubó durante 48 horas a 60°C . Para su polimerización.

Obtención de cortes semifinos: Se realizaron cortes semifinos de 0.5 a 1 micras de espesor de los bloques de resina con el tejido obtenido por el procedimiento anterior. Dichos cortes fueron realizados con un ultramicrotomo marca LKB, o Sorval MT-2 semiautomático, utilizando cuchillas de vidrio.

Los cortes se recibieron en sendos porta-objetos de vidrio con una parte esmerilada y se permitió su adhesión a estos, incubando a 40°C por dos horas.

Para saber si el tejido estaba orientado en la posición deseada (corte transversal de las cresta ampular, o el utrículo), se tiñeron los cortes con azul de toluidina, adicionando una gota de la solución de azul de toluidina y calentando a 120°C por dos minutos, dejando enfriar el porta-objetos, lavando con agua destilada, desionizada (2 X 2 minutos) y se observó al microscopio óptico. Una vez obtenidos los cortes con la orientación deseada se procedió a realizar la inmunocitoquímica.

Para permitir la penetración de los anticuerpos al tejido era necesario remover la resina, y además eliminar el tetróxido de osmio, que enmascara la reacción inmunocitoquímica, lo cual se realizó de la siguiente manera.

a) Procedimiento de remoción de la resina (Etching):

Se sumergieron los porta-objetos con los cortes adheridos perfectamente, en una solución de etóxido de sodio: alcohol etílico absoluto 1 : 1, por 10 minutos. A continuación se realizaron tres lavados con agua destilada, desionizada por 5 minutos (3 X 5).

A partir de este paso, se tuvo cuidado de no permitir la

deshidratación del tejido.

b) Eliminación del tetróxido de osmio (Bleaching):

Después del procedimiento de lavado del paso anterior, se transfirieron los portaobjetos a una solución acuosa de metaperiodato de sodio al 1 %, por 5 minutos, seguido de un lavado con agua destilada, desionizada, por un minuto, y 5 minutos más en la solución acuosa de metaperiodato de sodio al 1% (en este paso cabe aclarar, que es necesario utilizar tetróxido de osmio, para tener el tejido perfectamente fijado, ya que de lo contrario, las células del epitelio sensorial se observarían colapsadas). A continuación se realizaron tres lavados con agua destilada desionizada por 5 minutos.

Procesamiento de las muestras hasta su inclusión en parafina-paraplast o en frío (artículos III y IV) :

a) Terminada la segunda fijación, se lavó el tejido con amortiguador de cacodilatos, 0.1M, pH 7.4 tres veces por 20 minutos y se procedió a deshidratar en alcoholes ascendentes desde 35% hasta 100% y se incluyó en parafina -paraplast (previamente a la solidificación de la parafina se orientó el tejido bajo el microscopio estereoscópico). Posteriormente se obtuvieron cortes de 3 micras y se recogieron en un portaobjeto de vidrio. Se dejaron en la estufa a 37 grados por 24 horas y se procedió a remover la parafina para poder incubar el anticuerpo primario.

b) Los cortes se sumergieron en las siguientes soluciones: agua 100% (10 minutos), alcohol 100 % (1 min), alcohol 50% (1 min), agua destilada desionizada (3 minutos), PBS (5 minutos), PBS-suero normal de cabra-Triton-X 100, 0.3% (30 minutos) .

Inmunocitoquímica a nivel de microscopía óptica

a) Los cortes tratados con los procedimientos anteriores, se incubaron en suero normal de cabra al 3% en PBS-I, por 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

b) Se lavaron brevemente por dos minutos en agua destilada, desionizada.

c) Se aplicó el anticuerpo anti-GABA (diluído 1:200, 1:500, 1:1000), antiGAD (1:250, 1:500, 1:1000) anti-GABA-T (1:1500) o anti-LAT 1:1000-1:2000) y se dejó incubando por 48 horas, a 4 ° C , en una cámara húmeda .

d) Al final de la incubación se efectuaron tres lavados con PBS(30 X 20 minutos).

e) Se aplicó el segundo anticuerpo(anti-conejo producido en cabra), diluido 1:50 en PBS-I, y se incubó una hora a temperatura ambiente con agitación .

f) Se lavó con PBS (3 X 10 minutos).

g) Se aplicó el complejo ABC (Avidina-Biotina-Peroxidasa) por una hora y se incubó a temperatura ambiente, con agitación (este complejo se preparó una hora antes de usarse , adicionando 50 microlitros del reactivo A a 5 ml de PBS-I y 50 microlitros del reactivo B) (12) .

h) Se lavó con PBS, 3 X 20 minutos .

i) Se adiciona la DAB, recientemente preparada (50 a 100 microlitros por porta-objeto) y se observó el desarrollo del precipitado bajo el microscopio óptico a 10 aumentos(10X) (durante 2-4 minutos).

j) Se detuvo la reacción por dilución de la DAB, sumergiendo los porta-objetos en agua destilada, desionizada, por 10 minutos

dos veces.

k) Se dejaron secar los porta-objetos a temperatura ambiente, toda la noche, guardándolos en una caja, para protegerlos del polvo.

l) Se cubrió el tejido con Poly-Mount y un cubre-objetos.

m) Se realizó la observación en un microscopio óptico marca Polybar Reichert, a diferentes aumentos: 10X, 40X y 100X, en campo claro, en ausencia de filtros y también, bajo iluminación tipo Nomarski.

n) Se realizó el registro fotografico, utilizando una película Kodak, Plus Pan, ASA 125, para blanco y negro o una Kodacolor ASA 400, para color a 10X, 40X y 100X.

Controles utilizados en el procedimiento inmunocitoquímico:

Controles negativos: Incubación del tejido sin el anticuerpo primario (reemplazado por FBS) o con el anticuerpo anti-GABA absorbido con su antígeno (anticuerpo anti-GABA, mas el conjugado GABA - glutaraldehido - albumina sérica bovina) en sustitución del anticuerpo anti-GABA (artículo I) .

Para la localización de la GAD y la GABA-T (artículo III) y la CAI (artículo IV) se incubó el tejido sin el anticuerpo respectivo (reemplazandolo con FBS) y se llevó a cabo el procedimiento inmunocitoquímico.

Controles positivos : realización del procedimiento inmunocitoquímico en cortes transversales de cerebelo del mismo animal fijado, en donde se sabe hay células, que son inmunoreactivas a los anticuerpos anti-GABA(artículoI), anti-GAD, anti-GABA-T y anti-CAI (artículoIII) .

Imunocitoquímica a nivel de microscopía electrónica, utilizando un anticuerpo secundario marcado con partículas de oro coloidal de 15 nanómetros de diámetro.

a) Perforación y fijación y inclusión: se realizó el mismo procedimiento que se utilizó para microscopía óptica.

b) Obtención de los cortes ultrafinos: se realizaron cortes ultrafinos de 80-100 nm de los mismos bloques de resina de donde se obtuvieron los cortes semifinos, utilizando una cuchilla de diamante (Diatome, Reichert), en un ultramicrotomo marca Reichert Ultracut E.

c) Los cortes se recogieron en rejillas de níquel de 400 mesh, y se dejaron secar por 24 hrs, en una caja de Petri a temperatura ambiente.

Al día siguiente:

1) Se incubaron los cortes en metaperiodato de sodio al 1%, por 20 minutos.

2) Se lavaron las rejillas cada una con 50 gotas de PBS, contenido en una jeringa de 10 ml, la cual tiene un filtro Millipore de 0.22 micras (todos los lavados de los pasos que se describen a continuación se realizaron de esta manera).

3) Se adicionaron 50 microlitros de suero normal de cabra al 30% en PBS-T, y se incubó una hora a temperatura ambiente y con agitación.

4) Se eliminó el exceso de suero normal de cabra, sin dejar secar la rejilla. Se adicionó el anticuerpo anti-GABA (diluido en PBS-T) y se incubó por 24 horas en agitación y a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

5) Se lavó el exceso de anticuerpo con PBS dos veces y se

adicionó el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo en cabra) diluido en PBS-T.

6) Se lavó con agua destilada desionizada dos veces y se dejó secar las rejillas, a temperatura ambiente por dos horas en una caja Petri .

7) Se tiñó con acetato de uranilo (solución acuosa al 1 %) por tres minutos y con citrato de plomo (solución acuosa al 1 %) por tres minutos . Se lavaron los cortes y se dejaron secar a temperatura ambiente, por dos horas.

8) Se observó al microscopio electrónico, utilizando un microscopio marca Jeol 140 ó Jeol 1400.

Optimización de las condiciones a seguir para la inmunocitoquímica a nivel de microscopía electrónica : Para ello se experimentó con los siguientes parámetros:

- a) La concentración del anticuerpo anti-GABA.
- b) La concentración del anticuerpo secundario.
- c) El nivel de tinción de fondo (background).

Para (a) se probaron diferentes concentraciones de anticuerpo anti-GABA, de 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:750 , 1:1000 y 1:2000 manteniendo la concentración de anticuerpo secundario constante.

Para (b) se utilizaron concentraciones de anticuerpo secundario desde 1:10, 1:20, 1:30 y 1:40, manteniendo la concentración de anticuerpo primario constante .

Para (c) se utilizaron los siguientes controles:

Control positivo, núcleos cocleares.

Control negativo: edición del anticuerpo anti-GABA, absorbido con su antígeno, y la omisión del anticuerpo primario en el procedimiento inmunocitoquímico reemplazándolo por PBS.

Además se consideró como un nivel de background aceptable (no significativo) la aparición de menos de 10 partículas de oro coloidal en una área en donde no haya tejido (solo resina), como la porción apical de un corte transversal de la cresta ampular o la porción luminal de los vasos sanguíneos (es decir se compara un área en donde se presume hay inmunoreactividad, con respecto a un área en donde no haya tejido, o tejido no inmunoreactivo). Además se compara la densidad de partículas entre una célula pilosa y una célula de soporte, en donde a nivel de microscopía óptica no aparece inmunoreactividad.

De 32 experimentos que se realizaron, cada uno por triplicado (entre (a) y (b)) se obtuvo, que a concentraciones altas de anticuerpo anti-GABA, 1:100 y 1:200, apareció un elevado nivel de background, al igual que a altas concentraciones de anticuerpo secundario 1:1. Por otro lado a altas diluciones de anticuerpo primario (1:750 en adelante) o anticuerpo secundario (1:30, 1:40), se obtuvo una inmunoreacción muy pobre, por lo que las condiciones óptimas fueron: anticuerpo anti-GABA, dilución 1:300, 1:400 y 1:500; anticuerpo secundario 1:20, con las cuales se obtuvieron los resultados que se describen a continuación.

Localización Citoquímica de la Acetilcolinesterasa (artículo IV):

Se utilizaron crestas ampulares de los cuyes perfundidos y fijados de la misma manera que para la inmunocitoquímica. El método seguido fue el Hoelle, modificado por Páramos (artículo IV). Las crestas ampulares se sumergieron "in toto" en el medio de reacción por 24 hrs. y posteriormente se reveló la

reaccion sumergiendo las crestas ampulares en sulfuro de sodio 40 mM, pH 7.8. (el tejido coloca en un portaobjetos el cual tiene adherido un anillo de incubacion con capacidad de 0.2 ml) bajo el microscopio estereoscópico. El medio de reaccion contiene: 4 mM acetiltiocolina (sustrato), 10 mM de glicina y 2 mM de sulfato de cobre en amortiguador de acetato 50 mM, pH 5.0. Se adiciono ademas etopropazina, para inhibir a las colinesterasas inespecificas. Se para la reaccion por dilucion, sumergiendo las crestas ampulares (que se tñieron de color ambar) en amortiguador de cacodilatos 0.1M, pH 7.4. Posteriormente se deshidratan e incluyen en parafina y se cortan a 3 micras para su observacion.

VII RESULTADOS Y DISCUSION

ENFOQUE BIQUIMICO-EVOLUTIVO

Actividad de la GAI en el vestibulo de las cuatro especies de vertebrados.

La tabla 1 del articulo (1), nos muestra la actividad de la GAI en homogeneizados de vestibulo de rana, cuy, rata y pollo, con aproximadamente el mismo orden de magnitud. La actividad enzimatica mas baja se encontro en el vestibulo completo de la rana (3.76 nmoles / mg proteina / hr) mientras que la mas alta se encontro en el pollo (27.78 nmoles / mg Proteina / hr). La GAI en el vestibulo de la rata y el cuy muestran valores intermedios (10.38 y 21.60 nmoles / hr / mg proteina). Estos datos estan en el mismo rango de la GAI reportada en el sistema nervioso central y la retina de estos cuatro vertebrados (98) (Sugden and Newsholme (1977) ref 32, art. 1) .

La actividad de la GAI esta presente en las cuatro especies de animales estudiadas y en general sus actividades especificas son del mismo orden de magnitud (en el intervalo nanomolar) que sus enzimas homólogas en el tejido nervioso y la retina. La actividad de la GAI en el vestibulo fue mas baja en la rana y la mayor actividad se encontro en el pollo. Los valores intermedios se encontraron en el cuy y la rata. Aunque sus valores corresponden a una relación de 9:1 de la mayor actividad a la menor, se puede decir que la actividad de la GAI no difiere considerablemente de una especie a otra (por encontrarse en el intervalo nanomolar). Estos hallazgos concuerdan con reportes de la GAI en tejido nervioso y retina de diferentes especies de vertebrados. Mas aun las actividades de la GAI en la retina entre las especies es

de la misma magnitud (98).

Actividad de la CAT en el vestibulo de las cuatro especies de vertebrados estudiada.

La tabla 2 del articulo (I) nos muestra que la actividad de la CAT esta presente en el vestibulo completo de las cuatro especies de animales estudiados .La CAT en la rana mostr6 la m6s baja actividad (9.44 nmoles /min / mg de proteina) y la m6s alta se encontr6 en el vestibulo del pollo (970 nmoles / min / mg proteina) con valores intermedios en cuyes y ratas (450 y 720 pmoles /min /mg de proteina respectivamente) . La misma tendencia se observa al comparar estas actividades con las de la retina, y el sistema nervioso, esto es las actividades m6s bajas de la CAT fueron las de la rana .

Al igual que la actividad de la G6P, CAT en el vestibulo fue tambien la menor en la rana y mayor en el pollo, la relaci6n fue de 100:1 de la m6s alta a la m6s baja: la segunda m6s alta fue la de la rata difiriendo 80 : 1 del valor m6s bajo. El valor intermedio (en el cuy) difiere 1 :150 de la rana. Estos resultados sugieren una diversidad en las especies de la actividad de la CAT, aunque se puede observar una cierta tendencia filogenetica. Este hallazgo concuerda con otros en los cuales existen variaciones de la actividad de la CAT en el tejido nervioso dentro de los vertebrados estudiados la cual fue de aproximadamente 50 veces (Ref. 32 articulo I) y en la retina en donde la actividad de la CAT vari6 cerca de 30 veces(Ref. 15 articulo II), en ambos casos los peces tienen el valor m6s alto y los anfibios el valor m6s bajo .

Con estos resultados se puede proponer una correlaci6n

evolutiva entre algunos rasgos estructurales del vestibulo y nuestros hallazgos bioquimicos. A este respecto, se pudiera pensar que en la filogenia de los vertebrados, el epitelio sensorial de la macula del utriculo y el saculo y la cresta ampular del laberinto revela una extraordinaria permanencia (por ejemplo la presencia de la célula pilosa tipo II y los contactos sinápticos en todos los vertebrados) así como varias transformaciones en la evolución (la aparición de la célula pilosa tipo I y su inervación en animales terrestres). La presencia del sistema del GABA en todos los grupos estudiados es un ejemplo de esta permanencia, por lo que el GABA puede postularse como un neurotransmisor en la célula pilosa tipo II. El incremento de la actividad de la GAD⁶⁷ observada de la rana hacia animales terrestres puede ser atribuida a la adquisición de un nuevo tipo de célula receptora la cual utiliza también GABA para comunicarse con su terminal nerviosa aferente (en la célula tipo I). Los resultados de la ubicación del sistema del GABA por inmunocitoquímica, descritos en los trabajos II y III y por Usami y colaboradores en el pollo (152,153) confirman esta suposición.

Por otro lado, las diferencias cuantitativas de la CAT entre la rana y los vertebrados superiores pudiera deberse a un notable incremento en los contactos sinápticos (sobre las células pilosas tipo I y II), a una elevación en el contenido de CAT en los contactos eferentes de la célula pilosa tipo II o a un neurotransmisor diferente utilizado por la sinápsis eferente sobre la célula pilosa tipo I. En este respecto se ha descrito recientemente la existencia de

botones aferentes que contactan a los cálices que inervan a las células pilosas tipo I, que poseen inmunoreactividad positiva al GGRF (145) .

Los datos presentados en este trabajo muestran que nuestros hallazgos bioquímicos se pueden correlacionar con hallazgos anatómicos y fisiológicos del sistema vestibular de los vertebrados, haciendo posible extrapolar los resultados de varios modelos experimentales de vertebrados para entender la función vestibular en humanos y algunas de sus disfunciones .

Las evidencias bioquímicas reunidas en este trabajo y los anteriores tanto para el GABA como para la CAI (86,87,99,100,104-112) podrían tomarse como indicio de que estos dos neurotransmisores estén actuando como tales en el vestíbulo de los vertebrados .

A pesar de que los experimentos descritos anteriormente apoyan la postulación del GABA y la Ach como neurotransmisores vestibulares, no nos permiten señalar a la población celular en la que están funcionando por lo que para tratar de averiguar más directamente la ubicación celular de los sistemas relacionados con estos neurotransmisores se utilizó el enfoque por inmunocitoquímica.

NOTA Aclaratoria: en la página 377 en la segunda columna, debajo de la tabla 2, del renglón 2 al 8. However... del Artículo I , debió omitirse pero apareció impreso, ya que los valores no corresponden a los que se describen en la tabla II. Como puede verse más adelante no afectan de ninguna manera la discusión, ni las conclusiones .

ENFOQUE INMUNOCITOQUIMICO

Localización inmunocitoquímica del GABA (Artículo II).

Utilizando anticuerpos anti-GABA en el sistema vestibular del cuy se pudo demostrar que existe inmunoreactividad parecida al GABA (GABA-LIK) localizada en el citoplasma de las células pilosas tipo I y II y en algunas fibras mielinizadas en el estroma subyacente (Fig 1A ,del Artículo II). No se encontró inmunoreactividad cuando la técnica inmunocitoquímica fue llevada a cabo utilizando el anticuerpo anti-GABA preincubado con el antígeno (el conjugado de GABA-albumina sérica bovina) (Fig 1B, del Artículo II), o cuando se incubó con PBS en lugar del anticuerpo. Adicionalmente la preincubación con GABA solo a una concentración final de 10 mM no produjo decremento alguno en la especificidad de la inmunotinción (cabe señalar que los anticuerpos contra GABA fueron producidos inyectando un conjugado de GABA-albumina acoplados con glutaraldehído, por lo que no se esperaba un bloqueo de la reacción al incubar el amino ácido con el anticuerpo). Todo lo anterior corrobora la especificidad de la reacción a GABA-LIK. Las células pilosas tipo I y II presentaron distintas intensidades de GABA-LIK : las últimas fueron intensamente inmunoreactivas y su tinción no varió con la localización de las células en la cresta ampular (CA), mientras que las primeras mostraron diferentes grados de inmunoreactividad : algunas aparecieron intensamente teñidas, otras moderadamente y otras no se tiñeron (Fig. 2, Artículo II).

Esta distribución se observó principalmente en la

porción superior de la cresta ampular. La porción infero-lateral mostro un patron de inmunorreactividad intenso para ambos tipos de células pilosas. Algunas fibras nerviosas que llegan al epitelio tambien fueron inmunorreactivas (Fig 3A , articulo II) . Estas fibras, cuando se observan a mayor aumento corresponden a las terminales aferentes caliciformes que hacen contacto con las células pilosas tipo I (Fig 3B articulo II) . En la porción superior de la cresta ampular, la GABA-LIK en el caliz aferente presento, como las células pilosas tipo I, diversos grados de inmunorreactividad i.e. de intensas a ausentes (Fig 3 articulo II) . En la region basolateral, la tinción de fibras nerviosas en el caliz y en el estroma fue constante e intensa. Al realizar la inmunocitoquímica en cortes histológicos de la pared lateral del utrículo, se observo el mismo patron de inmunorreactividad que presenta la cresta ampular (Fig 10) . Finalmente cabe señalar que en ningun caso se encontro inmunorreactividad en las células de soporte .

El presente articulo es el primero en la literatura que estudia la distribución del GABA en el vestibulo con la técnica inmunocitoquímica de post-inclusión , los anticuerpos anti-GABA (cuyas pruebas de especificidad fueron realizadas por su donador, el Dr. Robert Wenthold) hacen suponer, que el precipitado que indica GABA-LIK pone en evidencia , razonablemente, la presencia de GABA, por lo que puede descartarse cualquier tipo de reactividad cruzada. Por otro lado se utilizaron bajas concentraciones de glutaraldehido (0.2%) y se llevaron a cabo controles negativos, lo cual elimino la tinción específica en la cresta ampular (Fig 1B Articulo II)



Figura 15. Corte transversal de la macula del utrículo del vestíbulo del cuy, mostrando GABA-LIR, en las células pilosas I y II (flechas) y en las fibras nerviosas (cabezas de flecha). Se observa ausencia de GABA-LIR (flechas cruzadas) en las células de soporte. Iluminación con la técnica de Nomarski (X 400).

mientras que la preincubación de GABA 10 mM no tuvo efecto sobre la especificidad de la inmunotinción (resultados no mostrados). De igual manera, como control positivo se realizaron experimentos en la corteza cerebelosa, en donde ya se ha reportado existen neuronas GABAérgicas (los resultados no se muestran). Aunque estas pruebas sugieren que otros aminoácidos relacionados estructuralmente no son reconocidos por el anticuerpo, no se podría descartar una reacción cruzada con otros componentes similares en estructura con el GABA como la β -alanina, el ácido glutámico o la glutamina .

Se encontró GABA-LIK en el citoplasma de las células pilosas tipo I y II, en las fibras nerviosas que atraviesan el estroma y en los calices aferentes que envuelven a las células pilosas. Sin embargo se encontraron diferentes patrones de inmunotinción : en las células pilosas tipo II este fue homogéneo, mientras que las células pilosas tipo I mostraron variaciones en la intensidad del material inmunorreactivo, lo que permitió clasificarlas tentativamente en tres grupos : a) fuertemente inmunorreactivas b) moderadamente inmunorreactivas y c) no inmunorreactivas . En el caso de las fibras nerviosas, aunque a bajo aumento el patrón fue homogéneo; sin embargo, a mayor amplificación se aplica la misma clasificación : a) calices fuertemente inmunorreactivos (b) moderadamente reactivos y c) ausencia de inmunorreactividad. De acuerdo a esto existen tres tipos de situaciones: GABA-LIK en ambos tipos de células I y II , pero no en el cáliz ; GABA en las células tipo I y su cáliz aferente y GABA-LIK en el cáliz pero no en las células.

La Presencia de GABA-LIK en las células pilosas tipo I y II excepto por algunas tipo I en la porción superior de la cresta ampular y algunos cálices confirman los hallazgos recientes por inmunocitoquímica de GABA y GAD en las células pilosas tipo I y II. en las crestas ampulares del pollo.

Aunque estos resultados sugieren un papel importante del GABA en el vestibulo, no nos proporcionan una evidencia directa del significado fisiológico y por lo tanto solo se puede especular. GABA-LIK moderada a intensamente positivo en la célula pilosa I y II como se ha demostrado en el pollo concuerda perfectamente con interpretaciones indirectas que sugieren que el GABA es el neurotransmisor aferente en el vestibulo de los vertebrados. A este respecto, se ha demostrado que existen diferencias en los patrones de GABA-LIK en la retina del gato a nivel de la capa de células amacrinas, en las cuales existen diferentes intensidades de inmunotinción, que van de moderadas a fuertemente inmunoreactivas, sugiriendo variaciones en la cantidad de material inmunopositivo al GABA (ref 16 art II). La presencia de GABA-LIK en los cálices aferentes haciendo contacto con una célula pilosa positiva a GABA, puede sugerir que como en el pollo, el GABA es sintetizado en la célula pilosa, liberado de ella y degradado en el cáliz por la GABA-transaminasa (GABA-T) para terminar su acción. En el caso de GABA-LIK solo en los cálices aferentes, existe un artículo reciente que demuestra inmunotinción en todos los cálices pero no en las células pilosas (ref 1 art. II). Aunque los autores de este trabajo postulaban un papel

metabólico o modulador del GABA, que faltaría demostrar, se podrían atribuir estas diferencias en los resultados a que se utilizaron diferentes técnicas y diferente fuente de anticuerpos. A este respecto sería útil que todos los estudios se hicieran con las mismas técnicas y en la misma especie de animales .

Las fibras vestibulares aferentes pueden clasificarse en tres tipos de acuerdo a sus terminales periféricas y características funcionales : (1) fibras que forman terminales en forma de caliz en la parte central del epitelio . Estas muestran una descarga espontánea e irregular y adaptación a una estimulación sostenida . (2) Fibras que forman terminales en forma de botón en la porción periférica del epitelio . Su descarga en reposo es regular y no muestran adaptación y (3) Fibras dimórficas que forman terminales de calices y botones las cuales se encuentran distribuidas en todo el epitelio . Su descarga en reposo es regular o irregular, dependiendo respectivamente de su localización en el epitelio (11) .

Las células pilosas tipo 1 inmunorreactivas en la cresta ampular del oído en la porción lateral y superior, mostraron inmunoreactividad . Por lo que se podría pensar que el GABA influencia a las fibras tipo (1) y (2) consistentemente con esta interpretación la aplicación de GABA iontoforéticamente en el vestibulo del gato afecta principalmente a las fibras tipo tipo (1) y (2) .

Microscopia Electronica

Si bien los resultados a nivel de microscopia de luz son concluyentes en cuanto a la localización del GABA en las células

pilosas y los calices nerviosos aferentes . una probable localización de GABA-LiH en los botones aferentes que contactan a las células pilosas tipo II y las eferentes en ambas células no se pueden visualizar a este nivel. Por tanto, se hizo necesario estudiar la distribución inmunocitoquímica del GABA a nivel ultraestructural, para lo cual se llevó a cabo la técnica inmunocitoquímica indirecta utilizando un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con partículas de oro coloidal de 15 nanómetros de diámetro . Al observar las preparaciones al microscopio electrónico se encontraron los siguientes resultados :

Se observó GABA-LiH en el citoplasma de las células pilosas tipo I y II (Fig 16 y 17), en los calices nerviosos aferentes (Fig 15) y fibras nerviosas que atraviesan el epitelio (Fig 18). En los botones aferentes a las células pilosas tipo II se encontró una densidad de partículas muy pequeña (Fig 17). No se encontró GABA-LiH ni en las células de soporte, ni en los botones eferentes (Fig 19). Al igual que por microscopía óptica, tampoco se encontró GABA-LiH, cuando se preincubó el anticuerpo con su antígeno y cuando el anticuerpo anti-GABA se sustituyó por amortiguador de solución salina y fosfatos (PBS) en la reacción inmunocitoquímica (resultados no mostrados).

Por los resultados obtenidos en microscopía electrónica, se puede decir que la distribución de GABA-LiH fue similar a los obtenidos por microscopía óptica. Ahora se debe hacer la siguiente consideración : si bien los dos métodos fueron realizados por la técnica de tinción indirecta en resina, la reacción inmunocitoquímica fue diferente, ya que para

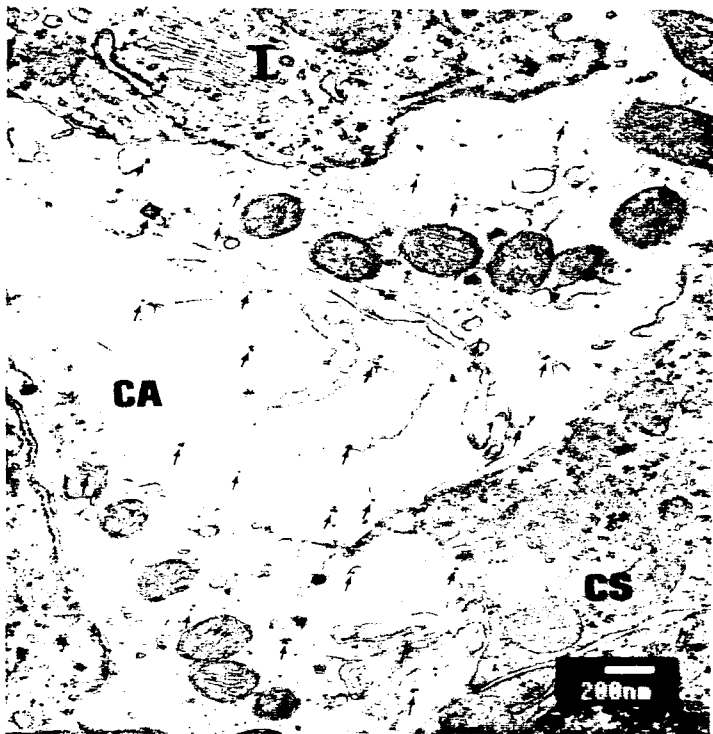


Figura 16. Porción basal de una célula pilosa tipo I (I) con su caliz adyacente (CA), en la cual se muestra una alta densidad de partículas de oro (GABA-LIR fuertemente reactiva). Dilución del anticuerpo anti-GABA 1: 400, dilución del suero secundario 1: 20. Las flechas señalan a las partículas de oro. CS = célula de soporte.



Figura 17. Corte transversal de la cresta ampular del canal semicircular posterior de cuy. mostrando GABA-LIF en la porción basal de una célula pilosa tipo II (II), se observan también dos botones aferentes (ba) haciendo sinapsis con ella (las flechas señalan las partículas de oro). En la parte inferior de la fotografía se observa una célula de soporte (CS). Barra sináptica (bs). Dilución del anticuerpo anti-GABA 1:500, dilución del anticuerpo secundario 1:10.

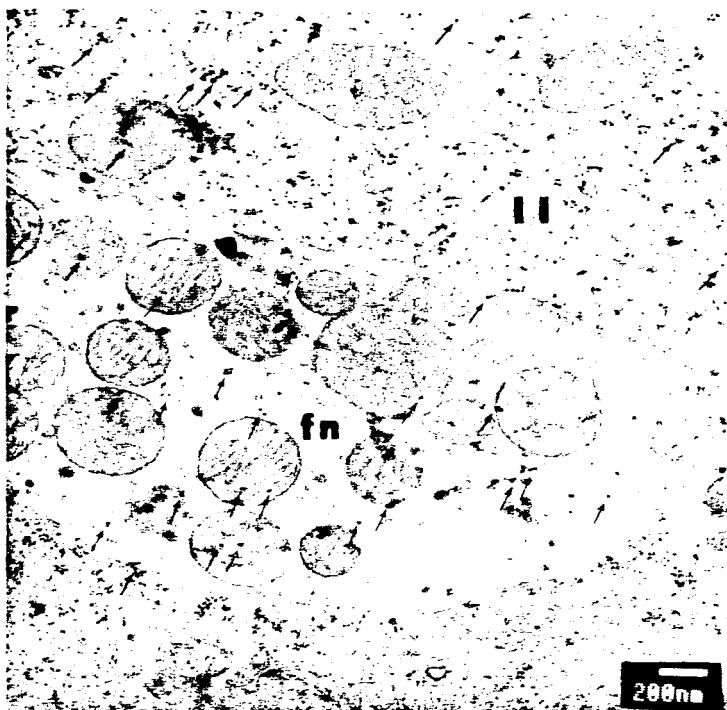


Figura 16. Fibra nerviosa (fn) que va hacia el epitelio en el cual se puede observar una alta densidad de partículas de oro coloidal (señaladas con flechas). Dilución del anticuerpo anti-GABA. 1:500. dilución del anticuerpo secundario 1:20.

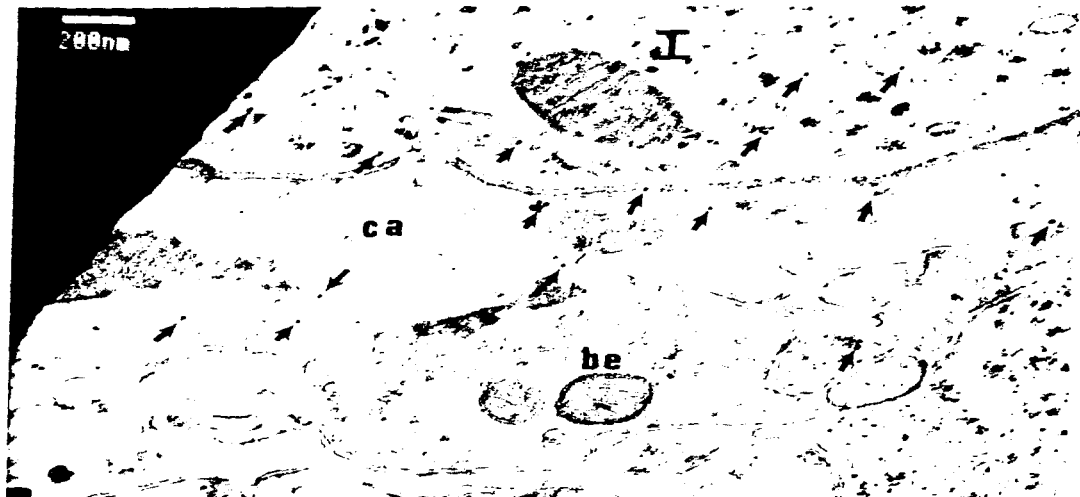


Figura 19. Porción basal de una célula pilosa tipo I (I), con su cáliz aferente (ca) mostrando GABA-LIR, y un botón eferente (be), sin inmunoreactividad. Dilución del anticuerpo anti-GABA 1:400, anticuerpo secundario 1:20.

microscopía óptica se utilizó la técnica de la avidina-biotina-peroxidasa y para microscopía electrónica se utilizó el método directo del anticuerpo marcado con oro coloidal. el cual se ha visto que permite detectar zonas de inmunoreactividad, que no se observan con los métodos de la peroxidasa. Esto podría explicar la presencia de algunas partículas de oro coloidal en las células de soporte. Asimismo la inmunoreactividad positiva fue constante en las células pilosas I y II, en las fibras nerviosas y en los cálices aferentes. Una observación importante es que no se encontró GABA-LIR en los botones eferentes que contactan a los cálices aferentes que inervan a las células pilosas tipo I, por lo que se descarta la participación del GABA como neurotransmisor eferente. La débil inmunoreactividad (densidad de partículas de oro coloidal) en los botones aferentes que contactan a las células pilosas tipo II nos indican que probablemente parte del GABA es captado en estas terminales para posteriormente ser inactivado. Finalmente una cuantificación del material inmunoreactivo nos permitiría llevar a cabo una clasificación de las diferentes poblaciones celulares similar a la encontrada por microscopía electrónica.

Localización inmunocitoquímica de la GAD y de la GABA-T (Artículo III).

Utilizando anticuerpos contra la enzima de síntesis del GABA (la GAD) y anticuerpos contra la GABA-T la enzima de degradación de este aminoácido con la técnica inmunocitoquímica indirecta por los métodos de

Pre-inclusión (en tejido fijado y congelado) y de tejido incluido en Parafina-paraplast, se obtuvieron los siguientes resultados :

Se encontró inmunoreactividad positiva a la GAD (GAD-LIR) en el citoplasma de las células pilosas tipo I y II en el epitelio sensorial de las crestas ampulares del cuy (Fig. 1 artículo III). Este patrón de inmunotinción fue uniforme en todo el epitelio , además no se encontró inmunoreactividad ni en las células de soporte ni en las fibras nerviosas que lo inervan. Con objeto de localizar la posible existencia de células con inmunoreactividad positiva a la GAD en los cuerpos celulares en el ganglio vestibular se llevo a cabo la inmunotinción de igual manera que en las crestas ampulares . No se encontró GAD-LIR en ninguna zona del ganglio vestibular (Fig 2 artículo III).

Estos hallazgos son consistentes con los descritos recientemente por Usami y col. en el pollo (153). El hecho de que la GAD este confinada al citoplasma de las células pilosas y ausente de otras estructuras, sugiere que el GABA es sintetizado e inmediatamente en las células sensoriales. Este estudio corrobora nuestros hallazgos bioquímicos (94, 97, 98, 110, 112) e inmunohistoquímicos (artículo III) los cuales sugieren que la actividad enzimática de la GAD se encontraba en las células pilosas del epitelio sensorial vestibular .

En relación a la enzima que metaboliza al GABA, la GABA-T, encontramos inmunoreactividad positiva en los calices nerviosos que inervan a las células pilosas tipo I (Fig 1a y b) algunas fibras nerviosas que llegan al

epitelio y ocasionalmente en algunas células pilosas, no encontrando inmunoreactividad positiva en las células de soporte (Fig 2B) .

También se estudio la distribución de GABA-1-LIR en las células del ganglio vestibular, siendo positiva en la mayor parte de los somas de las células que lo conforman (Fig 3B).

La intensidad de la GABA-1-LIR fue muy similar a la encontrada en el cuy con anticuerpos anti-GABA (artículo II), y la reportada en el pollo (153), con la diferencia de que algunas células pilosas tipo I en el cuy presentaron inmunoreactividad positiva (lo que no se encontró en el Pollo) (Fig 2A artículo III). Esta diferencia era de esperarse ya que en el caso del sistema GABAérgico , la liberación del GABA por la terminal nerviosa es seguida por una inactivación rápida del transmisor por un sistema activo de recaptación. En el sistema nervioso, el GABA en el espacio sináptico puede ser captado por tres sitios morfológicamente distintos: (a) la célula presináptica (la célula pilosa en este caso) (b) la neurona postsináptica (el cáliz nervioso que envuelve a las células pilosas tipo I y las terminales nerviosas aferentes que contactan a las células pilosas tipo II) y (c) las células gliales. Ya que en el vestibulo ha sido descrito un sistema activo de captación para el GABA (104), esto podría explicar la distribución de la GABA-1-LIR positiva en el sistema vestibular del cuy . Esto es, la liberación del GABA por la célula pilosa y su subsecuente unión a su receptor debe ser seguida por un sistema inactivante (un sistema

de captación activo) y entonces ser metabolizado por la acción de la GABA-T presente en la célula pilosa y/o el caliz nervioso. La inmunoreactividad positiva en las células ganglionares vestibulares, indican que la neurona primaria aferente contiene GABA-T y sería el origen de la encontrada en la terminal dendrítica (cáliz aferente). Dicha localización es compatible con el papel de esta como la enzima que degrada al GABA (Fig 20) .

En conclusión estos hallazgos inmunocitoquímicos (artículo II y III) sugieren que el GABA es sintetizado en el citoplasma de las células pilosas las que en respuesta a un estímulo lo liberan y después de actuar sobre su receptor es captado por la terminal aferente y catabolizado en esta, las fibras aferentes y las células ganglionares (Fig 20) .

Por lo tanto, la existencia de GABA-LIR, GAD-LIR y GABA-T-LIR con la distribución descrita corroboran nuestros hallazgos bioquímicos y apoyan la participación del GABA como el neurotransmisor aferente en el sistema vestibular si bien sería necesaria la localización y caracterización de los receptores a GABA en este sistema, por ensayos fármaco-bioquímicos e inmunocitoquímicos .

Localización celular de la enzima de síntesis de la acetilcolina (la colin acetiltransferasa, CAT) y de su enzima de inactivación/degradación (la acetilcolinesterasa ,AChE) (Artículo IV) .

Se estudió la localización celular de la CAT, utilizando anticuerpos policlonales contra esta enzima ,

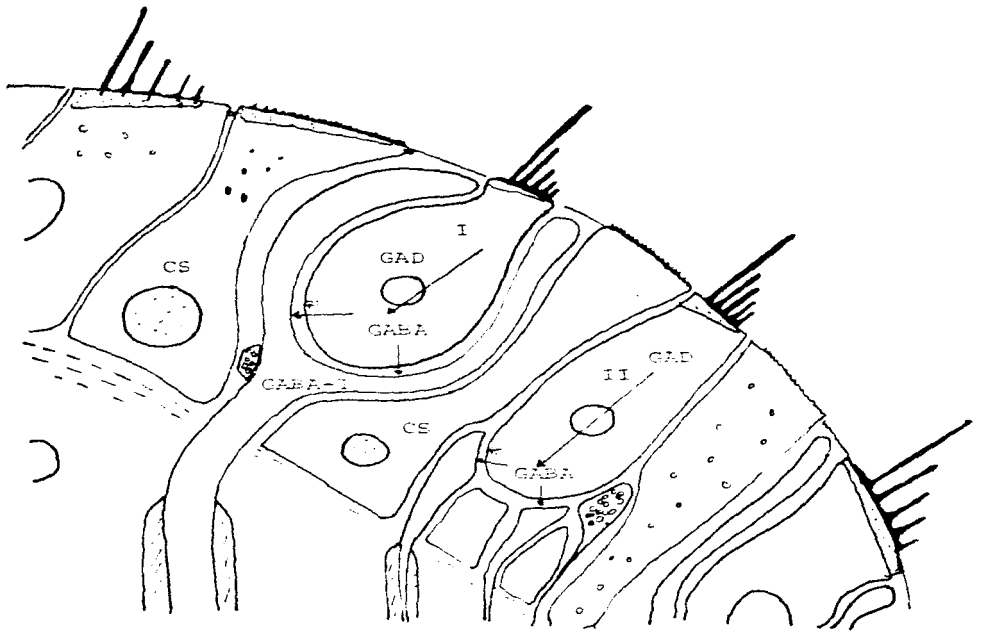


Figura 20 Sistema del GABA en el vestibulo del cuy. El GABA se sintetiza por la GAD en la célula pilosa. una vez que es liberado y completada su función es degradado por la GABA-T contenida en la terminal nerviosa aferente.

con la técnica de inmunocitoquímica indirecta , con tejido fijado y congelado. o tejido fijado e incluido en Parafina-faraplást. y los resultados fueron los siguientes :

Se encontro inmunoreactividad positiva a la CAI (CAI-LIK) principalmente en la base de las células pilosas de la macula del utrículo (Fig 1A Artículo IV) y ocasionalmente en algunas fibras nerviosas delgadas que lo inervan .A mayor ampliación se ve que esta inmunoreactividad aparece en forma de botones (eferentes)colocados en la porción basal de los calices nerviosos que envuelven a las células pilosas tipo I. (fig. 1B y 2 Artículo IV). No se encontro CAI-LIK positiva cuando se llevo a cabo la inmunotinción incubado con suero preimmune en lugar del anticuerpo contra la CAI (Fig 3 artículo IV). Estos hallazgos corroboran los hallazgos bioquímicos, previamente reportados por nuestro laboratorio en relación a la probable localización de la CAI (86,87,99,110,112). además de ser los primeros en la literatura que reportan la localización de la CAI "in situ" por técnicas inmunocitoquímicas en el sistema vestibular .

En relación a la distribución de la AchE con la técnica histoquímica, se encontro el producto de la reacción en la base de las células pilosas del epitelio sensorial (entre las células de soporte y las células pilosas)(fig 4A y B. Artículo IV) y en algunas fibras nerviosas que inervan al epitelio sensorial en las crestas ampulares .

Los resultados de este estudio nos muestran una CAI-LIK positiva en el sistema eferente en el aparato vestibular del Cuv. Ya que la CAI es un marcador específico para neuronas

colinérgicas estos hallazgos son una fuerte evidencia de que la acetilcolina es un transmisor eferente en este sistema.

La distribución e intensidad de la AChE en el sistema vestibular, corrobora previos hallazgos en los cuales se ha demostrado actividad de la AChE en otras especies, (67, 88, 90) aunque en nuestro trabajo se puede ver claramente que la distribución e intensidad de esta enzima es diferente comparándola con la inmunoreactividad de la CAT. Esta última aparece principalmente concentrada en forma de botones (eferentes) colocados en la porción basal de los cálices nerviosos que envuelven a las células pilosas tipo I y muy escasamente en las células pilosas tipo II, mientras que la actividad de la AChE aparece en la base de las células pilosas en todo el epitelio. Esto era de esperarse ya que la AChE no solo se encuentra en las células y terminales colinérgicas, sino que también se encuentra en las células colinoceptivas por lo que no es un marcador muy confiable para neuronas colinérgicas, aunque se demuestra que la AChE en este sistema este probablemente degradando a la Ach y también se ha demostrado que esta enzima tiene actividad de peptidasa (32,33), con lo que se podría explicar la dificultad para demostrar neuropéptidos en el sistema vestibular (125).

Por otro lado la distribución de la CAT y de la AChE en el epitelio sensorial vestibular del cuy corresponde a la disposición (localización) de las fibras y botones eferentes, las cuales han sido estudiadas a nivel ultraestructural y por ejemplo, estas fibras

atravesaran al epitelio sensorial, formando lo que se denomina "conexiones en passant") (88). Esta podría ser la razón por la cual es mucho más frecuente la aparición de botones CAI-LIR positivos y la escasez de fibras nerviosas positivas tanto a la CAI como a la AChE (Fig 21) .

En conclusión nuestros hallazgos de CAI-LIR positiva en el sistema eferente del oído corroboran los hallazgos bioquímicos descritos en relación a la existencia de terminales eferentes de naturaleza colinérgica . Si bien sería necesario estudiar más detalladamente estos botones por microscopía electrónica y la posible coexistencia de este neurotransmisor con algunos otros (GHRF u otros péptidos).

En cuanto a su fisiología , faltaría un estudio farmacológico tendiente a la clasificación del tipo de receptor colinérgico involucrado .

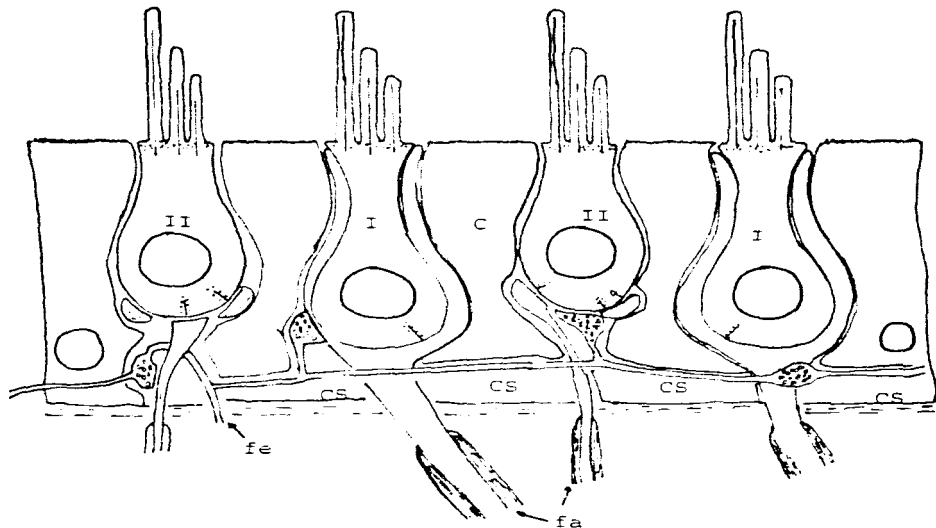


Figura 21 .Sistema de la acetilcolina. La acetilcolina es sintetizada en las terminales nerviosas eferentes por la CAT(en rojo se muestra la inmunoreactividad positiva a la CAT localizada en los botones eferentes) y una vez liberada, esta se una a su(s) receptor(es) e inmediatamente es degradada por la AChE (en azul se muestra la actividad de la AChE).

- I = célula pilosa tipo I .
- II = célula pilosa tipo II .
- C = calic nervioso aferente .
- CS = célula de soporte .
- fa = fibra nerviosa aferente .
- fe = fibra nerviosa eferente .

VIII CONCLUSIONES

Con el proposito de aportar evidencias en favor del GABA y la acetilcolina, como neurotransmisores en el vestibulo se investigaron algunos parametros relativos a ellos utilizando dos tipos de enfoques: el enfoque bioquimico-evolutivo y el enfoque inmunocitoquimico.

Con el primero se intento encontrar una correlacion bioquimica entre la constancia de las celulas pilosas tipo II, sus terminales nerviosas en todos los vertebrados, la aparicion de la celula pilosa tipo I y sus contactos sinapticos en los vertebrados terrestres con la presencia y magnitud de la GAD y la CAT enzimas de sintesis del GABA y la acetilcolina en cuatro especies de vertebrados (rana, rata, cuy y pollo).

Se encontro actividad especifica para la GAD y la CAT en homogeneizados de vestibulo de las cuatro especies. Las actividades mas bajas correspondieron a la rana, mientras que para los otros tres vertebrados fueron de aproximadamente del mismo orden de magnitud. Cuando se compararon estas actividades con sus enzimas homologas en la retina y el sistema nervioso se encontro que eran del mismo rango que las del vestibulo.

El incremento de la actividad de la GAD en las especies terrestres se puede atribuir a la aparicion de la celula pilosa tipo I y el incremento de la actividad de la CAT en estas especies puede atribuirse a la presencia de un mayor numero de botones eferentes de probable naturaleza colinergica.

Estos experimentos muestran que la constancia del vestibulo y su tendencia evolutiva en los vertebrados puede estudiarse bioquimicamente con modelos animales, con la ventaja de poder

atravesar hasta resultar en una respuesta de tipo excitatorio.
Respecto al punto II:

En el estudio de la actividad bioquímica de las células tanto del sistema del nervio como del sistema ganglionar se utilizó con técnicas inmunocitoquímicas y citoquímicas utilizando como modelo el vestibulo del cuy.

Para el GABA se encontró inmunorreactividad específica localizada en el citoplasma de las células pilosas tipo I y II, en algunas fibras nerviosas gruesas que llegan al epitelio, incluyendo el caliz nervioso aferente que envuelve a las células pilosas. Se demostró también que existe inmunorreactividad positiva a la GAD exclusivamente localizada en el citoplasma de las células pilosas. La inmunorreactividad para la GABA-T mostro un patron similar a la del GABA, encontrandose en el caliz nervioso aferente que envuelve a las células pilosas tipo I, en algunas fibras nerviosas que atraviezan el estroma y en las células del ganglio vestibular.

Con estos resultados se puede concluir que el GABA es sintetizado por las células pilosas las que en respuesta a un estímulo lo liberan y despues de actuar sobre su receptor es captado por la terminal aferente y las células ganglionares para ser inactivado, lo que apoya fuertemente al GABA como el neurotransmisor aferente en el vestibulo.

Para la acetilcolina se demostró que la CAI se encuentra localizada en los botones aferentes que contactan a las células pilosas tipo II y a las fibras aferentes que envuelven a las células tipo I. Adicionalmente se demostró la presencia de la AChE con una distribución similar a la de la CAI. Estos resultados

una fibra que la acetilcolina es sintetizada en las terminales eferentes por la enzima acetilcolina acetiltransferasa para actuar sobre su receptor en la placa motora y, por ende, es liberada por la fibra.

Con estos dos enfoques se puede estudiar la existencia de un sistema gábergico y un sistema colinérgico en el vestibulo, en el cual el GABA es el neurotransmisor aferente y la acetilcolina el neurotransmisor eferente .

IX REFERENCIAS

- 1.- Adams, J.L., Mroz, E.A. and Sewel, W.F. (1987) A possible neurotransmitter role for CGRP in a hair cell sensory organ. *Brain Res.*, 536, 419:347-351 .
- 2.- Altschuler, R. A., Parakkal, M.H., Rubio, J.A., Hoffman, D.W. and Fex, J. (1984) Enkephalin like immunoreactivity in the guinea pig organ of Corti : Ultrastructural and lesion studies. *Hearing Res.*, 16: 17-31.
- 3.- Altschuler, R. A., Parakkal, M.H. and Eckenstein, F. (1984) Co-localization of enkephalin like and choline acetyltransferase immunoreactivities in olivocochlear neurons of the guinea pig. *J. Histochem. Cytochem.* : 32,839-843.
- 4.- Altschuler, R. A., Wenthold, R.J. , Shwartz, A . M ., Haser, W.G., Lurtoys, N.P and Parakkal., M. H. (1984) Immunocytochemical localization of glutaminase like immunoreactivity in the auditory nerve. *Brain Research.* 291 : 173-178 .
- 5.- Altschuler, R. A., Kachar, B., Rubio, J.A., Parakkal, M.H. and Fex, J. (1985) Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Brain Res.* 338 , 1-11 .
- 6.- Altschuler, R. A. Sheridan C.E., Horn, J., and Wenthold, R. (1989) Immunocytochemical localization of glutamate immunoreactivity in the guinea pig cochlea .*Hearing Research* 42 :

- 7.- Annoni, J. M. , Cochran, S. L. and Frecht, W., (1984) Pharmacology of the vestibular hair cell-afferent fiber synapse in the frog, *J. Neurosci.*, 4 : 2106-2116.
- 8.- Bachelar, H.S. (1981) Biochemistry of centrally active amino acids. In De Feudis F.V. and Mandel, F. (Eds) *Amino acid Neurotransmitters*. New York, Raven Press , 475-495 .
- 9.- Bagger-Sjoberg, D., and Gulley, R. L. (1979) Synaptic structures in the type II hair cell in the vestibular system of the guinea pig. *Acta Otolaryngol. (Stock.)*, 88 : 401-411.
- 10.- Baird, I.L. (1974) Some aspects of the comparative anatomy and evolution of the inner ear in submammalian vertebrates. *Brain Behav Evol* 10, 11-36.
- 11.- Baird, R. A. , Desmadryl, G., Fernandez, C., Goldberg, J.M. (1988) The vestibular nerve of the chinchilla II. Relation between afferent response properties and peripheral innervation patterns in the semicircular canals. *J. Neurophysiol.* 60: 182-203 .
- 12.- Baxter, C.F. (1970) The nature of γ -aminobutyric acid. In *Handbook of Neurochemistry*, Vol 3, Ed Por A. Lajtha. New York Plenum Press. 1970 pp 289-353.

13.- Baxter,C.F.(1976) GABA in Nervous system function (E. Roberts,T.N. Chase and D.B. Tower Eds)Raven Press New York pp 61-87.

14.- Bernard, C., Cochran,S.L. and Frecht,W. (1985) Presynaptic actions of cholinergic agents upon hair cell-afferent fiber synapse in the vestibular labyrinth of the frog. Brain Research 338 : 225-236 .

15.- Bledsoe, S.C., Bobbin,R.P., Thalman, R. and Thalman, I. (1980) Stimulus induced release of endogenous amino acids from skins containing the lateral line organ in Xenopus leavis. Exp. Brain Res.. 40 :97-101.

16.- Bledsoe,S.C., Bobbin,R.P. and Chihal, D.M.(1981) Kainic acid : An evaluation of its action on cochlear potentials. Hearing Res., 4 : 109-120 .

17.- Bledsoe,S.C., Chihal, D.M., Bobbin,R.P. and Morgan, D.N. (1983) Comparative actions of glutamate and related substances on the lateral line of Xenopus leavis. Comp. Biochem. Physiol., 75C : 119-206.

18.- Bledsoe, S.C., Meyer, J.R. and Howland, M.M. (1985) effects of excitatory aminoacid receptor antagonist on synaptic excitation in the lateral line of Xenopus leavis. In Abstracts of the Association for Research in Otolaryngology, Clearwater Beach, Fl., Abs. 8,pp 11.

- 19.- Bledsoe, S.C., Mc Laren, J.D. and Meyer, J.R. (1986) Potassium-induced, calcium dependent release of endogenous aminoacids from the *Xenopus* lateral line. Assoc. Res. Otolaryngol Abs. 9: 89-90.
- 20.- Bobbin, R. F. and Thompson, M.H. (1978) Effects of putative transmitter on afferent cochlear transmission. Annals of Oto-laryngol., 87: 185-190
- 21.- Bobbin, R.F. (1979) Glutamate and aspartate mimic the afferent transmitter in the cochlea. Exp. Brain Res. 34: 389-393.
- 22.- Bobbin R.F. and Morgan, D.N. (1980) Glutamate mimics the afferent transmitter in the *Xenopus leavis* lateral line. In R.J. (ed.), Morphogenesis and malformation of the ear. New York, Alan R. Liss., pp 107-109.
- 23.- Bobbin, R.F., Bledsoe, S.C., Chihal, D.M. and Morgan, D.N. (1981) Comparative actions of glutamate and related substances on the *Xenopus leavis* lateral line. Comp. Biochem. Physiol., 69C 146-147.
- 24.- Bobbin, R.F., Bledsoe, S.C. and Chihal, D.M. (1981) Effects of various excitatory amino acid antagonist of guinea pig cochlear potentials. In Abstracts of the Association for Research in Otolaryngology, St. Petersburg Beach FL., P.P. 27 .

- 25.- Bobbin, R.P., Biedsoe, S.C. and Jenison, G.L. (1984) Neurotransmitter in the cochlea and lateral line organ. In C.Berlin (Ed.) Recent advances in hearing science, San Diego, CA. College-Hill Press. pp 159-180.
- 26.- Bobbin, R.P., Biedsoe, S.C., Winbery, S.L. and Jenison, G.L. (1985) Actions of putative neurotransmitters and other relevant compounds, on *Xenopus leavis* lateral line. In : Auditory Biochemistry, Drescher, D.G. (ed.), Charles, C. Thomas. Springfield, Ill, pp 102-121 .
- 27.- Bosher, S.K. and Warren, R.L. (1978) Very low calcium content endolymph, an extracellular fluid, Nature, 273: 377-378.
- 28.- Brandon, C., Lam D.M.K., Su, Y.Y. and Wu-J-Y. (1980) Immunocytochemical localization of GABA neurons in the rabbit and frog retina . Brain Research Bull 5, supp 2, 21-29 .
- 29.- Bruce, G., Wainer, B.H. and Hersh, L.B. (1985) Immunaffinity purification of human choline acetyltransferase: comparison of the brain and placental enzymes. J. Neurochem. 45: 611-620.
- 30.- Caston, J. and Rousell, H. (1984) Curare and the efferent vestibular system. Acta Otolaryngol. (Stockh.). 97 : 19-26 .
- 31.- Cheney, D.L., Racagni, G. and Costa, E. (1976) Distribution

of acetylcholine and choline acetyltransferase in specific nuclei in tract of rat brain. In A. Goldberg and I. Hanin (Eds). Biology of cholinergic function . Raven Press , New York pp 655-659.

32.- Chubb, I. W., Hodgson, A.J. and White, G. H. (1980) Acetylcholinesterase hydrolyzes substance P. Neuroscience 5 : 2065-2072.

33.- Chubb, I.W., Rainieri, E., White, G.H., and Hodgson, A.J. (1983) The enkephalins are amongs the peptides hydrolysed by purified acetylcholinesterase. Neurscience, 10:1369-1377.

34.- Collins, C.G. (1972) GABA-2-oxoglutarate transaminase, glutamate decarboxilate and the half-life of GABA in different areas of rat brain. Biochem. Pharmacol. 21,2849-2858.

35.- Coro, F.A. y Otazo, A.S. (1982) Fisiologia Celular y de los sistemas de control. Pueblo y Educacion . La Habana Cuba .

36.- Corey, D.P. and Hudspeth, A.J. (1979) Ionic Basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell, Nature, 281,675-677.

37.- Corey, D.P. and Hudspeth, A.J. (1979) Response latency of vertebrate hair cells, Biophys. J. 26,499-506 .

38.- Corey, D.F. and Hudspeth, A.J. (1983) Kinetics of the receptor current in bullfrog saccular hair cells. J. Neursci. 3, 962-976.

- 39.- Cuello, A.C. and Sofroniew M.V. (1984) The anatomy of CNS cholinergic neurons. *Trends in Neurosciences*, 74-78 .
- 40.- Dechesne, C., Raymond, J. and Sans, A. (1984) The action of glutamate in the cat labyrinth. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 93, 163-165.
- 41.- Demémes, D., Raymond, J. and Sans, A. (1983) Selective retrograde labeling of vestibular efferent neurons with ³H-choline. *Neuroscience*, 8, 285-290 .
- 42.- Demémes, D., Wenthold, R.J., Moniot, B. and Sans, A. (1990) Glutamate-like immunoreactivity in the peripheral vestibular system of mammals. *Hearing Res.* 48 : 261-270 .
- 43.- Didier, A., Dupont, J and Cazals, Y. (1990) GABA immunoreactivity of calyceal nerve endings in the guinea pig vestibule. *Cell Tissue Res.* 260 : 415-419 .
- 44.- Drescher, M.J., Drescher, D.G., and Medina, J.E. (1983) Effect of sound stimulation at several levels on concentrations of primary amines, including neurotransmitter candidates, in perilymph of guinea pig inner ear. *J. Neurochem.* 41: 309-320.
- 45.- Drescher, D.G. and Drescher, M.J. (1985) HPLC analysis of presumptive neurotransmitter in perilymph. In *Auditory Biochemistry*.

Drescher, D.G. (ed.). Charles, C. Thomas, Springfield, Ill. pp 50-67 .

46.- Ehrenberger, H., Benke, E. and Felix, D. (1982) Suppressive action of picrotoxin a GABA antagonist on labyrinthine spontaneous nystagmus and vertigo in man. Acta Otolaryngol 93:269-273.

47.- Ekstrom, J. (1978) Acetylcholine synthesis and its dependence on nervous activity. EXPERIENTIA 34, 1247-1253 .

48.- Engstrom, H. (1958) On the double innervation of the sensory epithelia of the inner ear. Acta Otolaryngol (Stockh) 49 : 100-116.

49.- Eybalin, M., Cupo, A. and Pujol, R. (1983) Localisation ultrastructurale des immunoreactions a un anticorps met-enkephaline dans l'organ of Corti. C.R. Acad. Sci (Paris), serie III, 296 : 1125-1128 .

50.- Eybalin, M., Abou-Madi, L., Rossier, J. and Pujol, R. (1985) Electron microscopic localization of N-terminal proenkephalin immunostaining in the guinea pig organ of Corti. Brain Res., 358 :354-359 .

51.- Eybalin, M., Cupo, A. and Pujol, R. (1985) Met-enkephalin-arg⁶-gly⁷-leu⁸ in the organ of Corti : high performance liquid chromatography and immunoelectron microscopy . Brain Res. 215 : 389-395.

52.- Eybalin, M . and Pujol, R.,(1984) A radioautographic study of ^3H -glutamate and ^3H -glutamine uptake in the guinea pig cochlea. Neuroscience, 9 :863-871 .

53.- Fahn, S. (1976) Regional distribution studies of GABA and other putative neurotransmitters and their enzymes En: GABA in Nervous System function(Roberts,E., Chase,N. and Tower D.B. eds) Raven Press New York .

54.- Felix, D. and Ehrenberger, K. (1982) The action of putative neurotransmitter substances in the cat labyrinth., Acta Otolaryngol (Stockh.), 93 :101-105.

55.- Fernandez,C., Baird,R.A., Goldberg,J.M.(1988) The vestibular nerve in the chinchilla I. Peripheral innervation patterns in the horizontal and superior semi-circular canals. J. Neurophysiol 60, 1267-181 .

56.- Felix, J. and Wenthold,R.J.(1976) Choline acetyltransferase, glutamate decarboxylase and thyrosine hydroxylase in the cochlea and cochlear nucleus of the guinea pig. Brain Res.109 : 575-585 .

57.- Felix, J. and Altschuler, R.A. (1981) Enkephalin-like immunoreactivity of olivocochlear nerve fibers in cochlea of guinea pig and rat. Proc.Nat. Acad.Sci (USA). 78 : 1255-1259 .

58.- Felix, J., Altschuler, R. A. Wenthold, J. and Parakkal, M.H. (1982) Aspartate aminotransferase immunoreactivity in cochlea of

guinea pig. Hearing Res., 7 :149-160 .

59.- Fex,J., and Altschuler,K.A.. (1984) Glutamic acid decarboxylase immunoreactivity of olivocochlear neurons in the organ of Corti of guinea pig and rat. Hearing Res., 15:123-131.

60.- Fex,J., Altschuler,K.A., Kachar,B., Wenthold,R.J. and Zempel,J.M..(1986) GABA visualized by immunocytochemistry in the guinea pig cochlea in axons and endorgans of efferent neurons. Brain Research 366 : 106-117 .

61.- Flock,A. (1965) Transducing mechanisms in lateral line canal organ receptor . Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 30 : 133-146 .

62.- Flock,A. (1967) Ultrastructure and function in the lateral line organs. In Lateral line receptors, F. Coch (ed.). Indiana Univ. Press. Bloomington, In pp 163-197 .

63.- Flock, A. and Lam, D. M. K. (1974) Neurotransmitter synthesis in inner ear and lateral line sense organs. Nature (Lond.),247 : 142-144 .

64.- Fornum,F. (1968) The distribution of glutamate decarboxylase and aspartate transaminase in sub cellular fractions of rat and guinea pig brain. Biochem J. 106,401-412.

65.- Furukawa,T. and Ishii,Y.(1967) Neurophysiological studies on hearing in goldfish, J. Neurophysiol. 30 : 1377-1388.

- 66.- Furukawa, T., Ishii, Y., and Matsura, S. (1972) Synaptic delay and time course of the postsynaptic potential at the junction between hair cells and eight nerve fibers in the goldfish. *Jap. J. Physiol.* 22, 617-635 .
- 67.- Gacek, R.R., Nomura, Y. and Balogh, K. (1965) Acetylcholinesterase activity in the efferent fibers of the statoacoustic nerve. *Acta Otolaryngol (Stockh.)*. 59 : 541-553 .
- 68.- Gacek, R. (1974) Morphological aspects of the efferent vestibular system. In *Handbook of sensory Physiology*. H. Kornhuber (ed.) Springer-Verlag, New York Vol 16 pp 213-220.
- 69.- Giacobini, E. (1979) Synaptogenesis: chemistry, structure or function ? which comes first?. In *Neural growth and differentiation* Edited by E. Meisami and M.A Brzier, New York, Raven Press p 153-167.
- 70.- Gil-Loyaga, F., and Farés-Herbute, N. (1989) HPLC detection of dopamine and noradrenaline in the cochlea of adult and developing rats. *Dev. Brain Res*, 48 : 157-160 .
- 71.- Gleissner, L., and Henrikson, N. (1963) Efferent and afferent activity patterns in the vestibular nerve of the frog. *Acta Otolaryngol (stockh.)*. Supp. 2:90-103.
- 72.- Goldberg, J. M., Lysokowski, A., and Fernandez, C. (1990)

Morphophysiological and ultrastructural studies in the mammalian cristae ampullares. *Hering Research*, 89-102.

73.- Gulley, R.L., Fox, J. and Wenthold, R.J. (1979) Uptake of putative neurotransmitters in the organ of Corti. *Acta Otolaryngol* (Stockh.), 88 :177-182.

74.- Guth, P.S., and Norris, C., (1984) Pharmacology of the isolated semicircular canal : effect of GABA and picrotoxin. *Exp. Brain Res.* 56 : 72-78 .

75.- Guth, P.S., Norris, C.H. Guth, S.L. Guine, D.B. and Williams, H. (1986) Cholinomimetics mimic efferent effects on semicircular canal afferent activity in the frog. *Acta Otolaryngol.* (Stockh.), 102 :186-194 . .

76.- Guth, S. L. and Norris, C. H. (1988) Three test of the hypothesis that glutamate is the sensory hair cell transmitter in the frog semicircular canal. *Hear. Res.* 33 : 223-228 .

77.- Higuchi, T., Umekita, S.H. and Obarta, S. (1980) The afferent neurotransmitter in the ampullary electroreceptors: L-glutamate mimics the natural transmitter. *Neurosci. Lett. Suppl.* :4,s7.

78.- Hoffman, D.W., Altschuler, R.A. and Fox, J. (1983) High-performance liquid chromatographic identification of enkephalin-like peptides in the cochlea. *Hering Res.*, 9 : 71-78 .

- 79.- Hoffman , D.W., Zamir, N., Rubio, J.A., Altschuler, R.A. and Fex, J. (1985) Proenkephalin and prodynorphin related neuropeptides in the cochlea. *Hearing Res.*, 17 : 47-50 .
- 80.- Holton, T. and Hudspeth, A.J. (1986) The voltage dependence of hair cell transduction. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 12,778.
- 81.- Howard, J. and Hudspeth, A.J. (1988) Gating compliance associated with gating of mechano-electrical transduction channels in the bullfrog 's saccular hair cell. *Neuron* 1 : 189-199.
- 82.- Hsu, S.M. Raine, L. and Fager, H. (1981) Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem. Cytochem.* 29:577-580 .
- 83.- Hudspeth, A. J. (1985) The cellular basis of hearing, the biophysics of hair cells. *Science*, 230 745-752.
- 84.- Hudspeth, A. J. (1989) How the ear's workswork. *Nature*, 341 : 397-404.
- 85.- Ishii, Y., Matsumura, S. and Furukawa, T. (1971) Quantal nature of transmission at synapse between hair cells at the eight nerve fibers. *Jap. J. Physiol.* 19,79
- 86.- Iturbe, A.G. and Meza, G. (1985) Probable localization of GABA and Ach synthesis in the vestibule of streptomycin-treated guinea pigs. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 11 :696 .

- 87.- Iturbe, A.G. and Meza, G. (1986) Asymmetrical development of GABA and acetylcholine synthesis in guinea pig vestibule. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 4 (suppl 4) s32.
- 88.- Iurato, S., Luciano, L., Pannese, E. and Reale, E. (1972) Efferent vestibular fibers in mammals: morphological and histochemical aspects. *Prog in Brain Res* 37 : 429-443 .
- 89.- Iurato, S., Luciano, L., Pannese, E. and Reale, E. (1971), Acetylcholinesterase activity in the vestibular sensory areas. *Acta Otolaryngol.* 71 :147-152 .
- 90.- Iurato, S., Luciano, L., Pannese, E., and Reale, E. (1971) Histochemical localization of acetylcholinesterase (AChE) activity in the inner ear. *Acta Oto-laryngol., Supp (Stockh.)*, 279:1-50.
- 91.- Jenison, G.L., and Bobbin, R.F. (1985) Quisqualate excites spiral ganglion neurons of the guinea pig. *Hearing Res.*, 20:261-265 .
- 92.- Jenison, G.L., Bobbin, R.F. and Thalman, R.. (1985) Potassium-induced release of endogenous amino acids in the guinea pig cochlea. *J. of Neurochem* 44 : 1845-1853 .
- 93.- Jenison, G.L., Windbery, S. and Bobbin, R.F. (1986) Comparative actions of quisqualate and N-methyl-D-aspartate, excitatory aminoacid agonist, on guinea pig cochlear

potentials. *Comp. Biochem Physiol.*, 84C,385-389 .

94.- Jones, N., Fex, J. and Altschuler, R.A. (1987) Tyrosine hydroxylase identifies possible catecholaminergic fibers in the organ of Corti. *Hearing Research* , 30 : 33-38 .

95.- Klinke, R. and Uertel, W. (1975) Transmitter Physiology of cochlear synapses. *Exp. Brain Res, Suppl* 23,150.

96.- Klinke, R. and Uertel, W. (1977) Evidence that GABA is not the afferent transmitter in the cochlea. *Exp. Brain Res.*, 28:311-314

97.- Klinke, R. (1981) Neurotransmitters in the cochlea and the cochlear nucleus. *Acta Oto-laryngol*(Stockh) 91: 541-554 .

98.- Lam, D.M.K. (1975) Synaptic chemistry of identified cells in the vertebrate retina. *Cold. Spring Harbor, S. U. B.* 60: 571-579 .

99.- López, I., and Meza, G. (1988) Neurochemical evidence for afferent GABAergic and efferent cholinergic neurotransmission in the frog vestibule. *Neuroscience*, 25:13-18.

100.- López, I. and Meza, G. (1989) Some properties of frog vestibular choline acetyltransferase and acetylcholinesterase . *Neurochem. Res.* 14, 113-118 .

101.- Lowenstein, O.E. (1974) Comparative morphology and physiology . In *Handbook of sensory physiology* (Ed by

- 102.- McGeer, P.L., McGeer, E.G. and Hattori, T. (1978) Kainic acid as a tool in neurobiology. In: Kainic acid as a tool in neurobiology. Mc Geer, E.G., Olney, J.W and McGeer, P.L. (Eds). Raven Press, New York, pp. 123-137 .
- 103.- Melamed, B., Norris, C., Bryant, G. and Guth, P. (1982) Amino acid content of guinea pig perilymp collected under conditions of quiet or sound stimulation. Hearing Res., 7, 13-18 .
- 104.- Meza, G., Hernández, C. and Ruiz, M. (1981) ^3H -GABA uptake in isolated vestibular cristae of chick inner ear. Soc. Neurosci. Abstr., 7, 147.
- 105.- Meza, G., Carabez, A. and Ruiz, M. (1982) GABA synthesis in isolated vestibular tissue of chick inner ear. Brain Res, 241, 157-161.
- 106.- Meza, G. (1985) Characterization of GABAergic and cholinergic neurotransmission in the chick inner ear. In D.G. Drescher (Ed.) Auditory Biochemistry. Charles, C. Thomas, Springfield Ill pp 80-101.
- 107.- Meza, G., González-Viveros, M.I. and Ruiz, M., (1985) Specific ^3H -aminobutyric acid binding to vestibular membranes of the chick inner ear. Brain Research 337 : 179-183.

- 108.- Meza, G., Cuadros, P. and López, I. (1984) Biochemical studies on the cholinergic neurotransmission of the frog vestibule. Soc. Neurosci. Abstr. 10, 1152.
- 109.- Meza, G. and López, I. (1985) Characterization of cholinergic neurotransmission in the frog vestibule. J. Neurochem. 44, s98c.
- 110.- Meza, G., and Hinojosa, R. (1987) Ontogenetic approach to cellular localization of neurotransmitters in the chick vestibule. Hearing Res., 28 : 73-85 .
- 111.- Meza, G., López, I. and Ruiz, M. (1984) Possible cholinergic neurotransmission in the cristae ampullares of the chick inner ear. Neuroscience Letters, 49 :93-98.
- 112.- Meza, G., López, I., Paredes, M.A., Peñaloza, Y. and Poblano, A. (1989) Cellular target of streptomycin in the internal ear. Acta Otolaryngol (Stockh.), 107 :406-411.
- 113.- Nakajima, Y., and Wong, D.W. (1974) Morphology of afferent synapse in the hearing goldfish. J. Comp. Neurol. 156 : 403-416 .
- 114.- Newman, G.R. and Jassani, B. (1984) Post-embedding immunoenzyme techniques. En Immunolabelling for electron microscopy (Polak/Vardell, Eds) Cap 5 pp 53-70.
- 115.- Gentel, W.H., Schmechell, D.E., Tappaz, M.L. and

Kopin, I. J. (1981) Production of a specific antiserum to rat brain glutamic acid decarboxylase by injections of an antigen-antibody complex. *Neuroscience* 6, 2689-2700.

116.- Ohmori, H. (1985) Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick. *J. Physiol.* 359 : 189-217 .

117.- Ohmori, H. (1987) Gating properties of the mechanoelectrical transducer channel in the dissociated vestibular hair cell of the chick. *J. Physiol.* 387 : 589-609 .

118.- Osborne, M.P. and Thornhill, R.A. (1972) The effect of monoamine depleting drugs upon synaptic bars in the inner ear of the bullfrog (*Rana catesbiana*) *Z. Zellforsch Mikosk. Anat.*, 127: 347-355.

119.- Ottersen, Ole, P., and Storm-Mathisen, J. (1987) Localization of aminoacid neurotransmitter by immunocytochemistry. *TINS*, 10:250-255.

120.- Plinkert, P. K., Gitter, A. H., Zimmerman, U. Kirchner, T., Tzartos, S., and Zenner H.P. (1990) Visualization and functional testing of acetylcholine receptor-like molecules in cochlear outer hair cells. *Hearing Research* . 44 : 25-34 .

121.- Plinkert, P. K., Mohler, H. and Zenner, H. P. (1990) A subpopulation of outer hair cells possessing GABA_A receptors with

tonotopic organization . Arch. Otolaryngol. 146 : 410-412 .

122.- Frecht,W.(1984) Physiological aspects of the efferent vestibular system. In Honnhuber,H.(ed) Handbook of sensory physiology. Vol VI Berlin,New York,Springer Verlag ,pp 221-236.

123.- Frignoni, I., Russo, G., Valli , P. and Masetto, S. (1990) Pre- and postsynaptic excitatory action of glutamate agonist on frog vestibular receptors. Hearing Research 46 : 253-260 .

124.- Fujol,R., Lenoir, M., Robertson, D., Eybalin, M. and Johnstone, B.M.(1985) Kainic acid selectively alters auditory dendrites connected with cochlear inner hair cells. Hearing Res. , 18 : 145-151 .

125.- Raymond,J., Dememes,D and Nieouillon,A.(1988) Neurotransmitters in vestibular pathways. Progress in Brain Res. 76:29-43.

126.- Richrat, W., Kraus, H., Frome, H. (1974) Lokalisation von ³H-aminobuteraurte in der Cochlea . Arch. Otolaryngol (Stockh.) . 64 : 436-448 .

127.- Roberts, E. and Kuriyama, K. (1978) Biochemical and physiological correlations in studies of gamma-aminobutyric acid system. Brain Res 8:1-35 .

- 128.- Roberts,E.(1978) New directions in GABA research. I: immunocytochemical studies in GABA neurons. In GABA neurotransmitters(Ed by Krogsgaard-Larse,P. Scheel Kruger,J. and Kofod,H) pp 28-45 .
- 129.- Roberts, W.M., Howard, J. and Hudspeth,A.J. (1980) Hair cells: transduction, tuning and transmission in the inner ear. Ann. Rev. Cell Biol. 4,63-92 .
- 130.- Roberts,W.M., Jacobs,K.A. and Hudspeth,A.J. (1990) Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. J. of Neuroscience.10(11)3664-3684.
- 131.- Rossi,M.L., Valli,F., P., Casela,C.(1977) Postsynaptic potential recorded from efferent nerve fibers of the posterior semicircular canal in the frog. Brain Res. 135:67-75.
- 132.- Rossi,M.L., Frigioni,I., Valli,F., and Cassela,C.(1980) Activation of the afferent epsps and spike discharge recorded from single fibers of the posterior semicircular canal. Brain Res.185 : 127-137. .
- 133.- Schucknecht, H.F., Churchill, J.A., and Doran, R. (1959) The localization of acetylcholinesterase in the cochlea. Archives Oto-laryngol. 69 :549-557.
- 134.- Saito,K., Barber,D., Wu J-Y., Matsuda,I., Roberts,E and Vaughn, J.E. (1974) Immunohistochemical localization of glutamate

decarboxylase in rat cerebellum . Proc. Nat. Ac. Sci. USA
71,269-273.

135.- Schousboe,A., Saito,K and Wu J-Y (1980) Characterization
and cellular and subcellular localization of GABA-Transaminase .
Brain Res Bull 5,SUPPL 2: 71-76.

136.- Schwartz, I.R.and Ryan, A.F. (1983) Differential
labelling of sensory cell and neuronal populations in the organ
of Corti following amino acid incubations. Hearing Res. 9 :
185-200 .

137.- Sewell, W.F., Norris, C.H. and Guth, P.S. (1978) Detection
of an auditory nerve activating substance. Science, 302:910-912 .

138.- Sewell, W.F. and Mroz, E.A.(1987) Neuroactive substances
in inner ear extracts. J. Neuroscience, 7 : 2465-2475.

139.- Shotwell, S.L., Jacobs, R. and Hudspeth, A.J. (1981)
Directional sensitivity of individual vertebrate hair cells to
controlled deflection of their hair bundles. An New York Acad.
Sci. 374, 1-10.

140.- Sjostrand, J. S.(1958) Ultrastructure of the retinal
rod synapses of the guinea pig eye as revealed by three
dimensional reconstruction from serial sections. J. Ultrastruc.
Res. 2, 122-124 .

- 141.- Smith, C.A. and Sjostrand, F.S. (1961) A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea. *J. Ultrastruc. Res.* 5:184 : 192 .
- 142.- Soto,E., and Vega,R. (1988) Actions of excitatory amino acid agonist and antagonist on the primary afferents of the vestibular system of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*).*Brain Res.* 462 : 104-111 .
- 143.- Steinback, A. B. and Bennet, M.V.L.(1971) Effects of divalent ions and drugs on synaptic transmission in phasic electroreceptors in a mormyrid fish. *J.Gen Physiol.* 58:580-589.
- 144.- Storm-Mathisen,J. Leknes,A.K., Bore,A.T. Vaaland,J.L., Ednison,P. Haug f.M.S.and Ottersen,U.F.(1983) First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature*, 301:517-520.
- 145.- Tanaka,M., Takeda,N., Senba,E., Tonyama,M.,Kubo,T. and Matsunaga,T.(1989) Localization, origin and fine structure of calcitonin gene-related peptide-containing fibers in the vestibular end-organs of the rat. *Brain Research* 504 : 31-35 .
- 146.- Tapia, R. and Meza, G. (1981) Propiedades bioquímicas de las sinapsis GABAérgicas y colinérgicas. En *Temas selectos de Fisiología Celular*, A. Peña, R. Drucker y R. Tapia(eds.). UNAM, México, pp 223-240.

- 147.- Thompson, G.C., Cortez, A.M. and Igarashi, M. (1986) GABA-like immunoreactivity in the squirrel monkey organ of Corti. Brain Res. 372-372-79 .
- 148.- Thornhill, R. (1972) The effect of catecholamine precursor and related drugs on the morphology of the synaptic bars in the vestibular epithelia of the frog (*Rana temporaria*). Comp. Gen. Pharmacol., 2 : 89-97.
- 149.- Tucek, S. (1988) Choline acetyltransferase and the synthesis of acetylcholine. In V.F. Whittaker (Ed.), Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 86: The cholinergic synapse. Berlin, Springer Verlag, pp 125-165 .
- 150.- Umekita, S.H., Matsumoto, Y., Abe, T. and Ubara, S. (1980) The afferent neurotransmitter in ampullary electroreceptors : stimulus-dependent release experiments refute the transmitter role of L-glutamate. Neurosci Lett. Suppl 4, S7.
- 151.- Usami, S., Igarashi, M. and Thompson, G.C. (1987) GABA-like immunoreactivity in the squirrel monkey vestibular endorgans, Brain Research 417 : 367-370.
- 152.- Usami, S., Igarashi, M., and Thompson, G.C. (1987) GABA-like immunoreactivity in the chick vestibular endorgans, Brain Research , 418 : 383-387 .
- 153.- Usami, S., Hozawa, J., Tazawa, M., Igarashi, M., Thompson,

G.C., Wu, J-Y and Wenthold, R. J. (1989) Immunocytochemical study of the GABA system in chicken vestibular endorgans and the vestibular ganglion. *SOR* : 214-128 .

154.- Valli, P., Costa, J. and Zucca, G. (1984) Local mechanism in vestibular receptor control. *Acta Otolaryngol. (stockh.)*. 97 :611-618 .

155.- Valli, P., Zucca, G., Prigioni, I., Botta, L., Casella, C., and Guth, P.S. (1985) The effect of glutamate on the frog semicircular canal. *Brain Research* 330 : 1-9 .

156.- Vega, R., Soto, E., Budelli, R., Gonzalez-estrada, M.T. (1987) Is GABA an afferent transmitter in the vestibular system ? *Hearing Res* 29:163-167.

157.- Vinnikov, Y.A. (1982) Mechanoreceptor cells . In *Evolution of Receptor cells* (Edited by Springer, G.F.) pp 59-116. Springer-Verlag, Heidelberg .

158.- Wachtler, K. (1981) Observations on the evolution of the cholinergic system in the telecephalon of vertebrates. *Comp Biochem Physiol* 72C, 357-361 .

159.- Wenthold, R. J., Altschuler, R.A. (1983) Immunocytochemistry of aspartate aminotransferase and glutaminase. In Hertz, E., Kvamme, E., Mc Geer, E.G., and Shcousboe, A (Eds) "Glutamine, glutamate and GABA in the central nervous system. New York Alan

160.- Wenthold, R.J., Zempel, J.M., Farakkal, M.H., Reeks, K. A. and Altschuler, R.A. (1986) Immunocytochemical localization of GABA in the cochlear nucleus of the guinea pig .Brain Research 380 :7-18 .

161.- Werman, R.(1966) Criteria for identification of a central nervous system transmitter. A review. Comp. Biochem. Physiol. 18 :745-766 .

162.- Wersäll, J . (1956) Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullares in the guinea pig. A light and electron microscopic investigation . Acta Otolaryngol 126: 1-55.

163.- Wersäll,J., Flock,A. and Lundquist,R.G.(1965) Structural basis for directional sensitivity in cochlear and vestibular sensory receptors. Cold. Spring Harbor. Simp. Quant. Biol. 30 : 115-145 .

164.- Wersäll,J., and Flock, A. (1965) Functional anatomy of the vestibular and lateral line organs. In W.D.Neff(ed.). Contributions to Sensory Physiology. Vol 1. N.Y. Acc. Press, pp 39-61.

165.- Wersäll,J., and Bagger-Sjoberg,D.(1974) Morphology of the vestibular sense organs. In Handbook of Sensory Physiology. H.

Kornhuber (ed.) Springer-Verlag, New York, Vol 6, pp 123-170 .

166.- Wiet, J.G., Godfrey, D.A ., Ross, D.C. and Dunn, J. D. (1986). Quantitative distribution of aspartate aminotransferase and glutaminase activities in the rat cochlea. Hearing Res. 24,137-150 .

167.-Wu,J-Y. (1976) Purification and Properties of L-glutamate decarboxylase (GAD) and GABA-aminotransferase (GABA-T In : GABA in Nervous system function Ed by E. Roberts, I. Chase and D. Tower pp. 7-55. Raven Press, New York .

168.- Wu, Yang-Yen (1985) Preparation of glutamic acid decarboxylase as immunogen for immunocytochemistry. Cap 7 en Immunohistochemistry. Ed por A.C. Cuellar IBRO. John Wiley & Sons Chichester-New-York-Brisbane-Toronto-Singapore.

169.- Yamashita,M., and Ohmori,H. (1990) Synaptic responses to mechanical stimulation in calyceal and bouton type vestibular afferents studied in an isolated preparation of semicircular canal ampullae of chicken. Exp. Brain Res. 80,475-488.

X APENDICE

TRABAJOS PRESENTADOS BASE DE ESTA TESIS

TRABAJO I

COMPARATIVE STUDIES ON GLUTAMATE DECARBOXYLASE AND CHOLINE ACETYLTRANSFERASE ACTIVITIES IN THE VERTEBRATE VESTIBULE

IVAN LÓPEZ and GRACIELA MEZA*

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo Postal 70-600,
04510 México (Tel. (905) 550-5215)

(Received 17 May 1989)

Abstract. Vestibular putative neurotransmitters GABA and acetylcholine synthesizing enzymes were quantified in four vertebrate species to find a correlation between all-vertebrate vestibular hair cell II (HCII) and synaptic contacts and appearance of hair cell I (HCI) and related synapses in terrestrial species.

1. Glutamate decarboxylase (GAD) and choline acetyltransferase (ChAT) values were 3.76, 15.38, 21.68, 27.78 and 9.44, 450, 720, 970 n(pico)mole/mg protein/hr (min) in, respectively, frogs, guinea pigs, rats and chicks.

2. GAD and ChAT omnipresence may indicate constant GABAergic HCII and its cholinergic efferent synapses; their raised content, appearance of GABA-containing HCI and related cholinergic boutons in higher vertebrates.

INTRODUCTION

Scarcely modified in the course of evolution the main features of the inner ear can be recognized in all vertebrates (Vinnikov, 1982). It consists of a membranous labyrinth encased in a bony analogue located generally in the petrous part of the temporal bone or its analogue. In amphibians, birds and mammals the membranous labyrinth shows the following characteristics: three well defined semicircular canals, each with its own sensory surface (cristae), two or three distinct otolithic organs with separated sensory periphery areas (maculae) and one to three other organs lacking calciferous masses, the papillae, including the papilla neglecta and the organ of Corti. The apparent homologies among these organs in different species have led anatomists to assign a common name to each type of organ across species, even though there are substantial morphological and functional variations. The membranous labyrinth is generally divided into a superior and an inferior division. The superior division, which exhibits fewer evolutionary changes than the inferior one, includes the semicircular canal, the utricle and the papilla neglecta, which often shares a labyrinthine cavity with one of the other organs. Functionally, the organs of the superior division tend to be vestibular, i.e. equilibrium, with some exceptions. The inferior division, which changes dramatically in both form and function in the course of evolution, includes the saccule and its appendages, the lagena, the cochlea and the recesses containing the basilar and the amphibian papillae (Lewis *et al.*, 1985).

The labyrinthine wall is lined with a layer of epithelial cells which are specialized in the end organs to form the sensory epithelia. Each sensory epithelium in the inner ear of vertebrates contains two basic cell types (hair cells or sensory cells and

supporting cells) as well as the nerve fibres innervating the hair cells (Lewis *et al.*, 1985).

The hair cell is the mechano-electric transducer element which is vital to all functional properties of vestibular end organs (Wersäll, 1956). This type of sensory cell is found exclusively in vertebrates and has been described as a secondary cell of epithelial origin (Lowenstein, 1974). The hair cells are very similar in the macula of the utricle and of the saccule and in the cristae. There is, however, a great difference in the structure of the covering material (Engstrom and Engstrom, 1981).

Wersäll (1956) described two different kinds of sensory elements: type I and type II cells. Type I cells are flask-shaped with a rounded lower end. These cells are surrounded to a great extent by a nerve calyx which continues as an afferent nerve fibre through the basement membrane. The type II cell is more cylindrical but it also has a rounded lower end. The type II cell has contacts with many nerve endings which form afferent (centripetal) synapses along the plasma membrane at different levels both below and above the nucleus. This kind of cell is thought to be phylogenetically the oldest, i.e. it exists in the sensory periphery of all vertebrate classes whereas type I appears in terrestrial vertebrates (Wersäll, 1956). The presence of synaptic endings filled with vesicles at the base of a type II hair cell and outside the calyx of the type I hair cell of higher vertebrates supports the idea that hair cells are also contacted by terminals of efferent (centrifugal) origin (Lowenstein, 1974).

There is ample evidence that communication, both centripetal and centrifugal, is chemical in nature (Furukawa, 1978; Schessel and Highstein, 1981). The identity of the neurotransmitters involved is presently a matter of controversy, although gamma-aminobutyric acid (GABA) and acetylcholine (ACh) have been implicated as afferent and efferent neurotransmitters, respectively (Gisselsson, 1960; Flock and Lam, 1974; Rossi *et al.*, 1977, 1980; Felix and

*Author to whom correspondence should be addressed.

Ehrenberger, 1982; Meza *et al.*, 1982, 1984; Meza and Hinojosa, 1987; Bernard *et al.*, 1984; Usami *et al.*, 1987a, b; Lopez and Meza, 1988). Size, proportions and cytological complexity of the vertebrate inner ear are well illustrated in a large number of studies on its comparative anatomy (Wersall *et al.*, 1965; Baird, 1974; Lowenstein, 1974; Lewis *et al.*, 1985). Less numerous are the investigations of its physiology comparing it among the main vertebrate groups (Lowenstein, 1974; Goldberg *et al.*, 1985). Especially noteworthy is the complete lack of comparative neurochemistry studies in the vestibular system, nor is it in the auditory part of the inner ear. The comparative neurochemical approach has proved useful in understanding some problems of brain chemistry, especially those concerning how structural changes in the course of evolution are accompanied by a varied regional chemical specificity (Wahlster, 1981, 1982). It is the aim of this paper to analyze with some neurochemical parameters the evolution of neurotransmission of the vestibular sensory periphery in representative animals of three vertebrate groups: amphibians, birds and mammals, in the hope to find a correlation between the constancy of type II hair cells in all vertebrates and the appearance of type I cells in terrestrial animals (birds and mammals) with the presence and magnitude of enzymatic activities relative to putative vestibular neurotransmitter synthesis. For that purpose glutamic acid decarboxylase (GAD, L-glutamate 1-carboxyl-lyase, E.C. 4.1.1.15), the enzyme involved in the synthesis of gamma-aminobutyric acid (GABA), and choline acetyltransferase, the enzyme responsible for the synthesis of acetylcholine (ACh) (ChAT, acetyl-CoA choline-*o*-acetyltransferase, E.C. 2.3.1.6), activities were measured in homogenates of the complete labyrinth of frogs (*Rana moerensiana*), chicks (*Gallus domesticus*), Long-Evans (pigmented) rats (*Rattus norvegicus*) and guinea pigs (*Cavia cavyana*). GAD and ChAT were chosen as suitable criteria since they have been considered good markers of GABAergic (Roberts and Kunyama, 1968; Roberts, 1978) and cholinergic cells (Hebb and Morris, 1969; Rossier, 1977; Levey *et al.*, 1983).

The experiments carried out and the results obtained are described below.

MATERIALS AND METHODS

Materials

DL-[1-¹⁴C]glutamic acid (100 mCi/mmol) and coenzyme A, Acetyl-[³H]acetyl (850 mCi/mmol) were obtained from New England Nuclear, Boston, MA, USA and [1-¹⁴C]glutamic acid (50 mCi/mmol) and [³H]acetyl-coenzyme A (950 mCi/mmol) from Amersham, Int. UK. Hyamine hydroxide was from Amersham, IL, USA. Eserine sulphate, tetraphenylboron, 5-acetyl-coenzyme-A, ethylenediaminetetra-acetate (EDTA), choline chloride, Triton X-100, 2,5-diphenylloxazole (PPO), bovine serum albumin, pyridoxal phosphate (PDP), L-histamine, L-glutamic acid were from Sigma, St. Louis, MO, USA. NaCl was from Mannokod, Mexico. Toluene and H₂SO₄ were from JTM Baker, Mexico. acetonitrile, potassium and sodium phosphate were from Merck, Mexico.

Experimental procedure

All animals were killed by decapitation. One-day-old male (Rhode Island Red) chicks were used for this study and the

whole vestibule (crustae, sacule and lagenae) was removed as already described (Meza *et al.*, 1982). In the case of the two rodents studied (Long-Evans pigmented rats and pigmented guinea pigs) the cranium was opened sagittally, extracting the whole brain mass and separating the auditory bullae of the temporal bone. These auditory bullae were then broken in two parts to separate the cochlear part from the vestibular part; the membranous vestibule was extracted with a micro-forceps under an American optical dissecting microscope at $\times 5$ magnification. The dissected labyrinth was placed in cold sodium phosphate (ChaT assay) pH 7.4 or potassium phosphate buffer (pH 7.3 GAD determination).

As for the frog (*Rana moerensiana*) after decapitation the whole labyrinth was cut into a Heschl's sac containing 10 ml of 200 mM KH₂PO₄ buffer to pH 7.3 (GAD assay) or 10 ml of 100 mM NaH₂PO₄ pH 7.4 (ChAT measurement) in order to prevent a possible dehydration of the tissue. For ChAT assay, 1 mM mercuric sulphate was added to the medium to inhibit the action of acetylcholinesterase (ACh inactivating enzyme) while immersed in the respective buffer, the inferior and superior parts were removed from the head and the bony temporal portion containing the vestibular apparatus was isolated from the surrounding part of the skull and the brainstem and the oss capsule was opened to expose the labyrinth. The complete vestibule was extracted with a micro-forceps and placed in the GAD or ChAT medium. In all cases homogenization was carried out in a Teflon-glass ground mortar, adding as previously described a small amount of either enzyme. The overall dissection time never exceeded 5 min.

Glutamic acid decarboxylase (GAD) assay

GAD was quantified by the radiochemical method described by Amerys and Brady (1959) with minor modifications. Triplicate samples (0.3 mg protein for chicken and frog, and 0.09-0.07 mg for pig and rat) were added to a homogenate of the pooled vestibular organs of all animals were placed in a medium containing (in mM): L-glutamic acid 10, 2-mercaptoethanol 10, pyridoxal phosphate 0.1, potassium phosphate 200, pH 7.3. The reaction was started by addition of 30 μ l of [1-¹⁴C]glutamic acid (0.24 μ Ci) or [1-¹⁴C]glutamic acid (0.12 μ Ci) with a specific activity of 100 or 50 mCi/mmol, respectively. After incubation was performed at 30°C (frog) and 37°C (chick, rat and guinea pig) for 20 min the reaction was stopped by injection of 0.2 ml of 8 M H₂SO₄. The ¹⁴C₀ released was captured in 0.1 ml of hyamine hydroxide contained in a microtube which was connected with a hose to another microtube containing the reaction mixture (90 μ l), tubes whose reaction was stopped at zero time were used as blank. The tubes were further incubated at either 30 or 37°C for 60 min for equilibration. GAD activity was expressed as nmoles of glutamic acid decarboxylated/mg protein/hr.

Choline acetyltransferase (ChAT) activity

This was determined by a radiochemical method (Huang, 1977) with slight modifications (Meza *et al.*, 1984). Triplicate samples were used, each containing approximately 0.03-0.05-0.07 or 0.4 mg protein of a homogenate of the pooled complete vestibular organs of chicks, rats, guinea pigs or frogs, respectively, in a medium of the following composition (in mM): sodium phosphate 10, choline chloride 10, eserine sulphate 0.1, ethylenediaminetetra-acetate (EDTA) 10, sodium chloride 300, Triton X-100 0.3%. [³H]acetyl-coenzyme-A (0.06 (0.26 μ Ci) with 4 specific activity of 850 mCi/mmol, this mixture was buffered to give a final pH of 7.4. The incubation time was 15 min at either 30°C (frog) or 37°C (chick, rat and guinea pig). The reaction was stopped by addition of 10 ml of a cold 10 mM NaH₂PO₄ buffer to each microtube which was cooled and sealed. Afterwards, 2 ml of tetraphenylboron acetonitrile (2 mg/ml) were added to each vial to separate [³H]acetylcholine from unreacted [³H]acetyl-coenzyme-A

Table 1. Vestibular GAD activity as compared with reported enzyme values of various areas of nervous system of four different vertebrate species*

Animal	Vestibule	Retina†	Nervous tissue‡
Frog	3.76 ± 0.10 (21)	0.91	2.00†
Guinea pig	15.38 ± 0.36 (4)	23.50†	40.50†
Rat	21.60 ± 1.70 (5)	12.60†	24.86†
Chick	27.78 ± 1.40 (5)	16.50†	30.00†

*Expressed in nmol/mg protein/hr ± SEM for the number of experiments (triplicate samples) indicated in parentheses.

†Numbers indicate sources of values reported: 1. Starr (1973), 2. López and Meza (unpublished results), 3. Lam (1975), 4. Mid brain (Yates and Taberner, 1975), 5. Whole brain homogenate (López and Meza, unpublished data), 6. Inferior colliculus (Fisher and Davies, 1976). Values for 1 and 4 were recalculated assuming 10% protein, 90% water content in the tissue.

and 8 ml of a scintillation liquid (PPO-POPOP (toluene) were added. Blanks were stopped at zero time. ChAT activity was expressed as pmoles of acetylcholine synthesized/mg protein/min.

Radioactivity for both methods was estimated in a Packard Tricarb Scintillation Spectrometer.

Protein measurement

Protein was determined by the method of Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin as standard.

RESULTS

GAD activity in the vestibule of four vertebrate species

Table 1 gives data of GAD activity in vestibular homogenates of frogs, guinea pigs, rats and chicks. Glutamate decarboxylase is present in the vestibules of all four animal species studied with approximately the same order of magnitude. However, some differences were noticed: the lowest enzyme activity was found in the whole vestibule of the frog (3.76 nmol/mg protein/hr) whereas the highest one was encountered in the chick (27.78 nmol/mg protein/hr).

Guinea pig and rat vestibular GAD showed intermediate values (15.38 and 21.60 nmol/mg protein/hr respectively). These data are in the same range of GAD reported in the central nervous system and retina of these four vertebrates (Starr, 1973; Lam, 1975; Yates and Taberner, 1975; Fisher and Davies, 1976; López and Meza, unpublished results) (Table 1).

ChAT activity in the vestibule of the four vertebrate species studied

Table 2 shows that ChAT activity can be demonstrated in the whole vestibule of the four animal species studied. In contrast to GAD, ChAT showed some striking interspecies differences. As with GAD, the lowest activity was found in the frog (9.44 pmol/mg protein/min) and the highest one was encountered in the vestibule of the chick (970.00 pmol/mg protein/min), with intermediate values in guinea pigs and rats (450 and 720 pmol/mg protein/min respectively). When compared with its homologous enzyme found in nervous tissue and retina of the same species ChAT activity in the frog vestibule is of the same order as that found in frog nervous tissue and retina (Lam, 1975; Wachter, 1981). The same was observed with the values of ChAT activity in the rat vestibule, whose range was

Table 2. Vestibular ChAT activity as compared with reported enzyme values of various areas of the nervous system of four different vertebrate species*

Animal	Vestibule	Retina†	Nervous tissue‡
Frog	9.44 ± 0.1 (21)	30.50	16.00†
Guinea pig	450.00 ± 20 (12)	920.00†	570.00†
Rat	720.00 ± 25 (4)	680.00†	870.00†
Chick	970.00 ± 30 (4)	335.00†	470.00†

*Expressed in pmol/mg protein/min ± SEM for the number of experiments (triplicate samples) indicated in parentheses.

†Numbers indicate sources of values reported: 1. Lam (1975), 2. Graham (1974), 3. Telencephalon (Wachter, 1981), 4. Whole brain homogenate (López, Acuña and Meza, unpublished results), 5. Whole brain homogenate (Sugden and Newsholme, 1977). Values for 3 and 5 were recalculated assuming 10% protein, 90% water content in the tissue.

similar to that in rat nervous tissue (Hoover *et al.*, 1978) and retina (Lam, 1975). However, although vestibular ChAT in the guinea pig and chick was of the same magnitude when compared to ChAT in the retina of the same species (Graham, 1974; Lam, 1975) that found in nervous tissue was 4.5 and 8.5 times higher than that of the respective vestibule (Marchi *et al.*, 1980; López, Acuña and Meza, unpublished results) (Table 2).

DISCUSSION

GAD and ChAT were measured in vestibular homogenates of four different animals representative of three different vertebrate groups. As can be seen from Tables 1 and 2 GAD and ChAT activities are present in the four animals studied and, in general, their specific activities are of the same order of magnitude (in the nanomolar range) as their homologous enzymes in nervous tissue and retina. Vestibular GAD activity values were lowest in the frog and highest in the chick. Intermediate values were found for guinea pigs and rats. Although this corresponds to a ratio of 9:1 from highest to lowest activity it can be said that vestibular GAD activity does not differ strikingly from one species to the other. This finding is in agreement with reports of GAD activity in nervous tissue and retina of different vertebrate species (Lam, 1975; Sugden and Newsholme, 1977). Further, the activities of GAD in the retinas amongst species are of the same order of magnitude. In contrast, vestibular ChAT was again lowest in the frog and highest in the chick, the ratio being 100:1 from highest to lowest activity, the second highest value was that of the rat, differing 80:1 from the lowest value. The intermediate values (guinea pig) differed by 1:50 from the frog. These results suggest a species diversity of ChAT activity, although a certain phylogenetic trend can be observed. This finding is in agreement with reports in which the largest variation of ChAT activity in nervous tissue within vertebrates studied was approximately 50-fold (Sugden and Newsholme, 1977), and in retina where ChAT activity varied about 30-fold (Lam, 1975), in both cases fish having the highest and amphibians the lowest values.

The objective of our study was to try to find an evolutionary correlation between some vestibular structural feature and our biochemical findings. In that respect, one can say that in the phylogenesis of

vertebrates, the receptor epithelium of the maculae and cristaes of the labyrinth reveals extraordinary organizational permanency (i.e. the presence of hair cell type II and related synaptic contacts in all vertebrates) as well as several evolutionary transformations (the appearance of hair cell type I and its innervations in terrestrial animals). The presence of the GABA synthesizing enzyme in all of the groups studied is an example of such organizational permanency, thus GABA can be postulated as a hair cell type II neurotransmitter. The GAD increase observed from the frog to terrestrial animals might be attributed to the acquisition of a new type of receptor cell which also uses GABA to communicate with its afferent synapse (hair cell type I). Recently found GABA-like immunoreactivity in the cell type supports this notion (I. Sami *et al.*, 1987a,b).

On the other hand, the observed quantitative ChAT difference between the frogs and the higher vertebrates can be accounted for by postulating a notable increase of efferent synaptic contacts (both type I and II hair cell types) from aquatic to terrestrial species or, alternatively, a rise in the content of ChAT present in type II-contacting efferent endings and a different neurotransmitter used by efferent synapses on hair cell type I. Neither of these possibilities can, at present, be documented.

The data presented in this work show that our biochemical findings mimic anatomical and physiological similarities in the vestibular system of vertebrates, making it possible to extrapolate the results coming from various vertebrate experimental models to the understanding of human vestibular function and disabilities.

SUMMARY

1. The vestibular organs of vertebrates show extraordinary phylogenetic permanency although its sensory areas present some evolutionary trends. In order to find a biochemical correlation between the constancy of hair cell type II and its related nerve endings in all vertebrates and the appearance of the type I hair cell and its synaptic contacts in terrestrial vertebrates, the presence and magnitude of glutamate decarboxylase (GAD) and choline acetyltransferase (CHAT), enzymes of synthesis of GABA and acetylcholine, putative vestibular neurotransmitters, were investigated in four different vertebrate species.

2. Vestibular homogenates of frogs presented GAD and ChAT specific activities which were extremely low as compared with the ones encountered in chicks, rats and guinea pigs, whose GAD and ChAT were of approximately the same order of magnitude.

3. When GAD and ChAT specific activities of the four species studied were compared with their related retina and nervous system contents, they were found to be in the same range as those enzymatic activities found in vestibular homogenates.

4. The rise in GAD content from frogs to terrestrial species can be attributed to the appearance in higher vertebrates of hair cell type I, which has increasingly been proven to be GABAergic.

5. The increase in ChAT specific activity in terrestrial species with respect to frogs could be ascribed to

a rise in the number of ACh-containing efferent endings, long proven to be cholinergic.

6. These results show that vestibular constancy and evolutionary trends in vertebrates can be studied biochemically in vertebrate animal models with the aim of extrapolating these results to understand human vestibular function and dysfunction.

Acknowledgments. Thanks are due to Miss Yolanda Díaz de Castro who kindly provided secretarial assistance. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Mexico partially supported this work through a scholarship to I. López and Grant PC-SACNA050441 to G.M.

REFERENCES

- Albers R. W. and Brady R. D. (1959) The distribution of glutamate decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey. *J. Biol. Chem.* **234**, 926-928.
- Bard I. L. (1974) Some aspects of the comparative anatomy and evolution of the inner ear in submammalian vertebrates. *Brain Behav. Evol.* **10**, 11-36.
- Bernard C., Cochran S. L. and Precht W. (1984) Pharmacology of the vestibular hair cell afferent fiber synapse in the frog. *J. Neurosci.* **4**, 2106-2116.
- Engström H. and Engström B. (1981) The structure of the vestibular sensory epithelia. In *The Vestibular System: Function and Morphology* (Edited by Gualtierotti T.), pp. 1-47. Springer-Verlag, New York.
- Ichly D. and Ehrenberger K. (1982) The action of putative neurotransmitter substances in the rat labyrinth. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* **93**, 101-105.
- Fisher S. K. and Davies W. E. (1976) GABA and its related enzymes in the lower auditory system of the guinea pig. *J. Neurochem.* **27**, 1145-1155.
- Flock A. and Lam D. (1974) Neurotransmitter synthesis in the inner ear and lateral line sense organs. *Nature* **249**, 142-144.
- Fonnum F. (1975) A rapid radiochemical method for determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* **24**, 407-409.
- Furukawa T. (1978) Sites of termination on the sacular macula of auditory nerve fibers in the goldfish as determined by intracellular injection of prouion yellow. *J. comp. Neurol.* **180**, 807-814.
- Gisselsson L. (1960) Enfolj on microphonics of acetylcholine injected into the endolymphatic space. Preliminary report. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* **51**, 636-638.
- Golberg J. M., Bard R. A. and Fernández C. (1985) Morphophysiological studies of the mammalian vestibular labyrinth. In *Contemporary Sensory Neurobiology* (Edited by Correia M. J. and Perachio A.), pp. 231-245. Alan R. Liss, New York.
- Graham L. T. (1974) Comparative aspects of neurotransmitters in the retina. In *The Eye* (Edited by Davson H. and Graham L. T.), Vol. 6, pp. 283-342. Academic Press, New York.
- Hebb C. O. and Morris D. (1969) Identification of acetylcholine and its metabolism in nervous tissue. In *The Structure and Function of Nervous Tissue* (Edited by Burne G. H.), pp. 25-60. Academic Press, New York.
- Hoover D. B., Muth E. A. and Jacobowitz D. M. (1978) A mapping of the distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in discrete areas of rat brain. *Brain Res.* **153**, 295-306.
- Lam D. M. K. (1975) Synaptic chemistry of identified cells in the vertebrate retina. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**, 571-579.
- Levey A. I., Wainer B. H., Mufson B. H. and Mesulam M. (1983) Colocalization of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the rat cerebrum. *Neuroscience* **9**, 9-22.

- Lewis R. E., Leverenz E. L. and Bialek W. S. (1985) Comparative inner ear anatomy. In *The Vertebrate Inner Ear* (Edited by Lewis R. E.), pp. 13-83. CRC Press, Florida.
- López I. and Meza G. (1988) Neurochemical evidence for afferent GABAergic and efferent cholinergic neurotransmission in the frog vestibule. *Neuroscience* **25**, 13-18.
- Lowenstein O. E. (1974) Comparative morphology and physiology. In *Handbook of Sensory Physiology* (Edited by Kornhuber H. H.), Vol. VII/1, pp. 75-122. Springer-Verlag, Berlin.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Marchi M., Hoffman D. W., Giacobini E. and Fredrickson T. (1980) Acetyltransferase activities in autonomic ganglia and iris of the chick. *Dev. Neurosci.* **33**, 235-247.
- Meza G. and Hinojosa R. (1987) Ontogenetic approach to cellular localization of neurotransmitters in the chick vestibule. *Hearing Res.* **28**, 73-85.
- Meza G., Carabez A. and Ruiz M. (1982) GABA synthesis in isolated vestibular cristae of chick inner ear. *Brain Res.* **241**, 157-161.
- Meza G., López I. and Ruiz M. (1984) Possible cholinergic neurotransmission in the cristae ampullares of the chick inner ear. *Neurosci. Lett.* **49**, 93-98.
- Roberts E. (1978) New directions in GABA research. I. immunocytochemical studies of GABA neurons. In *GABA Neurotransmitter* (Edited by Krogsgaard-Larsen P., Scheel-Kruger J. and Kofod H.), pp. 28-45. Munksgaard, Copenhagen.
- Roberts E. and Kuriyama K. (1968) Biochemical-physiological correlations in studies of gamma-aminobutyric system. *Brain Res.* **8**, 1-35.
- Rossi M. L., Valli P. and Casella C. (1977) Post-synaptic potentials recorded from afferent nerve fibers of the posterior semicircular canal in the frog. *Brain Res.* **135**, 65-75.
- Rossi M. L., Pignoni I., Valli P. and Casella C. (1980) Activation of the efferent system in the isolated frog labyrinth: effects on the afferent epsps and spike discharge recorded from single fibers of the posterior nerve. *Brain Res.* **185**, 127-137.
- Rossier J. (1977) Choline acetyltransferase: a review with special reference to its cellular and sub-cellular localization. *Int. Rev. Neurobiol.* **20**, 228-237.
- Schessel D. A. and Hightstein S. M. (1981) Is transmission between the vestibular type I hair cell and its primary afferent chemical? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **374**, 210-214.
- Starr M. S. (1973) Effect of dark adaptation in the GABA system in retina. *Brain Res.* **39**, 331-338.
- Sugden P. H. and Newsholme E. A. (1977) Activities of choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, glutamate decarboxylase, 4-aminobutyrate aminotransferase and carnitine acetyltransferase in nervous tissue from some vertebrates and invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* **56C**, 89-94.
- Usami S., Igarashi M. and Thompson G. C. (1987a) GABA-like immunoreactivity in the squirrel monkey vestibular endorgans. *Brain Res.* **417**, 367-370.
- Usami S., Igarashi M. and Thompson G. C. (1987b) GABA-like immunoreactivity in the chicken vestibular endorgans. *Brain Res.* **418**, 383-387.
- Vinnikov Y. A. (1982) Mechanoreceptor cells. In *Evolution of Receptor Cells* (Edited by Springer G. F.), pp. 59-116. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Wächter K. (1981) The regional distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in vertebrate brains of different phylogenetic levels. In *Cholinergic Mechanisms* (Edited by Pepeu G.), pp. 54-71. Plenum Press, New York.
- Wächter K. (1982) Observations on the evolution of the cholinergic system in the telencephalon of vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* **72C**, 357-361.
- Wersäll J. (1956) Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullaris in the guinea pig. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* **126**, (Suppl.), 1-85.
- Wersäll J., Flock A. and Lundquist P. (1965) Structural basis for directional sensitivity in cochlear and vestibular sensory receptors. In *Sensory Receptors* (Edited by Frisch L.), pp. 115-132. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.
- Yates R. A. and Taberner P. V. (1975) Glutamic acid, GABA and their metabolizing enzymes in the frog central nervous system. *Brain Res.* **84**, 399-407.

TRABAJO II

BRES 24345

Distribution of GABA-like immunoreactivity in guinea pig vestibular cristae ampullaris

Iván López, José M. Juiz², Richard A. Altschuler² and Graciela Meza¹¹Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F. (Mexico) and ²Kreyge Hearing Research Institute, The University of Michigan, Ann Arbor, Michigan (U.S.A.)

(Accepted 10 July 1990)

Key words: γ -Aminobutyric acid; Vestibular cristae ampullaris; Guinea pig; Post-embedding immunocytochemistry

Post-embedding immunocytochemical techniques were used to assess distribution of γ -aminobutyric acid (GABA) in the guinea pig cristae ampullaris. GABA-like immunoreactivity (GABA-LIR) was found in the cytoplasm of both type I (HC1) and type II hair cells (HC2), in the afferent calyx (AC) contacting HC1 and some myelinated fibers in the subjacent stroma. HC1 and its calyceal contacts showed variation in GABA-LIR, suggesting different populations in HC1 and AC. These results support a putative afferent neurotransmitter role of GABA in HC and a possible degradation site of GABA in AC.

Several lines of evidence suggest a putative afferent neurotransmitter role for γ -aminobutyric acid (GABA) in the vestibular sensory periphery, since GABA synthesis has been shown in most vertebrate groups: vestibular homogenates (i.e. skate and bullfrog¹, green frog², chick^{3,12}, rat⁴ and guinea pig⁵). Some experimental manipulations suggest that GABA synthesis takes place in vestibular hair cells. Glutamic acid decarboxylase (GAD), the key enzyme of synthesis of GABA, is present in the vestibular periphery but does not decrease after frog eighth nerve ablation⁶. During development of chicks⁷, rats⁸ and guinea pigs⁹, vestibular GAD parallels the maturation of hair cells and is not modified by the arrival of the efferent innervation. Furthermore, streptomycin treatment in the guinea pig which causes degeneration of vestibular hair cells and has no action on nerve terminals results in GAD vestibular depletion¹⁰.

Electrophysiological experiments have shown that iontophoretically applied GABA increases spontaneous responses in the isolated cat labyrinth and that picrotoxin and bicuculline inhibit this action¹¹. This suggests the presence of GABA_A receptors in vertebrate statoacoustic organs, a notion supported by the biochemical and pharmacological characterization of GABA receptors in chick vestibular membranes¹². On the contrary, GABA perfusion of amphibian isolated semicircular canals had no effect on the firing rate of afferent fibers¹³. Some pre-embedding immunocytochemical experiments also show controversial findings; in the chick, GABA¹⁴ and GAD-like immunoreactivity was shown to be confined

to vestibular hair cell cytoplasm, while GABA-T (the GABA degrading enzyme) was found around hair cells and along nerve fibers running through the vestibular stroma¹⁵. In other experiments, GABA-like immunostaining was found in fibers and bouton-type terminals¹⁶ or calyceal nerve endings surrounding type I hair cells⁷.

In order to contribute to the correct localization of the GABA system in vestibular sensory periphery, in the present report we will describe our post-embedding GABA-like immunoreactivity (GABA-LIR) findings in guinea pig vestibular ampullary cristae at the light microscopic level by using a GABA antiserum whose properties have been described extensively¹⁷. Parts of the present work have been presented in abstract form¹⁸.

Five healthy (both sexes) young pigmented guinea pigs (*Cavia cobaya*) (200-300 g weight) were used in this study. They were over-anesthetized with chloral hydrate (1.2 g/kg weight), exsanguinated transcardially with 50 ml of physiological saline solution, and perfused with 750 ml of a fixative containing 4.0% paraformaldehyde (Polysciences) and 0.2% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, EMS) in 0.1 M sodium cacodylate buffer (EMS) (300 mOsm; pH 7.4) delivered over a 15-min time period. At the end of the perfusion, the auditory bullae were opened, and the vestibular organs were removed and immersed in the same fixative for 5 h. The tissue was post-fixed in osmium tetroxide (EMS) (0.1% in sodium cacodylate buffer, pH 7.4, 1 h), dehydrated through a graded ethanol series and propylene oxide, and embedded in S12-based resin (EMS). One- μ m thick sections of

the embedded tissue were then made with an ultramicrotome (Reichert Ultracut or LKB Ultratome) and mounted onto glass microscope slides. Resin was removed by incubating them with saturated sodium ethoxide solution diluted 1:1 with absolute ethanol. The sections were sequentially washed in ethanol (1 × 1 mm), and distilled water (3 × 5 mm). Then, they were submerged into 1% aqueous sodium meta-periodate for 5 min alternated by a brief distilled water wash. Following additional distilled water rinses (3 × 5 mm), the slides were incubated sequentially in (1) 3% normal goat serum (Vector Labs) in phosphate-buffered saline (PBS) 0.1 M, pH 7.4, for 30 min at room temperature, (2) rabbit anti-GABA_A serum²² dilutions 1:100, 1:250, 1:500, or 1:1000 in PBS for 48 h at 4 °C, (3) the avidin-biotinylated peroxidase bridge method was used to visualize the immunohistochemical reaction: biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Labs) for 1 h, avidin-biotinylated-horseradish peroxidase complex (Vectastain Reagent, Vector Labs) for 1 h, and 3,3'-diaminobenzidine (DAB-H₂O₂) for 3–5 min, according to previously described methods²³.

The specificity of the immunostaining was tested following the above protocol but (a) using the primary antiserum preabsorbed with an excess of GABA conjugated with glutaraldehyde to bovine serum albumin, (b) replacing the GABA-antiserum by PBS or (c) adding 10 mM GABA (final concentration) in the GABA antiserum suspension. Different dilutions of this latter (from 1:100 to 1:1000) decreased background accordingly. Therefore, the results obtained using 1:1000 are described below.

GABA-LIR was continued to the cytoplasm of both type I and type II hair cells and to some myelinated fibers in the subnuclear stroma (Fig. 1A). No immunoreactivity was encountered either when (a) the technique was followed using preincubated GABA antiserum with GABA conjugated to BSA (Fig. 1B) or (b) by replacing the GABA antiserum with PBS (not shown). Furthermore, preincubation with free GABA did not decrease specific immunostaining (results not shown). Type I and II hair cells, however, stained differently. While type II cells were intensely immunoreactive and their staining did not vary with the location of the cells within the cristae ampullaris (CA), type I cells showed graded GABA-LIR intensity: some were intensely stained, others moderately stained and some others were definitely unstained (Fig. 2). This distribution was mainly observed at the upper portion of the CA. The lower part showed a uniform, intense GABA-LIR pattern in both type I and II hair cells. Some nerve fibers arriving in the sensory epithelium were also immunoreactive (Fig. 3A). These fibers correspond to the calyceal afferent endings making contact with type I hair cells (Fig. 3B). In the

upper part of the CA, GABA-LIR in the afferent calyx showed, as in type I hair cells, graded immunoreactivity, ranging from intense to absent (Fig. 2). In the basolateral region, the staining of both nerve fibers in the stroma and the calyces was constant and intense. Finally, no immunoreactivity was found in supporting cells.

The present study is the first in the literature to study GABA-LIR in the vestibule with post-embedding immunocytochemical techniques. It provides evidence that GABA-LIR is found both in hair cells and in afferent fibers of the guinea pig CA; however, the immunostaining showed various patterns: we observed that staining intensities of type II hair cell were homogeneous, while type I hair cell showed variations in intensity of the GABA-immunoreactive material, permitting us to classify them tentatively into 3 groups: (a) strongly immunoreactive, (b) moderately immunoreactive and (c) non-immunoreactive (Fig. 2). As to the nerve fibers, although at low magnification they were homogeneous, when observed at higher power, the same classification applies: (a) strongly immunoreactive, (b) moderate or (c) absence of GABA-LIR. Accordingly, 3 types of situations can occur: GABA-LIR in both type I and type II hair cells, but not in the calyx; GABA-LIR in type I cell and its afferent calyx and GABA-LIR in the calyx but not in the cell.

The presence of GABA-LIR in type I and II hair cells, except for some type I in the upper part of the CA and some fibers of the stroma, contrasts well with recent immunocytochemical findings of both GABA and GAD-like immunoreactivity in both cell and I and II in CA and in some fibers of the stroma of the chick.²⁴

GABA-LIR in some calyceal terminals either alone or contacting a GABA-LIR positive hair cell I resembles a recent study in the guinea pig vestibular organs, in which GABA-LIR was found in all calyces of CA.²⁵

Although taken altogether, our results suggest an important role of GABA in the vestibule; they provide no direct evidence for their functional significance; therefore only speculations can be made. GABA-LIR moderately to intensely positive in type I and II hair cells as it was shown in the chick, is in complete accordance with earlier indirect interpretations of a GABA afferent neurotransmitter role in the vertebrate vestibule.^{26–28} In this respect, differences in the pattern of GABA-LIR have been reported in the amacrine layer of the cat retina in which staining intensities of these cells ranged from moderate to heavy, suggesting variations in the amount of GABA-immunoreactive material among different neuronal subpopulations.²⁹ The presence of GABA-LIR in afferent calyces making contact with positive GABA-LIR cells may suggest that, as in the chick, GABA is synthesized in the hair cell and released from it, and it is

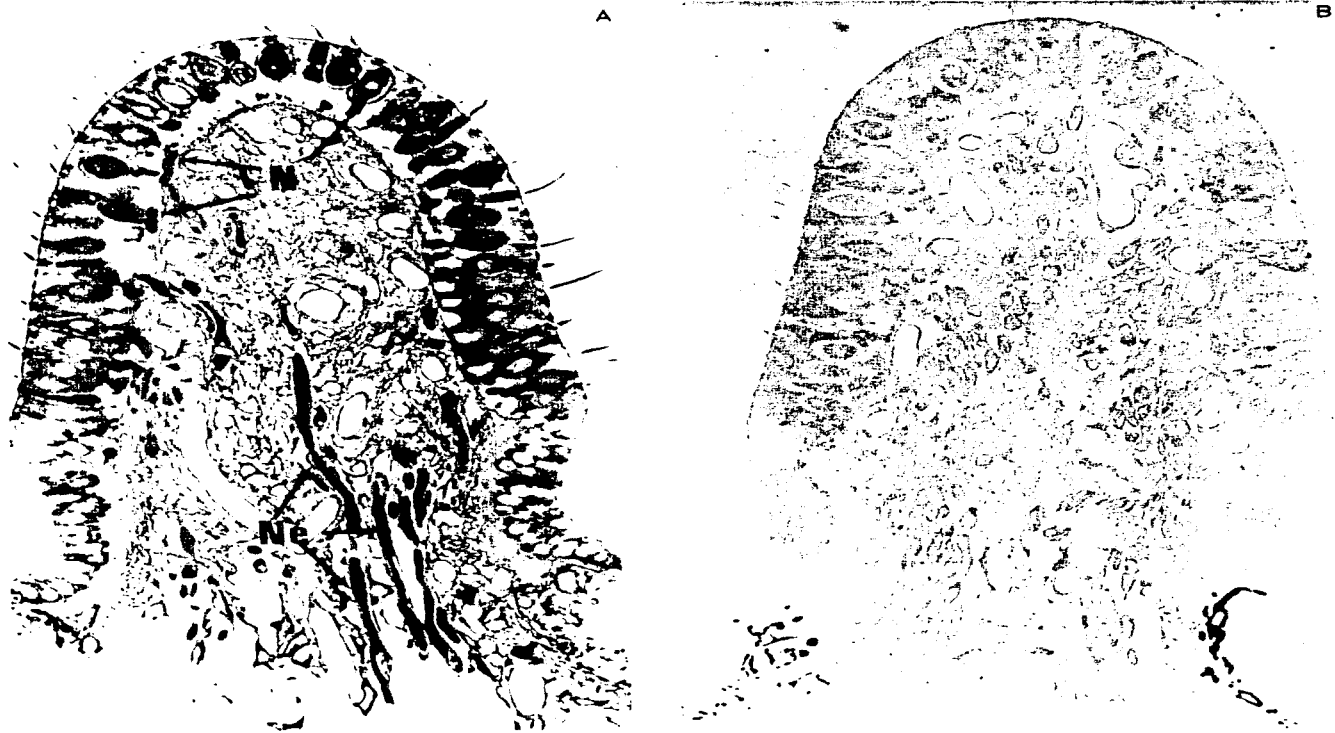


Fig. 1. Immunocytochemical localization of GABA in the vestibular crista of the guinea pig. A: crista ampullaris of posterior semicircular canal. GABA-like immunoreactivity is confined to the cytoplasm of the hair cells. Nerve fibers either reaching the epithelium (N) or within the stroma (Ne) are heavily stained. B: pre-absorbed control section of the same crista ampullaris as in A shows no immunoreactivity. At the base, some melanin-containing cells are observed. $\times 94$.

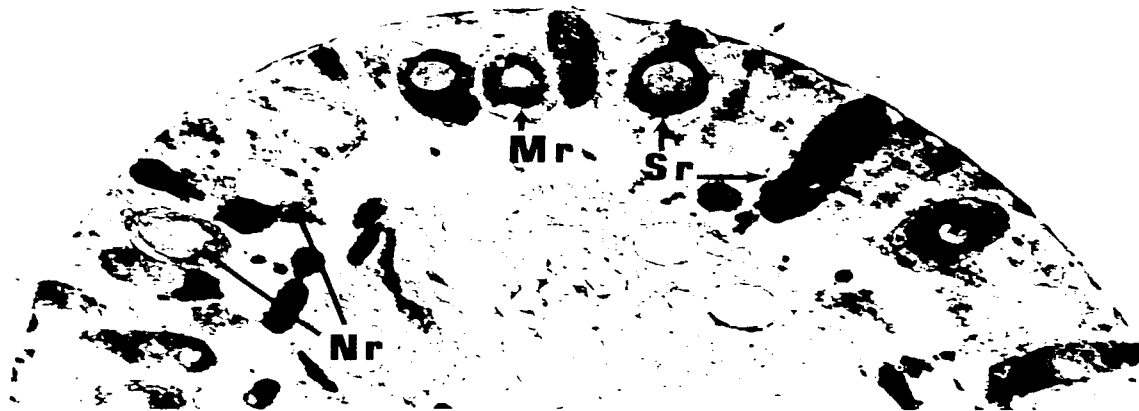


Fig. 2. GABA-LIR in the upper portion of CA of the posterior semicircular canal. Different patterns of GABA-LIR-containing cells or calyces are marked as follows: strongly reactive (Sr), moderately reactive (Mr) or non reactive (Nr). $\times 400$.



Fig. 3. Nomarski illuminated upper portion of a posterior crista ampullaris exemplifying: A, strongly stained GABA-LIR hair cells type I and type II (arrows), nerve fiber running from the calyx (probably belonging to afferent calyx is pointed arrowhead); B, strongly stained type I and II hair cells (arrowheads) in unstained calyx (including "Nc" and "sr" row) and strongly stained two cell calyx (arrow) (arrowhead) (arrow).

degraded in the calyceal element by GABA-transaminase to terminate its action?". Experiments demonstrating GAD-LIR and GABA-T-LIR in progress in our laboratory may elucidate this notion.

As to the GABA-LIR only being in some calyceal afferents, recent results reported staining in all calyces but failed to encounter GABA-LIR in hair cells". Although the former may postulate a modulatory-metabolic role for GABA, yet to be demonstrated, the latter can be attributed to differences in the techniques used or the source of antisera applied. In this respect, it would be very useful if all studies were done with the same kind of techniques and the same animal species.

In conclusion, this GABA-LIR in both hair cell I and

II supports a putative role of GABA as an afferent neurotransmitter in the hair cells, GABA-LIR in fibers and calyceal terminals either contacting type I hair cell or alone may indicate a site of GABA degradation and/or a modulatory role of GABA, of as yet unknown mechanism, in the afferent calyceal endings.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Mexico partially supported this work through a Doctorate scholarship to I.L. and Grant 200441 to G.M. Generalitat Valenciana provided a post-doctoral fellowship to J.M.J. R.A.A. held a NIH Grant NS05785. The authors are grateful to Dr. Robert Wenthold of the Laboratory of Otolaryngology, (NIH) for providing the GABA antiserum.

1. Amott, J.M., Cochran, S.L. and Precht, W. Pharmacology of the vestibular hair cell-afferent fiber synapse in the frog. *J. Neurosci.*, 4 (1984) 2109-2116.
2. Didier, A., Dupont, F. and Cazals, Y. GABA immunoreactivity of calyceal nerve endings in the guinea pig vestibule. *Cell Tissue Res.* 260 (1990) 421-429.
3. Felix, D. and Eichenberger, K. The action of putative neurotransmitter substances in the cat labyrinth. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 93 (1982) 101-109.
4. Flock, A. and Lam, D. Neurotransmitter synthesis in the inner ear and lateral line sense organs. *Nature (Lond.)*, 249 (1974) 142-144.
5. Guth, P.S. and Nottay, C. Pharmacology of the isolated semicircular canal: effect of GABA and picrotoxin. *Exp. Brain Res.* 56 (1984) 72-78.
6. Hsu, S., Raine, C. and Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 29 (1981) 4: 577-580.
7. Iturbe, A.G. and Meza, G. Asymmetrical development of GABA and acetylcholine synthesis in guinea pig vestibule. *Int. J. Neurosci.* (1986) 4 (suppl. 1) 8-32.
8. Lopez, I., Junc, J.M., Altschuler, R.A. and Meza, G. GABA-like immunoreactivity in the guinea pig vestibule: postembedding light and electron microscopy findings. *Soc. Neurosci. Abstr.* 15 (1989) 817.
9. Lopez, I. and Meza, G. Comparative studies on glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase activities in the vertebrate vestibule. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B (1990) 375-379.
10. Lopez, I. and Meza, G. Neurochemical evidence for afferent GABAergic and efferent cholinergic neurotransmission in the frog vestibule. *Neuroscience*, 25 (1988) 13-18.
11. Meza, G. Desarrollo asimétrico de la síntesis de GABA y acetilcolina en el vestibulo. *Bolet. Med. Hosp. Int. Mex.* 45 (1986) 68.
12. Meza, G., Carabaz, A. and Ruiz, M. GABA synthesis in isolated vestibular cristae of chick inner ear. *Brain Research*, 241 (1982) 157-161.
13. Meza, G., González-Viveros, M.L. and Ruiz, M. Specific [³H]aminobutyric acid binding to vestibular membranes of the chick inner ear. *Brain Research*, 337 (1985) 179-183.
14. Meza, G. and Hinojosa, R. Ontogenetic approach to cellular localization of neurotransmitters in the chick vestibule. *Hearing Res.* 28 (1987) 75-85.
15. Meza, G., Lopez, I., Paradies, M.A., Penolaza, Y. and Pobiano, A. Cellular target of streptomycin in the internal ear. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 107 (1989) 406-411.
16. Pourcho, R.G. and Owarakak, I. Distribution of GABA immunoreactivity in the cat retina: a light and electron-microscopic study. *Visual Neurosci.* 2 (1989) 425-435.
17. Usami, S., Horiawa, T., Igarashi, M., Igarashi, M., Thompson, G.C., Wu, J.-Y. and Wenthold, R.J. Immunocytochemical study of the GABA system in chick vestibular endorgans and the vestibular ganglion. *Brain Research*, 503 (1989) 214-218.
18. Usami, S., Igarashi, M. and Thompson, G.C. GABA-like immunoreactivity in the chick vestibular end organs. *Brain Research*, 418 (1987) 383-387.
19. Usami, S., Igarashi, M. and Thompson, G.C. GABA-like immunoreactivity in the squirrel monkey vestibular endorgans. *Brain Research*, 417 (1987) 367-370.
20. Wenthold, R.J., Zempel, J.M., Parakkal, J.M., Reeks, K.A. and Altschuler, R.A. Immunocytochemical localization of GABA in the cochlear nucleus of the guinea pig. *Brain Research*, 380 (1986) 7-18.

TRABAJO III

DEMONSTRATION OF L-GLUTAMATE DECARBOXYLASE AND GABA-TRANSAMINASE

IN THE GUINEA PIG VESTIBULAR SYSTEM BY IMMUNOCYTOCHEMISTRY

Iván López¹ , Jang-Yen Wu² and Graciela Meza¹

¹Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México,D.F., (Mexico) and Department of Physiology and Cell Biology, The University of Kansas, Lawrence, KS (U.S.A.).

Author for correspondence:

G. Meza

Departamento de Neurociencias

IFIC,UNAM

Apartado Postal 70-600

04510 México D.F., México.

Key words: L-glutamate decarboxylase ; γ -Aminobutyric acid-transaminase; Immunoreactivity; vestibular cristae ampullaris; guinea pig.

The immunocytochemical distribution of GABA synthesizing enzyme; L-glutamate decarboxylase(GAD) and degradation enzyme; GABA transaminase(GABA-T) in the guinea pig vestibular endorgans and the vestibular ganglion was investigated. GAD-like immunoreactivity were confined to the sensory hair cell cytoplasm, suggesting that GAD synthesizes GABA in the hair cell. GABA-T-like immunoreactivity, indicative of GABA degradation, was found around hair cells, nerve calices ,along nerve fibers running through the stroma and within the ganglion cell. These immunocytochemical findings indicate that the GABAergic system exist in the guinea pig vestibular endorgans and that GABA may function as an afferent neurotransmitter at the level of the hair cells.

INTRODUCTION

γ -aminobutyric acid (GABA) has been suspected as a vestibular hair cell neurotransmitter. GABA synthesis from glutamic acid was first reported in the fish vestibule³ and more recently in the vestibule of other vertebrate species: green frog^{6,8}, chick^{8,9}, rat^{1,6} and guinea pig⁵, implying the presence of the GABA-synthesizing enzyme, GAD. Vestibular hair cell localization of GAD, has been suggested because it becomes available very early in development in the efferent terminal-devoid vestibular sensory periphery, having already mature hair cells in chicks¹² and guinea pigs⁵, and prevails in the periphery after frog eighth-nerve ablation, which causes efferent terminal degeneration⁸. Furthermore streptomycin treatment in the guinea pig which causes degeneration of vestibular hair cells and has no action on nerve terminals results in GAD vestibular depletion¹³. Further support for the GABA hypothesis has come from the work of Felix and Ehrenberger, reporting that microiontophoretic application of GABA increased the spontaneous activity of single units in the cat macula sacculi⁴. This suggests the presence of GABA_A receptors in vertebrate statoacoustic organs, a notion supported by the biochemical and pharmacological characterization of GABA receptors in chick vestibular membranes¹¹.

The precise localization of the GABA synthesis in vestibular tissue has been recently described by immunocytochemistry in the chick¹⁴. In a recent report we

suggested that GABA (identified immunocytochemically) could be used as a neurotransmitter in the guinea pig *Cristae ampullaris*⁷. In controversy GABA-like immunoreactivity was found in fibers and Bouton-type terminals¹⁵ or calyceal nerve endings surrounding type I hair cells².

For this reason with the aim to characterize the possible existence of a GABAergic system in the guinea pig vestibular system (similar to the GABAergic system described recently in the chick) we decided to study the immunocytochemical localization of GAD. Since GAD it has been considered a better marker for GABAergic neurons than GABA per se, which may redistribute or be metabolized during the preparation of the tissue.

Additionally in order to explain the presence of GABA in some nerve fibers and nerve calices⁷ we decided to study the GABA metabolizing enzyme GABA-transaminase (GABA-T) by the same approach. The presence of these enzymes in appropriate compartments in addition of the GABA-like immunoreactivity findings would strengthen our hypothesis that GABA is used as an afferent neurotransmitter in the guinea pig vestibular endorgans.

MATERIALS AND METHODS

Eight healthy (both sexes) young pigmented guinea pigs (*Cavia cobaya*) (200-250 g, weight) were used in this study. They were over anesthetized with chloral hydrate (1.2 g/kg weight),

exsanguinated transcardially with 150 ml of isotonic saline solution, followed by 4% paraformaldehyde / 0.1 % glutaraldehyde in 0.1 M. sodium cacodylate buffer (pH 7.3) delivered over a 15 min time period (750 ml). At the end of the perfusion the auditory bullae were opened and the vestibular organs and the vestibular ganglion were removed and post-fixed in the same fixative at 4°C for 2 hrs. They were then placed in 10 % sucrose-cacodylate buffer at 4°C for 3 hr. and then transferred to 30 % sucrose-cacodylate buffer overnight. For stabilizing the fragile organs (whole ampulla, utricle or vestibular ganglion) and allow mounting in desired orientation individuals organs were embedded with embedding medium for frozen sections (Polyfreeze, Polysciences) at room temperature and frozen with liquid nitrogen or dry ice. Pyramids can then be made and cut containing the organ in the desired orientation . The frozen tissue was cut in cross section using a cryostat at a thickness of 10-15 μ m and the resulting sections were mounted on slides coated with gelatin.

The sections, were washed in phosphate saline buffer (PBS) 0.1M, pH 7.3, for 15 min and incubated in the following solutions: 10% normal goat serum (Vector Labs) in 0.3% Triton-X PBS for 30 min; antisera against GAD⁶⁷ or GABA-T in PBS for 48 h at 4°C ; biotinylated rabbit anti goat Igg (for GAD⁶⁷ antiserum) (Vector Labs., Inc.) for 60 min; Vectastain reagent (Vector Labs., Inc.) for 60 min; DAB/H₂O₂ for 5 min. After the peroxidase reactions the sections were air dried and examined using a light microscope. Primary antisera against GAD⁶⁷ was raised in goat and used at dilutions of 1:500-1:2000 and GABA-T

was raised in rabbit and used at dilutions of 1:2000-1:4000 .

The specificity of anti-GAD and anti-GABA-T serum have been extensively verified^{16,17}. Also control experiments using the normal rabbit serum or PBS instead of the GAD antiserum, and normal goat serum or PBS instead of the GABA-T antiserum were performed.

RESULTS

GAD-like immunoreactivity (GAD-LIR)

GAD-like immunoreactivity was confined to the sensory hair cell cytoplasm (Fig 1A,B) The same distribution were found throughout the sensory epithelia in both cristae and maculae in all specimens studied. Type I and type II hair cells showed no differences in their staining intensity . No immunoreactivity was found neither in supporting cells nor in fibers. Furthermore no immunoreactivity was found in the vestibular ganglion (Fig 3A).

GABA-T-like immunoreactivity (GABA-T-LIR)

GABA-T like immunoreactivity was localized within the afferent calices ,which surround the hair cells type I (Fig 2 A,B) in some hair cell cytoplasm and some fiber which run through the stroma . In both cristae and maculae, immunoreactive cells were evenly distributed throughout the sensory epithelium . However, in the region of the vestibular ganglion , ganglion cells showed varied immunoreactivity (Fig 3B) .

Discussion

This is the first report in the literature to study simultaneously by immunocytochemistry the enzymes of synthesis and degradation (GAD and GABA-T) in a mammalian vestibule.

The findings of GAD-like immunoreactivity, obtained in our study are consistent with those described recently in the chick¹⁴. The fact that GAD-like immunoreactivity was confined to the hair cells cytoplasm suggest that GAD is there with the purpose of synthesizing GABA. The immunocytochemical evidence obtained in the present experiments support our recent biochemical data^{1,5,6,8,12,13} indicating that GABA is synthesized by GAD in the sensory hair cell fact given support by our demonstration of the presence of GABA like immunoreactivity in the guinea pig vestibular hair cell cytoplasm⁷.

GABA-T-like immunoreactivity was found in some hair cells cytoplasm, nerve calyx, some nerve fibers running through the stroma and the vestibular ganglion cells. This distribution resemble our previous data of GABA-like immunoreactivity in the guinea pig vestibular cristae ampullaris⁷, but not the distribution of GABA-T like immunoreactivity in the chicken (GABA-T-like immunoreactivity around the vestibular hair cells, some nerve fibers through the stroma and ganglion cells)¹⁴. This difference was not unexpected because in the case of the GABAergic system, the release of GABA by nerve terminal and its subsequent binding to any of its receptor must be followed by a rapid inactivation of the transmitter in

order that the sensitivity of the mechanism be retained. This inactivation process is, in all probability the active uptake system for GABA which has been reported in other systems in addition to the vestibular endorgans¹⁰. Evidently, GABA in the synaptic cleft is taken up into three morphologically distinct sites: the presynaptic neuron, postsynaptic neuron, and surrounding glial cells. In the case of the guinea pig vestibule the distribution of GABA-I-like immunoreactivity may go through the following dynamics: the release of GABA by the hair cell and its subsequent binding to any of its receptors¹¹ must be followed by a rapid inactivation (an active uptake system)¹⁰ and then be metabolized by the action of the GABA-I within the hair cell, or the nerve calyx. The immunoreactivity in the ganglion cells indicates that the primary afferent neuron contains GABA-I. Such localization of GABA-I-like immunoreactivity is compatible with its role as a GABA-degrading enzyme removing GABA from its site of action.

In conclusion these immunocytochemical results suggest that GABA is not only accumulated and synthesized in the hair cells cytoplasm, but also released and degrade in these compartments. The existence of GABA-like immunoreactivity, GAD-like immunoreactivity and GABA-I like immunoreactivity in addition of our previous biochemical data strongly support our steady postulate of GABA has the putative afferent neurotransmitter in the vestibular system.

ACKNOWLEDGEMENTS

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACyT) partially supported this work through a Doctorate scholarship to I.L. and Grant 20441 to G.M. We wish to thank Ms Ma.Teresa Cortez for her excellent technical assistance in this study . Mr Rodolfo Paredes provided photographic assistance .

REFERENCES

- 1.- Acuña, D., Aceves, C., Anguiano, B. and Meza, G . Vestibular site of action of hypothyroidism in the pigmented rat,. Brain Research (1990) 133-138 .
- 2.- Didier, A., Dupont, J. and Cazals, Y., GABA immunoreactivity of calyceal nerve endings in the guinea pig vestibule. Cell and Tissue Res. 260 (1990) 415-419 .
- 3.- Flock, A. and Lam, D.M.K., Neurotransmitter synthesis in inner ear and lateral line sense organs, Nature (Lond.),249(1974) 142-144 .
- 4.- Felix, D. and Ehrenberger, K.,The action of putative neurotransmitter substances in the cat labyrinth.Acta Otolaryngol (Sotckh.). 93(1982) 101-105 .
- 5.- Iturbe, A.G. and Meza,G., Asymmetrical development of GABA and acetylcholine synthesis in guinea pig vestibule. Int. J. Neurosci. (1990) 4(suppl) : 532 .
- 6.- López, I. and Meza, G. Comparative studies on glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase activities in the vertebrate vestibule. Comp. Biochem. Physiol. 95B : 375-379 .
- 7.- López, I., Juiz, J.M., Altschuler, R.A. and Meza, G Distribution of GABA-like immunoreactivity in guinea pig

vestibular cristae ampullaris. Brain Research, (1990) 530,170-175..

8.- López,I. and Meza,G., Neurochemical evidence for afferent GABAergic and efferent cholinergic neurotransmission in the frog vestibule., Neuroscience 25 (1988) 13-18 .

9.- Meza,G., Carabez,A. and Ruiz, M.,. GABA synthesis in isolated vestibular tissue of chick inner ear, Brain Research,241(1982) 157-161 .

10.- Meza,G., Characterization of GABAergic and cholinergic neurotransmission in the chick inner ear. In D.G. Drescher (Ed.), Auditory Biochemistry, Charles, C Thomas, Springfield Ill,1985 pp 80-111 .

11.- Meza, G., Gonzalez-Viveros, M.I. and Ruiz, M., Specific [³H]-aminobutyric acid binding to vestibular membranes of the chick inner ear, Brain Research, 337 (1985) 179-183 .

12.- Meza,G. and Hinojosa, R., Ontogenetic approach to cellular localization of neurotransmitters in the chick vestibule. Hearing Research 28(1987) 73-85 .

13.-Meza,G., Lopez,I., Paredes,M.A., Peñaloza,Y. and Poblano,A., Cellular target of streptomycin in the internal ear. Acta Otolaryngol (Stock) 107 (1989) 406-411 .

14.- Usami, S.,Hozawa, J.,Iazawa, M., Igarashi, M., Thompson, G. C, W,J-Y. and Wenthold, R.J. Immunocytochemical study of the

GABA system in chicken vestibular endorgans and the vestibular ganglion . Brain Research, 503 (1989) 214-218 .

15.- Usami, S., Igarashi, M. and Thompson, G. C., GABA-like immunoreactivity in the squirrel monkey vestibular endorgans, Brain Research, 417(1987) 367-370 .

16.- Wu, J.Y., Lin, C.T., Hwang, B.,Lin, H.S. and Wei, S., Antibodies against enzymes synthesizing amino acids transmitters. In P. Panula, H. Palvaerintia and S. Soinila (Eds.), Neurochemistry: Modern Methods and Applications, Alan, R. Liss, New York, 1986, pp. 21-47 .

17.- Wu, J.Y.,Lin, C.T.,Lin, H.,Xu, Y.,Liu, J .W., Hwang,B.H. and Wei, S.C., Immunocytochemical characterization and immunohistochemical localization of glutamate decarboxylase and GABA transminase in peripheral tissues. In S.L. Erdo and N.G. Bowery (Eds.), GABAergic Mechanism in the Mammalian Periphery, Raven Press , New York , 1986 , pp. 19-34 .

FIGURES

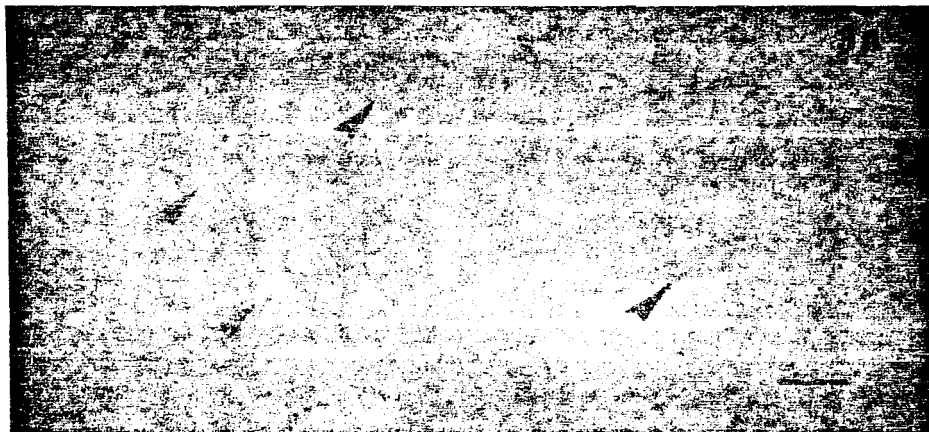
Fig.1 GAD-like immunoreactivity in the guinea pig vestibular endorgans. A: immunoreactive hair cells are evenly distributed throughout the sensory epithelia of the cristae ampullaris (X 400). Bar = 20 um(B) higher magnification view of A. Immunoreactivity is confined to the hair cell cytoplasm (X1000).Bar = 10 um .

Fig.2 GABA-I-like immunoreactivity in the guinea pig vestibular endorgans. A : immunoreactivity is found in the hair cell cytoplasm, around the hair cells and along nerve fibers (arrowheads) (X400). Bar = 20 um (B) high magnification view showing immunoreactivity distributed in the hair cell cytoplasm around the hair cell and in some nerve fibers(X1000).Bar = 10 um.

Fig.3A Abscense of GAD like immunoreactivity in the vestibular ganglion. section from the ganglia of the same animal processed by GAD immunocytochemistry as in fig 1, demonstrates no GAD-like immunoreactivity (X 400) . Bar = 10 um (B) GABA-T like immunoreactivity in the vestibular ganglion .Section of the same ganglion showing a view of the vestibular ganglion cells. Almost all cells show GABA-T-like immunoreactivity (X 400).Bar = 10 um .







TRABAJO IV

ChAT and AchE distribution in the guinea pig vestibular endorgans: immunocytochemical and cytochemical study.

Iván López¹, Louis, B. Hersh² and Graciela Meza¹.

¹Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico D.F., Mexico. and ²Southwestern Medical Center at Dallas, The University of Texas, Dallas, Texas U.S.A.

Author for correspondence

G. Meza

Departamento de Neurociencias

IFIC, UNAM

Apartado Postal 70-600

04510 Mexico D.F., Mexico.

ChAT and AChE localization in vestibule

SUMMARY

Using pre-embedding and post-embedding immunocytochemical techniques with a polyclonal antibody against choline acetyltransferase (ChAT), we localize ChAT-immunostained efferent nerve endings below the hair cells of the utricular macula and cristae ampullaris at light microscopy level. By histochemistry we found an active system of degradation (AChE activity) below the hair cells in the supporting cells area. These results add strong evidence that acetylcholine is a transmitter in the efferent vestibular system.

INTRODUCTION

In the sensory epithelium, the vesiculated efferent endings contact either type II hair cells directly (axosomatic synapses) or the calyces of type I hair cells and afferent fibers (axodendritic synapses). There is considerable evidence that synaptic transmission at the efferent synapses of vertebrate vestibular hair cells is chemical in nature. Inhibitory postsynaptic potentials was demonstrated in hair cells with efferent fiber stimulation (Flock and Russel 1973 ; Gleissner, and Henriksen, 1963). However; in mammals recent studies suggested that its peripheral action is more complex than hitherto suspected (Dechesne and Sans, 1980) as in the squirrel monkey it has been demonstrated an excitatory effect on vestibular afferent by stimulation of the efferent vestibular neurons (Goldberg and Fernandez , 1980) .

Several studies have suggested that acetylcholine acts as the efferent transmitter .Efferent terminals of putative cholinergic nature in the vestibular system exert a tonic inhibitory influence upon the efferent activity arising from the vestibular receptor (Barnard, Lochman, and Precht, 1985 ; Caston and Russell, 1984; Guth, Norris, Guth, S., Guine and Williams, 1986 ; Valli, Costa, and Zucca, 1984).

Histochemical experiments describe the presence of acetylcholinesterase (AChE), the ACh hydrolyzing enzyme, at the efferent level in the vestibular sensory of most vertebrate (Ishii, Murakami, and Balogh, 1967; Iurato, Luciano, Pannese and Reale, 1971; Luciano et al., 1971; Raffi-Jean, Lyon

and Gacek, 1987; Usami, Igarashi and Thompson, 1987). Additionally neurochemical experiments demonstrate the existence of AChE activity in a membranal fraction in the chick and frog vestibule(Meza, 1985; López and Meza 1989). A sodium and energy dependent mechanism for [³H]choline uptake and a Ca-dependent release of ACh was reported in the complete labyrinth of the frog (Meza and Lopez,1985).

Retrograde transport of [³H]choline, the ACh precursor, by the efferent synapses has been demonstrated in the cat labyrinth (Dememes, Raymond and Sans, 1983) . Choline acetyltransferase (ChAT), the enzyme responsible for synthesizing ACh, has been shown to be present in most vertebrate groups vestibular homogenates (Flock and Lam, 1974; Meza, Lopez and Ruiz, 1984 ; Meza and Hinojosa, 1987; Lopez and Meza, 1988 y 1989; Lopez et al, 1990; Acuña, Aceves, Anguiano and Meza, 1990). Some experimental manipulations suggest that ACh synthesis takes place in the vestibular efferent boutons . By developmental studies which showed that ChAT activity appeared in the vestibular guinea pig, rat and chick sensory periphery at the moment the efferent terminal reached the neuroepithelium and increased when these terminals augmented in number. (Iturbe, and Meza, 1986 ;Meza, 1986; Meza, et al., 1987; Meza and Hinojosa, 1987).Additional evidence is provided by the disappearance of ChAT activity in the periphery after efferent bouton-degeneration caused by frog-ight nerve excision (López and Meza, 1988). Regarding the origin and

course of efferent vestibular pathways in mammals have been precisely described by the use of retrograde transport (Strutz, 1982) neurochemical (Godfrey, Park, and Ross, 1984) and immunocytochemical methods (Schwarz, Satoh, Hu and Fibiger, 1986; Carpenter, Chang, Pereira, Hersh, Bruce, and Wu, 1987; Carpenter et al., 1987; Perachio and Kevetter, 1989).

However a reliable anatomical mapping of cholinergic fibers and synapses in the vesicular endorgans has never been followed by immunocytochemical methods.

Since we have biochemically localized a putative efferent cholinergic system in some vertebrate species, we felt it would be important to investigate the localization of choline acetyltransferase (CHAT)-like immunoreactivity (CHAT-LIR), a specific marker of cholinergic neurons in the vestibular end organs, and the presence of the AChE degrading enzyme acetylcholinesterase (AChE) by histochemistry since it has been considered an exclusive property of efferent elements. In order to contribute to the correct localization of the ACh system in vestibular sensory periphery, in the present report, we will describe our CHAT-LIR findings in guinea pig vestibular end-organs at the light microscopy level using a CHAT antiserum whose properties have been described extensively (Bruce, Wainer and Hersh, 1985) and the AChE localization by histochemistry at light microscopy level and compare the distribution of these two markers.

MATERIAL AND METHODS

Immunohistochemistry

Light microscopy. Six healthy (both sexes) young pigmented guinea pigs (*Cavia cobaya*) (200-250 g. weight) were used in this study. They were over anesthetized with chloral hydrate (1.2 g/kg weight), exsanguinated transcardially with 100 ml of phosphate-buffered saline (PBS), followed by 4% paraformaldehyde/0.1 glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate (pH 7.4) deliver over a 15 min time period. At the end of the perfusion the auditory bulbae were opened and the vestibular organs were removed and post fixed in the same fixative at 4°C for 2 hr. They were then placed in 10% sucrose-cacodylate buffer at 4°C for 3 hr, and then transferred to 30% sucrose-cacodylate buffer overnight.

For the cryostat sectioning step it was necessary to embed the fragile organs in Polyfreeze (embedding medium for frozen section, Polysciences) at room temperature, oriented in a suitable position, frozen quickly with dry ice. Pyramids can then be made and cut containing the organ in the desired orientation. The frozen tissue was cut in cross section using cryostat at a thickness of 15-20 μ m and the resulting sections were mounted on slides coated with gelatin. Alternatively some specimens fixed as describe above were included in Paraplast-paraffin and semi thin sections were obtained (3-4 micron).

The sections, were washed in PBS for 15 min and incubated in the following solutions: 5% normal goat serum (Vector Labs) in 0.3% Triton X-PBS for 30 min; antisera

against ChAT in PBS for 96 hrs at 4⁰; biotinilayed goat anti-rabbit IgG(Vector Labs., Inc) for 60 min; Vectastain reagent(Vector Labs., Inc) for 60 min; DAB/H₂O₂ for 5 min. After the peroxidase reaction the sections were air dried overnight and examined using a light microscope . Primary antisera against ChAT was raised in rabbit and used at dilution of 1:2000 .

Control sections were processed in exactly the same way, except that normal rabbit serum or preimmune serum was substituted for the primary antibody.

AChE histochemistry : Some cristae ampullaris were processed for AChE using the Koelle and Friedenwald (1949) method with some modifications(Paxinos G and Watson Ch.1982).In brief the whole cristae were incubated in a substrate mixture containing 4 mM acetylthiocholine, 10 mM glycine and 2 mM cooper sulfate in 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.0) for 1 h. Ethopropazine (0.2 M SIGMA, SLMU) was included in the substrate mixture to inhibit non-specific cholinesterases. The reaction were developed immersing the cristae in 40 mM sodium sulfide(pH 7.8) for 1 min. Then , it was rinse again four times for five minutes each in sodium cacodylate buffer, pH 7.4 0.1M,dehydrated with graded alcohols, treated with xylene and included in Paraplast-paraffin (Polysciences).Three micron sections were obtained and dewax with xylene and mounted or counterstained with cresyl violet .

RESULTS

Localization of ChAT-LIR in the vestibular end-organs:
ChAT-LIR efferent nerve endings in the vestibular end organs were seen in the macula utriculi and occasionally in the cristae ampullaris. Many of them were located in the connective tissue layer beneath the sensory epithelium, some of which entered the sensory epithelia layer (Fig 1.). At higher magnification ChAT-LIR was found at the base of the hair cells (at the base of the afferent calix) and some fiber running through the stroma (Fig 2). No immunoreactive staining was seen when pre-immune serum was used instead of the primary antiserum (Fig 3).

AChE distribution: The AChE localization procedure employed resulted in a dark brown precipitate restricted to the base of the stroma and the base of the hair cells, within the supporting cells (Fig 4.). When the reaction was developed for more than three minutes some nerve fiber running through the stroma were stained, but high background appear in the base of the stroma (not show).

DISCUSSION

The results of this study show ChAT-LIR in the efferent terminals in the guinea pig vestibular end organs. Since ChAT is a specific marker for cholinergic neurons these findings are strong evidence that ACh is a transmitter in the efferent system. The general distribution and intensity of AChE stained in the vestibular endorgan of the guinea pig were

observed to be in good agreement with previous mapping studies . Furthermore, the localization of ChA1-LIR in efferents matches well with the AchE distribution in adjacent sections . It is possible however that there are efferent fibers and terminals that stain for AchE but do not use Ach as a neurotransmitter, in this respect AchE has been demonstrated to have a peptidase activity and the degradation of some peptides in the efferent system might be achieved by the AchE (Chubb, Hodgson and White, 1980 ; Chubb et al 1983).

In conclusion our findings of ChA1-LIR in the efferent system add evidence support our previous biochemical findings of acetylcholine as the putative efferent neurotransmitter in the vestibular sensory periphery. It not may be the only neurotransmitter of these system since its has been recently shown the existence of CGRP-like immunoreactivity in cell bodies and efferent nerve endings , suggesting a possible coexistence of these two neurotransmitters. Physiological and pharmacological studies are necessary to determine if and how Ach, CGRP or other , peptides function as cotransmitters in the efferent system .

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) partially supported this work through a Doctorate scholarship to I. L. and Grant 20441 to G. M. We wish thank Ms Ana Luisa Pira for their help in the implementation of the AchE histochemistry technique, Mrs Ma. Teresa Cortez, Mr Rodolfo Paredes for their excellent technical assistance. The funds to generate the LHA1 antisera were provided by the Alzheimer's Disease and Related Disorders Assoc. Inc.

REFERENCES

- Acuña, D., Aceves, C., Anguiano, B., and Meza, G. (1990) Vestibular site of action of hypothyroidism in the pigmented rat. *Brain Research* 133-138 .
- Bernard, C., Cochran, S. L., and Precht, W. (1985) Presynaptic actions of cholinergic agents upon the hair-cell afferent fiber synapse in the vestibular labyrinth of the frog. *Brain Research* 338:225-236.
- Bruce, G., Wainer, B.H., and Hersh, L.B. (1985) Immuno affinity purification of human choline acetyltransferase: Comparison of the brain and placental enzymes. *J. Neurochem.* 45 : 611-620 .
- Carpenter, M.B., Chang, L., Ferreira, A.B., Hersh, L.B., Bruce, G., and Wu, J-Y. (1987) Vestibular and cochlear neurons in the monkey identified by immunocytochemical methods. *Brain Research* 406 : 275-280 .
- Carpenter, M.B., Chang, L., Ferreira, A.B., and Hersh, L.B. (1987) Comparisons of the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in the vestibular nuclei of the monkey and rat. *Brain Research* 418 : 403-408 .
- Caston, J., and Rousell, H. (1984) Curare and the efferent vestibular system. *Acta Otolaryngol (Stockh.)*. 97 : 19-26.

Chubb, I. W., Hodgson A. J. and White, G.H. (1980) Acetylcholinesterase hydrolyzes substance P. Neuroscience 5 : 2065-2072 .

Chubb, I.W., Ranieri, E., White, G.H. (1980) The enkephalins are amongst the peptides hydrolysed by purified acetylcholinesterase. Neuroscience 10 : 1369-1377 .

Dechesne, C. and Sans, A. (1980) Control of the vestibular nerve activity by the efferent system in the cat. Acta Otolaryngol (Stockh.). 90:82-88.

Demenes, I., Raymond, J., and Sans, A. (1983) Selective retrograde labelling of vestibular efferent neurons with [³H] choline. Neuroscience 8 : 285-290 .

Flock, A., and Russel, I. (1973) Postsynaptic action of efferent fibers on hair cells. Nature New Biol 243: 89-95.

Flock, A., and Lam, D. (1974) Neurotransmitter synthesis in the inner ear and lateral line sense organs. Nature 249 : 142-144.

Gleissner, L., and Henrikson, N. C. (1963) Efferent and afferent activity pattern in the vestibular nerve of the frog. Acta Otolaryngol. SUPPL. 192 : 90-103.

Godfrey, D.A., Park, J.L., and Ross, D.C. (1984) Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in centrifugal

labyrinthine bundles of rats. Hearing Res. 14 : 93-106 .

Goldberg, J. M. and Fernandez, C. (1980) Efferent vestibular system in the squirrel monkey : anatomical location and influence on afferent activity. J. Neurophysiol. 43 : 986-1025 .

Guth, P., Norris, C.H., Guth, S.L., Guine, D.B. and Williams, W.H. (1966) Cholinomimetics mimic efferent effects on semicircular canal afferent activity in the frog. Acta Otolaryngol (Stockh.). 102 : 194-203.

Ishii, I., Murakami, Y., and Balogh, K. (1967) Acetylcholinesterase activity in the vestibular sensory areas. Ann. Otol. 76 : 69-82 .

Iurato, S., Luciano, L., Fannese, E., and Reale, E. (1971) Acetylcholinesterase activity in the vestibular sensory areas. Acta Otolaryngol (Stockh.). 71 : 147-152 .

Iurato, S., Luciano, L., Fannese, E., and Reale, E. (1971) Histochemical localization of acetylcholinesterase (AChE) activity in the inner ear. Acta Otolaryngol. Supp. (Stockh.). 279 : 1-50.

Iturbe, A.G., and Meza, G. (1986) Asymmetrical development of GABA and acetylcholine synthesis in guinea pig vestibule. Int. J. Neurosci 4: 532 .

Koelle, G.C., and Friendwald, J.S. (1949) A histochemical method

for localizing cholinesterase activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70, 617-622.

López, I., and Meza, G. (1988) Neurochemical evidence for afferent GABAergic and efferent cholinergic neurotransmission in the frog vestibule. Neuroscience. 25 :13-18 .

López, I., and Meza, G. (1989) Some properties of frog vestibular choline acetyltransferase and acetylcholinesterase. Neurochemical Research. 14 :113-118 .

López, I., and Meza, G. (1990) Comparative studies on glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase activities in the vertebrate vestibule. Comp. Biochem. Physiol. 95B : 375-379 .

Meza, G., López, I. and Ruiz, M. (1984) Possible cholinergic neurotransmission in the cristae ampullares of the chick inner ear. Neurosci. Lett. 49 : 93-98 .

Meza, G. (1985) Characterization of GABAergic and cholinergic neurotransmission in the chick inner ear, In: Auditory Biochemistry Drescher, D.G. Ed. Charles C. Thomas, Springfield Ill, pp.80-101.

Meza, G., and López, I. (1985) Characterization of cholinergic neurotransmission in the frog vestibule, J. Neurochem. 44 : 589c.

Meza, G. (1986) Desarrollo asimétrico de la síntesis de GABA y

acetilcolina en el vestibulo, Bol. Med Hosp. Inf. Mex. 45 : 65 .

Meza, G. and Hinojosa, R. (1987) Ontogenetic approach to cellular localization of neurotransmitters in the chick vestibule. Hearing Res. 28 : 73-85 .

Paxinos, G., and Watson Ch. (1982) The rat brain in stereotaxic Coordinates. G. Paxinos Ed. pp 1-3. Acc Press New York.

Perachio, A. and Nevetter, G.A. (1989) Identification of vestibular efferent neurons in the gerbil: histochemical and retrograde labelling. Exp. Brain Research 78 : 315-326 .

Raffi-Jean, O., Lyon, J., and Gacek, R. (1987) Esterase activity in cat vestibular end organs. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 113 : 543-546.

Schwarz, D.W.F., Satoh, I.E., Hu, K. and Fibiger, H.C. (1986) Cholinergic innervation of the rat's labyrinth. Exp. Brain Research 64 : 19-26 .

Strutz, J. (1982) The origin of efferent vestibular fibers in the guinea pig. Acta Otolaryngol. 94 : 299-305 .

Tanaka, M., Takeda, N., Senba, E., Tohyama, M., Kubo, T and Matsunaga, T. (1989) Localization, origin and fine structure of calcitonin gene-related peptide-containing fibers in the vestibular end organs of the rat. Brain Research 504 : 31-35 .

Usami, S., Igarashi, M. and Thompson, G.C. (1987) GABA-like immunoreactivity in the chicken vestibular end-organs. Brain Research. 418 : 383-387 .

Valli, P., Costa, J., and Zucca, G. (1984) Local mechanism in vestibular receptor control. Acta Oto-laryngol (Stockh .) . 102 : 194-203 .

FIGURES

Figure 1A ChAT-LIR in the guinea pig utricular macula
Light-field photomicrograph showing the presence of ChAT-LIR
in some efferent nerve ending at the base of the hair cells
in the cristae ampullaris. (X 400).Bar = 20 um.(B) Higher
magnification of the same section showing the fibers
efferent bouton like below the hair cells type I and II (arrow
head) (X 1000).bar = 10 um .

Figure 2 A. ChAT-LIR in the guinea pig utricular macula at
higher magnification showing the efferent bouton like strongly
immunoreactive (Serial section from fig 1A)(X 1000).Bar =10 um.

Figure 3 Control section from the same utricular
macula as in a demonstrates no ChAT-LIR. (Serial section
from fig 1A) (X 400).Bar =20 um.

Figure 4A AchE staining in the guinea pig cristae ampullares.
AchE-positive staining is found at the base of the hair cells
(X 100).Bar = 20 um .(B)Higher magnification of the same
sections showing the precipitate at the base of the hair
cells (X 1000).Bar 10 um.



