

Características morfológicas y electrofisiológicas de las neuronas del ganglio vestibular en cultivo

Enrique Soto,* Agenor Limón,* Aída Ortega,* Rosario Vega*

Recepción versión modificada 28 de mayo del 2001; aceptación 28 de mayo del 2001

Resumen

Las neuronas aferentes vestibulares han sido clasificadas en regulares e irregulares con base en su descarga espontánea, excitabilidad y respuesta ante estímulos eléctricos. Estas diferencias han sido atribuidas a las características de la entrada sináptica, sin embargo, se desconoce la participación de las propiedades intrínsecas de las neuronas aferentes en la generación de su patrón de actividad. Para estudiar estas propiedades hemos desarrollado cultivos primarios de las neuronas aferentes vestibulares.

Las células del ganglio vestibular de la rata se cultivaron sobre superficies tratadas con poli-D-lisina o colágeno usando los medios de cultivo L-15 o Neuro-basal®. A las 48 hrs en cultivo las neuronas proyectaron neuritas de longitud variable. Su estructura se estudió usando anticuerpos contra neurofilamentos de 160 kDa de peso molecular. La mayoría de las células tuvieron forma bipolar (63.9 %); también se observaron neuronas monopares (30.6 %) y multipares (5.5 %). Con la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa se registraron las corrientes iónicas y la respuesta de las células ante estímulos eléctricos. Se caracterizaron las propiedades biofísicas de la corriente de Na⁺ sensible a tetrodotoxina. Encontramos que las células en cultivo descargan potenciales de acción en respuesta a la estimulación eléctrica, y que generan actividad repetitiva en presencia de 4-aminopiridina. Los resultados nos permiten concluir que el cultivo primario es un modelo biológico adecuado para discernir los mecanismos que determinan las propiedades de descarga de las neuronas aferentes vestibulares.

Palabras clave: Oído interno, aferentes vestibulares, codificación sensorial, corriente de sodio, fijación de voltaje, cultivo primario.

Summary

Vestibular afferent neurons have been classified on the basis of their spontaneous activity as regular and irregular; this has been attributed to their synaptic input, but it remains to be defined the participation of some intrinsic properties of the afferent neurons in the determination of their discharge pattern.

In this work, we have developed tissue cultures of the rat vestibular ganglia. Isolated cells were plated using poly-D-lysine or collagen as substrates and L-15 or Neurobasal® as culture media. After 48 hrs cells in the four experimental conditions give forth neurites of variable longitude. By using antibodies against the neurofilaments 160 kDa the cell structure was studied. Monopolar (30.6 %), bipolar (63.9 %) and multipolar (5.5 %) cells were found. By using the voltage and current clamp procedures the voltage dependence and kinetics of the tetrodotoxin sensitive Na⁺ current was fully characterized. Cultured cells were shown to generate action potentials under electrical stimulation, and they were capable of repetitive spike discharge under the influence of 4-aminopyridine.

These results demonstrate that tissue cultures constitute an excellent system to study the intrinsic properties of vestibular afferent neurons.

Key words: Inner ear, vestibular afferent neurons, sensory coding, sodium current, voltage clamp, primary culture.

* Instituto de Fisiología de la Universidad Autónoma de Puebla, Apartado Postal 406, Puebla, Pue. 72000 México.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Enrique Soto, Instituto de Fisiología, BUAP. Apartado Postal 406, Puebla, Pue. 72000, México. Tel: (2) 229 5500 ext 7310, Fax: (2) 233 4511, Email: esoto@siu.buap.mx

Introducción

Las neuronas aferentes vestibulares, cuyos cuerpos celulares se localizan en el ganglio de Scarpa, hacen sinapsis periférica con las células ciliadas y, a nivel central, con las neuronas de los núcleos vestibulares en el tallo cerebral y con neuronas del cerebelo.¹ La actividad eléctrica de las neuronas aferentes vestibulares tiene una dinámica compleja que varía en función de las aceleraciones tanto lineales como angulares, llevando información acerca de los movimientos y de la posición de la cabeza a las áreas del sistema nervioso central involucradas en el control de la postura y del movimiento de los ojos.²

Estudios morfológicos realizados por Lorente de Nó, en 1926,³ evidenciaron la heterogeneidad de las fibras vestibulares con diámetros entre 2 y 13 μm . Investigaciones recientes^{4,5,6} sugieren que esta heterogeneidad refleja la existencia de vías que por sus propiedades electrofisiológicas contribuyen a la segregación de la información sensorial.

Las propiedades de descarga del nervio vestibular han sido descritas en varios modelos de mamíferos^{1,7,8,9} y vertebrados inferiores.^{10,11} En la mayoría de las especies, se han identificado distintas clases de neuronas con base en la regularidad de su descarga y su sensibilidad a la estimulación eléctrica. Se ha encontrado una relación entre la morfología, la inervación y las propiedades de descarga de las neuronas aferentes;^{6,7,12} sin embargo, no se ha podido determinar en qué grado contribuye cada uno de estos factores en la definición de los patrones de actividad de estas neuronas.

Aun cuando existen registros de corrientes iónicas de neuronas del VIII par craneal en mamíferos, la mayoría se han realizado en neuronas provenientes del ganglio espiral. Pocos son los estudios hechos en neuronas aferentes vestibulares.¹³⁻¹⁷ En neuronas del nervio sacular del pez dorado se han descrito cuatro tipos de canales de potasio, tres de ellos dependientes del voltaje a los cuales se les denominó según su conductancia como: K(32), K(19) y K(12), y un cuarto tipo de canales activados por calcio, con una conductancia de 113 a 230 pS, probablemente de tipo *Big K*.¹³ En neuronas del ganglio vestibular de ratón se ha reportado una corriente iónica de Na^+ sensible a tetrodotoxina

(TTX),¹⁵ así como corrientes de calcio que se activan a altos voltajes (HVA: high voltage activated) que corresponden probablemente a canales de Ca^{2+} de tipo L, N, P y Q.^{14,16}

Registros en el soma de células aisladas del ganglio vestibular del pollo en los días embrionarios 3-4, 6 y 11, han demostrado que estas neuronas presentan una conductancia de Na^+ sensible a TTX. Las corrientes salientes y las respuestas dependientes de voltaje variaron de acuerdo con la etapa de desarrollo; sin embargo, las neuronas no descargaron potenciales de acción ante la estimulación eléctrica.¹⁷

En nuestro laboratorio hemos descrito 5 tipos de corrientes iónicas en neuronas aferentes vestibulares aisladas en forma aguda del axolotl (*Ambystoma tigrinum*):^{11,18} tres corrientes salientes de potasio (transitoria de salida $I_{K,A}$, rectificador retardado $I_{K,DR}$ y dependiente de Ca^{2+} $I_{K,Ca}$). Una corriente rectificadora de entrada de tipo I_{K1} y una corriente de Na^+ . Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios donde se describa la presencia de potenciales de acción en neuronas aisladas del ganglio vestibular y, menos aún, el registro de las corrientes iónicas y de los cambios de voltaje asociados a estas corrientes durante la estimulación eléctrica en una misma neurona.

Los cultivos de tejidos se han usado como una herramienta que ha permitido estudiar de manera muy precisa las propiedades de diversos tipos celulares. En este trabajo pretendemos determinar las propiedades morfológicas y electrofisiológicas de las neuronas aferentes vestibulares en cultivo, con el fin de definir si los cultivos celulares son un modelo biológico viable para el estudio de las características electrofisiológicas de las neuronas aferentes vestibulares.

Material y métodos

Para los experimentos se usaron ratas Wistar neonatas (P5-P9) sin distinción de sexo. Las ratas fueron anestesiadas con cloroformo y sacrificadas por decapitación. Posteriormente, se abrió la bóveda craneana, se eliminó el encéfalo y se expusieron los nervios vestibulares, resecaando entonces los ganglios vestibulares. Los tejidos se incubaron en medio de cultivo L-15 (Gibco) adicio-

nado con colagenasa 0.125% y tripsina 0.125% por 30 min a 37° C. Posteriormente los ganglios se lavaron con solución extracelular sin Ca⁺² ni Mg⁺², y se disociaron por agitación mecánica. Las células disociadas se colocaron en cajas de cultivo (Nunc 35 mm) cubiertas con poli-D-lisina (Sigma) o colágeno, y con medio de cultivo Neurobasal® (Gibco) adicionado con suero bovino fetal (SBF) 10 % (Gibco) y glutamina 0.05 mM (Gibco) o medio L-15 modificado para CO₂, suplementado con NaHCO₃ 10 mM, Hepes 10 mM y SBF 10%. A ambos medios se les agregó penicilina 100 UI/ml (Merck) y Fungizone® en dilución 1:100 (Gibco). Las células se incubaron a 37° C, en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en una estufa de incubación con control de CO₂ y regulación de temperatura de alta precisión (Nuair). En todos los casos se sembraron las neuronas provenientes de 4 ganglios en cada caja. En algunos experimentos se colocaron en el fondo de las cámaras de cultivo cubreobjetos pretratados con el substrato a fin de observar adecuadamente la morfología neuronal y realizar las pruebas de inmunocitoquímica.¹⁹

Identificación celular

Para identificar a las neuronas en el cultivo se usaron técnicas de inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal (IgG) de la clona BF-10 contra neurofilamentos de mediano peso molecular (NF-160 kDa; Boehringer Mannheim).^{20,21} Las células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio se fijaron por 30 min con paraformaldehído al 4% en solución buffer salina (PBS). Posteriormente se lavaron con PBS 0.1 M, pH 7.4 y suero fetal de carnero adicionado con 0.03% de Tritón X-100. Las preparaciones se incubaron por 1 hr a temperatura ambiente en una cámara húmeda con el anticuerpo contra NF-160 kDa en concentración 5 µg/ml disuelto en PBS 0.1 M pH 7.4 con Tritón X-100 al 0.03%. Posteriormente, las preparaciones se lavaron y se incubaron por 60 min a 37° C en la cámara húmeda con el anticuerpo policlonal (F'ab2) contra inmunoglobulinas de ratón, conjugado con fluoresceína. En todos los casos se realizaron controles en los que se omitió el primer anticuerpo. Finalmente, se aplicó resina (VectaShield®) sobre los cubreobjetos y se sellaron con portaobjetos para su obser-

vación en el microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioplan), usando filtros de emisión de 520 nm y de excitación de 490 nm.

Morfología celular

Luego de 48 hrs en cultivo se cuantificaron las siguientes características morfológicas de las neuronas inmunorreactivas: diámetro del soma neuronal, longitud neurítica, número de prolongaciones que emergen del soma y número de ramificaciones.

Para el análisis de la morfología celular se utilizó una cámara de video con tubo intensificado (SIT) (Hamamatsu C24000). Las imágenes se llevaron a la computadora mediante una tarjeta digitalizadora de video (Data Translation 6800). La adquisición y el análisis de las imágenes se realizaron usando el programa Global Lab Image 2.0 (Data Translation).

Todos los resultados se reportan como la media ± el error estándar (ES). Para todas las comparaciones entre los resultados se usó la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls, considerando como significativa una p<0.05 y altamente significativa una p<0.001.

Viabilidad celular

El número de células vivas se determinó por la técnica de exclusión de azul tripano. Se ha demostrado que las células con integridad funcional y anatómica de la membrana celular excluyen este colorante; por lo tanto, el conteo del número de células teñidas en función del total de células permite calcular el porcentaje de supervivencia. También se usaron los datos acerca del número total de células inmunorreactivas al anticuerpo contra neurofilamentos para el conteo del número total de neuronas en las diferentes condiciones en cultivo. La significación estadística de los datos en las diferentes condiciones experimentales se determinó mediante la prueba t de Student considerando como significativa una p<0.05 y altamente significativa una p<0.001. Los resultados se presentan como la media ± error estándar.

Registro electrofisiológico

Las cajas de cultivo se llevaron a un invertoscopio (Nikon, Diaphot) con iluminación de contraste de fases. Se realizaron experimentos de fijación de voltaje y corriente de célula completa (*whole cell patch clamp*),²² usando electrodos de vidrio (TW120-3, WPI), llenos con solución intracelular (Cuadro I). La resistencia de los electrodos fue de 1.4 a 3 MΩ y la resistencia del sello excedió 1 GΩ. Se usó un amplificador de fijación de voltaje (Axopatch 200B). Las señales de comando y adquisición de datos se generaron mediante una tarjeta de conversión analógico-digital (Digidata 1200, Axon Inst.) controlada por el programa pClamp 8.0 (Axon Inst.). En todos los experimentos, una vez abierta la célula se compensó electrónicamente la capacitancia y la resistencia en serie (80%). No se realizó ninguna corrección por el error debido al potencial de punta ni por la resistencia en serie no compensada. Los registros de corrientes iónicas se filtraron a 5 KHz.

La cámara de registro se perfundió usando la solución extracelular según se indica en cada caso. Para la aplicación de drogas se usó un sistema de eyección por presión (BAS, Babe Bee), para lo cual se acercó una micropipeta aproximadamente a 100 μm de distancia de la célula en registro. La tetrodotoxina (TTX) se adquirió de Research Biochemicals Inc. y la 4-aminopiridina (4-AP) de Sigma Chemicals Co.

Para estudiar la corriente de Na⁺ aislada del resto de corrientes iónicas se usó una solución extracelular con colina (Cuadro I) y una solución intracelular con Cs⁺ (Cuadro I). Estas soluciones permitieron, además de aislar la corriente de Na⁺, disminuir su magnitud a fin de hacerla susceptible de una fijación de voltaje adecuada.

Los registros fueron analizados mediante el programa Clampfit 8 (Axon Inst.). Para determinar las constantes de tiempo de activación (τ_m) y de inactivación (τ_h) de la corriente, se ajustaron curvas exponenciales usando un algoritmo de mínimos cuadrados mediante el programa Origin 6.0 (Microcal). Los datos de activación e inactivación en el estado estable se ajustaron con una ecuación de Boltzmann de la forma:

$$f(x) = 1/[1 + \exp((V^{1/2} - V_m)/S)]$$

Donde f(x) es equivalente a la fracción de la corriente (I/I_{max}) para la inactivación y a la conductancia relativa (g/g_{max}) para la activación, $V_{1/2}$ es el voltaje medio de la inactivación o de la activación, V_m es el potencial de membrana en mV, y S es la pendiente de la curva (constante de Boltzmann).

La amplitud de la corriente al pico se midió como la corriente máxima para cada paso de voltaje. Para el análisis comparativo de los valores de la amplitud y cinética de las corrientes se usó la t de Student considerando como significativa una p<0.05 y altamente significativa una p<0.001. Los resultados se presentan como la media ± error estándar.

Resultados*Cultivos celulares*

El método de aislamiento de las células del ganglio vestibular mediante tratamiento enzimático seguido de agitación mecánica proporcionó una viabilidad celular alta, la cual fue del 80.7 ± 3.2 % (4 experimentos, 100 células en cada uno) a juzgar por el número de células que excluyen al azul tripano. La mayoría de las células tuvieron forma esférica y sólo

Cuadro I. Soluciones utilizadas

Solución	KCl	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	CsF	EGTA	TEACl	Colina	4-AP	CsCl	HEPES	Glucosa
∇Extracelular normal	5.4	140	1.2	3.6	-	-	-	-	-	-	10	10
**Intracelular normal	140	10	-	0.134	-	10	-	-	-	-	5	-
∇Extracelular sin Ca ²⁺ y Mg ²⁺	5.4	140	-	-	-	-	-	-	-	-	10	10
∇Extracelular con colina	-	50	1	1.8	-	-	45	40	10	-	10	20
**Intracelular Cs ⁺	-	10	-	-	100	8	10	-	-	30	5	-

Las concentraciones se expresan en mM.

** El pH de la solución interna se ajustó a 7.2 con KOH.

∇ El pH de la solución externa se ajustó a 7.4 con NaOH.

en algunos casos se observaron neuronas con restos axónicos. El diámetro somático promedio fue de $14.38 \pm 6.53 \mu\text{m}$ ($n = 259$). Los diámetros somáticos de las células aisladas tuvieron una distribución que ajusta a una distribución normal.

Se realizaron 30 experimentos de cultivo probando cuatro diferentes condiciones experimentales: medios de cultivo Neurobasal® o L-15 y como substrato colágeno o poli-D-lisina. Durante las primeras horas, en los diferentes cultivos se observaron en el contraste de fases células con morfología de fibroblastos (aplanadas con perímetro irregular, y no refringentes); también se identificaron células con apariencia de astrocitos y células fusiformes, ligeramente aplanadas y oscuras, probablemente células gliales. Las neuronas tuvieron típicamente una apariencia redondeada u ovoide y fueron fuertemente refringentes (Figura 1A). A las 48 hrs los fibroblastos y los otros tipos celulares formaron monocapas sobre las cuales se encontró el mayor número de neuronas que, para este tiempo, extendieron ya proyecciones (neuritas) claramente identificables que en ningún caso rebasaron los límites de las células que les sirvieron de substrato.

Características morfológicas

Para identificar con precisión a las neuronas y estudiar su morfología se realizó la inmunocitoquímica contra neurofilamentos de mediano peso molecular NF-160 kDa ($n = 8$). En ninguno de los controles (por omisión del primer anticuerpo) se observaron células con reacción positiva al anticuerpo contra NF-160 kDa. La reacción inmunocitoquímica fue similar en neuronas de cultivos independientes; sin embargo, en un mismo cultivo, la intensidad de la marca no fue homogénea en todas las neuronas. La marca más intensa se observó en neuronas multipolares cuyas neuritas se extendían pocas micras fuera del cuerpo.

En la mayoría de las neuronas bipolares se pudo observar que uno de los segmentos neuríticos iniciales es más grueso que el otro (Figuras 1B y 1C). La morfología del soma celular de las neuronas fue muy similar en las diferentes condiciones de cultivo; en todas ellas se observaron neuronas monopolares, bipolares y multipolares, siendo las

neuronas bipolares la población predominante en las cuatro condiciones de cultivo (Figura 2). Se observó una diferencia significativa en la supervivencia celular ya que, en los cultivos en los que se utilizó el medio L-15, se encontró un número significativamente mayor de neuronas inmunorreactivas (235 células) que en los cultivos donde se utilizó el medio Neurobasal® (125 células), independientemente del substrato utilizado ($p < 0.05$); además, agrupadas por su diámetro somático, las células que crecieron en medio L-15 tuvieron una distribución normal. Para el caso del medio Neurobasal® la distribución de los diámetros celulares no mostró tendencia alguna (Figura 3).

En todos los cultivos se observó que algunas de las neuronas establecen contacto con otras neuronas a través de sus respectivas terminaciones neuríticas. La zona terminal de la neurita donde establecen contacto ambas neuronas presenta una mayor inmunoreactividad al anticuerpo contra neurofilamentos que la observada en el soma y las neuritas. En la mayoría de las neuronas, algunas de sus neuritas presentan un ensanchamiento terminal con mayor concentración de neurofilamentos, aun cuando no contacten con otra neurona.

En el cuadro II se presentan los datos morfológicos de las neuronas inmunorreactivas cuantificados en las cuatro condiciones de cultivo. A las 48 horas de cultivo, las neuritas de mayor longitud se observaron en neuronas cultivadas con medio Neurobasal® y substrato de poli-D-lisina ($p < 0.001$). No se encontró correlación entre el diámetro somático y la longitud neurítica de cada una de las neuronas en cultivo.

Características electrofisiológicas

Los registros de corrientes iónicas en las diferentes condiciones de cultivo no muestran ninguna diferencia significativa en cuanto a la amplitud y cinética de las corrientes iónicas. El potencial de membrana (V_m) y la capacitancia de las células (C_m) se estudiaron comparando las cuatro condiciones experimentales. El V_m tuvo un valor de $-60 \pm 3 \text{ mV}$ ($n = 19$) independientemente del medio y el substrato. La C_m presentó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las neuronas que crecieron en medio Neurobasal® respecto de las que crecieron en el medio L-15.

La media de la C_m para el medio Neurobasal® fue de 36.1 ± 9.2 pF ($n = 8$) en tanto que aquellas que crecieron en el L-15 tuvieron una C_m de 21.2 ± 2.5 pF ($n = 30$) independientemente del sustrato. En experimentos en que se mantuvieron las células por 11 días en medio Neurobasal® ($n = 2$), las corrientes iónicas fueron similares a las obtenidas en los demás cultivos; sin embargo, la C_m de membrana aumentó hasta 115 pF, lo que indica que las neuronas continuaron con su crecimiento neurítico.

Corrientes iónicas dependientes de voltaje

Hemos identificado 5 corrientes iónicas: tres salientes (de K^+) y dos entrantes (una rápida de Na^+ , y una lenta, probablemente el rectificador de entrada tipo I_h). Tenemos evidencias indirectas de que estas células expresan también corrientes de Ca^{2+} . De hecho, pensamos que una de las corrientes salientes es la corriente de K^+ activada por Ca^{2+} .

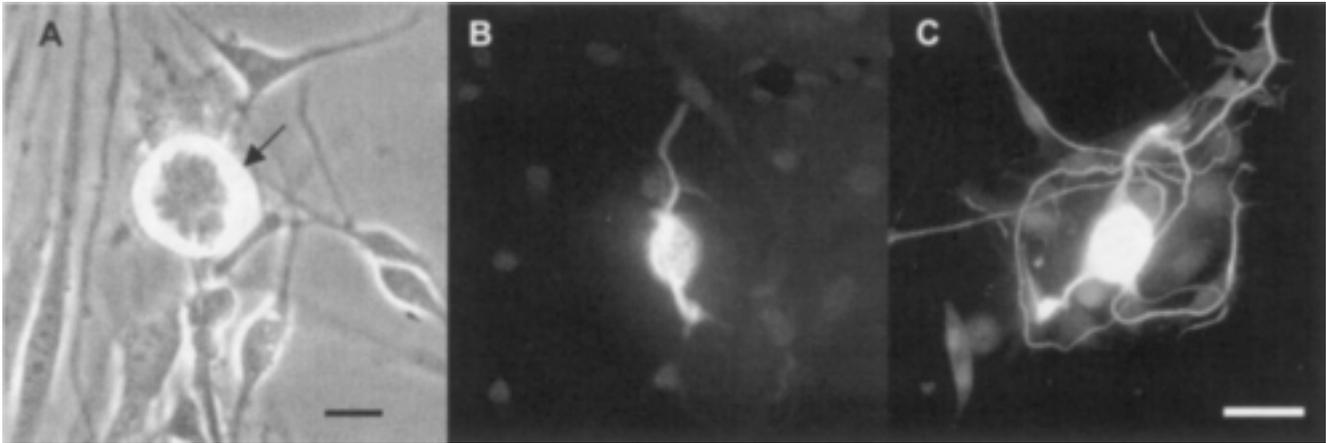


Figura 1. Neuronas vestibulares a las 48 hrs de cultivo. En A, neurona (flecha) de forma redondeada que crece sobre otros tipos celulares. En B y C, el marcaje inmunohistoquímico con anticuerpos anti NF-160 kDa permite distinguir claramente a las neuronas de otros tipos celulares y estudiar la morfología de sus neuritas. Calibración: 20 μ m en A y 35 μ m en B y C.

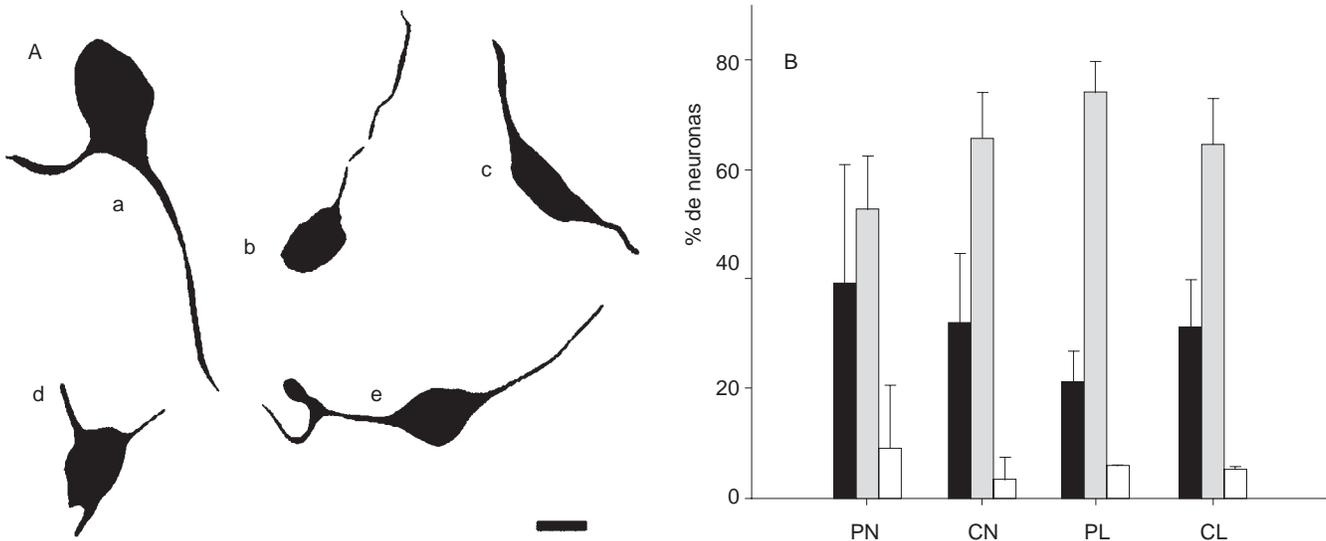


Figura 2. Morfología de las neuronas vestibulares en cultivo. En A, esquemas de las formas típicas de neuronas inmunorreactivas: a, pseudomonopolar; b, monopolar; c y e, bipolares; d, multipolar. Nótese que el soma puede ser relativamente esférico (a, b y d) o claramente ovoideo (c y e). La barra de calibración representa 20 μ m. En B, porcentajes de neuronas monopolares (negro), bipolares (gris) y multipolares (blanco), cuantificadas en ocho cultivos pertenecientes a cada una de las condiciones experimentales: PN, poli-D-lisina-Neurobasal®; CN, colágeno-Neurobasal®; PL, poli-D-lisina-L-15; CL, colágeno-L-15. En todos los cultivos la población que predomina es la de células bipolares.

En este trabajo nos interesó especialmente estudiar las características de la corriente de Na^+ , particularmente en lo que se refiere a la generación de potenciales de acción que, aunada con los resultados de la inmunocitoquímica para neurofilamentos, nos permitirá definir si estas células en cultivo mantienen propiedades que permitan considerarlas como un modelo biológico adecuado. Es por ello que por el momento hemos concentrado nuestro trabajo en las corrientes de Na^+ que, se sabe, son particularmente lábiles y cuya expresión permite identificar sin lugar a duda a las neuronas.

Los datos que se muestran para el análisis de la corriente de Na^+ (I_{Na}), se obtuvieron a partir del registro de 30 células (todas crecieron en medio L-15 y sustrato de poli-D-lisina). Para estudiar esta corriente se usaron soluciones intra y extracelula-

res modificadas a fin de bloquear completamente las corrientes de K^+ y de Ca^{2+} (Cuadro I). En estas condiciones se observó una corriente entrante que se activa e inactiva rápidamente. Esta corriente mostró una clara dependencia del voltaje. Con un potencial de sostenimiento (V_H) de -100 mV y pulsos que van desde -100 a 60 mV; la I_{Na} se activó a valores más positivos que -60 mV ($n = 9$), tuvo su máximo a -20 mV y se invirtió a 35 mV, valor muy cercano al potencial de equilibrio calculado para el Na^+ : $E_{\text{Na}} = 41$ mV (Figuras 4 A y B). La corriente se activó rápidamente, con una constante de tiempo de 0.14 ± 0.013 ms para pulsos a -20 mV ($n = 8$). La constante de tiempo (τ_m) de la activación mostró una dependencia exponencial del voltaje (Figura 4 C). Para estudiar la cinética de la inactivación de la I_{Na} , se hizo un ajuste con una ecuación exponencial

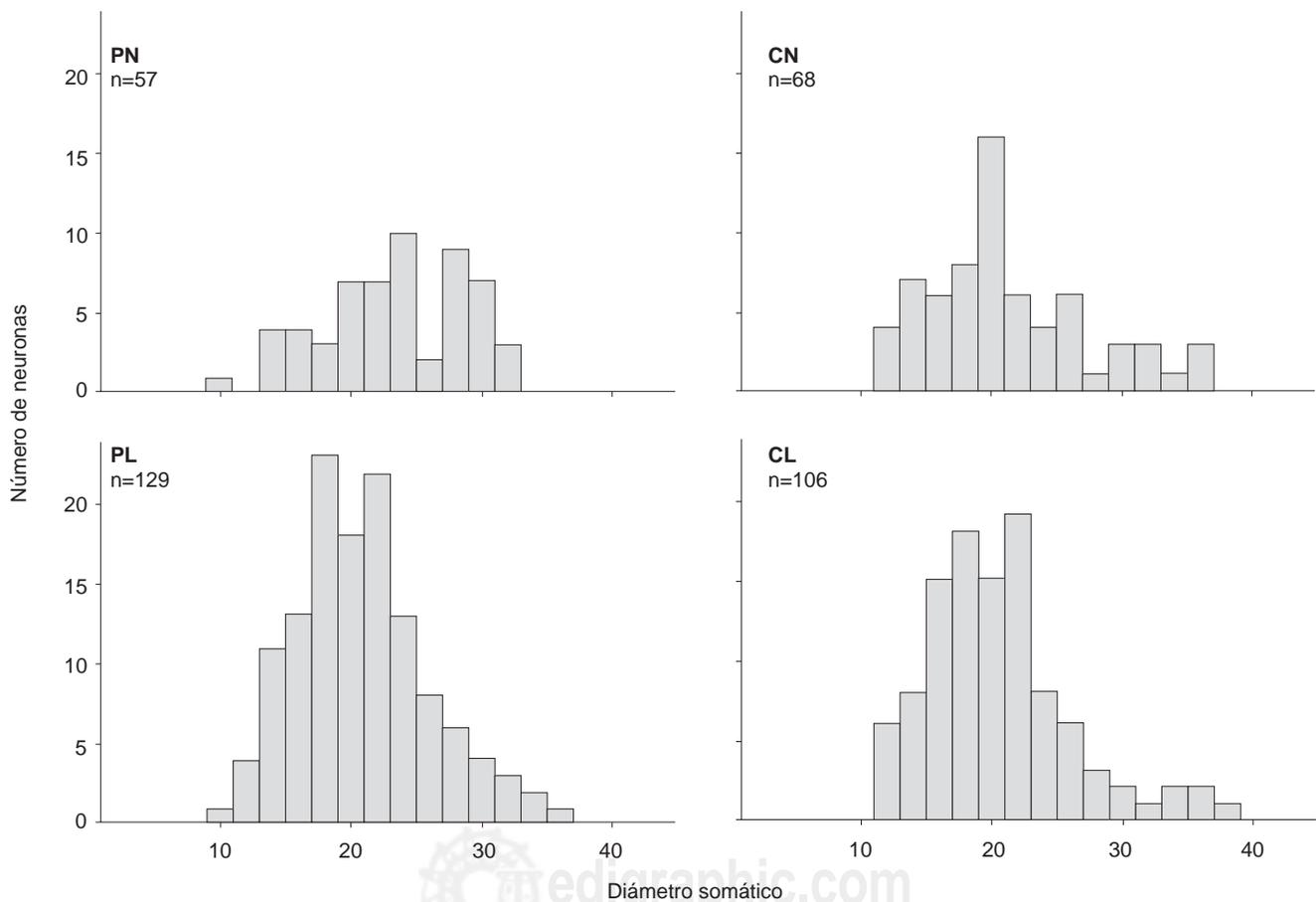


Figura 3. Histogramas de distribución de los diámetros de las neuronas inmunorreactivas con crecimiento neurítico ostensible (las neuronas que no presentaron crecimiento neurítico fueron excluidas del histograma). En los paneles superiores, histogramas de neuronas en medio Neurobasal® y en los inferiores, las neuronas que crecieron en L-15. Los datos representan todas las neuronas que crecieron en el área del cubreobjetos cuantificadas en dos cultivos para cada condición. PN, poli-D-lisina-Neurobasal®; CN, colágeno-Neurobasal®; PL, poli-D-lisina-L-15; CL, colágeno-L-15.

Cuadro II. Morfología de las células en cultivo

Condición	n	Diámetro somático (μm)	Células con neuritas %	Longitud neurítica (μm)	Neuritas por célula	Bifurcaciones ^ψ	Crecimiento neurítico (μm/h)
PN	57	24 ± 6	39 ± 18	391 ± 44*	1.9 ± 0.1	0.84 ± 0.2	8.1
CN	68	22 ± 6	55 ± 13	228 ± 21	1.7 ± 0.1	0.63 ± 0.2	4.8
PL	129	22 ± 5	57 ± 26	224 ± 19	1.8 ± 0.1	0.68 ± 0.1	4.7
CL	106	22 ± 5	53 ± 23	165 ± 17	1.8 ± 0.1	0.36 ± 0.1	3.4

^ψ Llamamos bifurcaciones al número de subdivisiones de las neuritas.

* Diferente a todos los demás cultivos con la prueba de ANOVA $p < 0.001$ y la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. Los datos indican media ± error estándar.

en la que $I(t) = I_{Na} \cdot \exp(-t/\tau_h)$ (Figura 4 C). Se encontró que a -20 mV la constante de tiempo (τ_h) tiene una media de 0.92 ± 0.19 ms ($n = 11$). Los datos de la τ_h en función del voltaje se ajustaron adecuadamente con la suma de dos ecuaciones exponenciales, poniendo de manifiesto que la τ_h tiene dos componentes con diferente sensibilidad al voltaje.

Para construir las curvas de activación e inactivación de estado estable de la I_{Na} se usó un protocolo en el cual una serie de prepulsos de 1 s de duración y con voltajes de -130 a 20 mV fueron seguidos por un pulso de prueba a -10 mV con una duración de 10 ms. Se midió la corriente al pico en los prepulsos (activación) ($n = 4$) y durante el pulso de prueba (inactivación de estado estable) ($n = 5$). A los datos normalizados de la corriente y conductancia (véase material y métodos) en función del voltaje se les ajustó una ecuación de Boltzmann de primer orden con una $V_{1/2}$ de -44 mV y una S de 3.7 para la activación y una $V_{1/2}$ de -75 mV y una S de 10.7 para la inactivación (Figura 4 D).

La I_{Na} mostró una alta sensibilidad a la TTX (Figuras 4 E, F), bloqueándose completamente 2 a 3 segundos después de la aplicación de 200 nM de TTX ($n = 8$). En ninguna de las células en las que se registró la corriente de Na^+ se observó la presencia de la I_{Na} resistente a TTX.

Para observar el efecto de la TTX sobre el potencial de acción, se fijó el potencial de membrana de la célula a -70 mV y a partir de ese valor se aplicó un protocolo de fijación de corriente, el cual consistió en pulsos de corriente de -0.5 a 0.5 nA de 40 ms de duración. En todos los casos ($n = 4$) la aplicación de TTX (200 nM) bloqueó la generación del potencial de acción (Figura 4F).

Adicionalmente se estudió la reactivación de la I_{Na} ($n = 5$) mediante un protocolo de fijación de voltaje

con un V_H de -100 mV y pares de pulsos de 2 ms de duración a 0 mV con intervalos de tiempo variable entre ellos. La I_{Na} se reactivó con un curso temporal complejo que pudo ser ajustado adecuadamente con la suma de dos exponenciales con constantes de tiempo $\tau_1 = 22$ ms, $\tau_2 = 3.5$ ms (Figura 5).

Utilizando protocolos de fijación de corriente se observó que la aplicación de 4-AP 10 mM produjo un aumento en la amplitud y en la duración del potencial de acción, tal como es de esperar con base en el conocido efecto de bloqueo de la 4-AP sobre las corrientes de K^+ . En algunas células, la 4-AP disminuyó la latencia al primer potencial de acción. La 4-AP también modificó notablemente la evolución del postpotencial, disminuyendo la posthiperpolarización (Figura 6A). Más aún, cuando se aplicó la 4-AP por varios minutos se encontró que las células en cultivo pueden descargar de forma rítmica y autosostenida (Figura 6B). Este es, hasta donde sabemos, el primer reporte en la literatura donde se registra actividad eléctrica repetitiva en neuronas en cultivo del ganglio vestibular.

Discusión

Se ha demostrado que en algunos tipos celulares la disociación enzimática altera sus propiedades eléctricas, modificando los canales iónicos de membrana, llegando en algunos casos a eliminar ciertas conductancias.^{24,18} Es por ello muy importante desarrollar una preparación biológica que permita registrar de forma confiable las corrientes iónicas en las neuronas aferentes.

En este trabajo presentamos la metodología que hemos desarrollado para obtener cultivos primarios de neuronas aferentes vestibulares, así

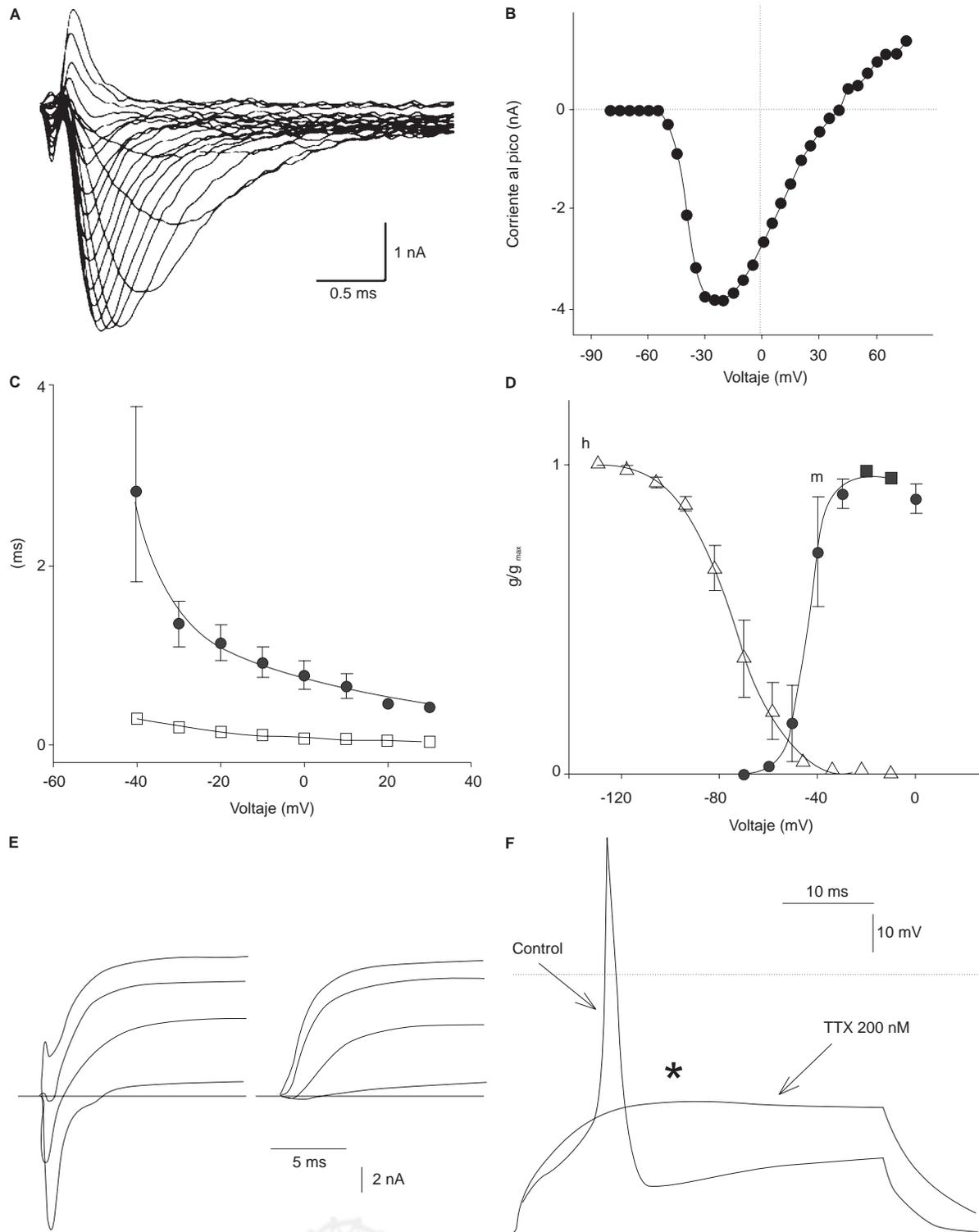


Figura 4. Características de la corriente de Na^+ . En A, registro de fijación de voltaje de la I_{Na} aislada. La corriente se activa rápidamente < 1 ms y se inactiva en menos de 3 ms. En B, curva corriente contra voltaje para la I_{Na} . La I_{Na} se activa a partir de -60 mV alcanza su máximo a -20 mV y se invierte a $+35$ mV. En C, constantes de tiempo para la activación (cuadros vacíos) e inactivación (círculos llenos) en función del voltaje ($n = 8$). En D, curvas de activación e inactivación (parámetros m y h). La activación tiene una $V_{1/2}$ de -44 mV, en tanto la inactivación tiene una $V_{1/2}$ de -75 mV. En E, corriente total en condiciones control y luego de la aplicación de TTX 200 nM. Puede observarse que se bloquea completamente la corriente entrante sin que se modifique la corriente saliente. En F, la aplicación de TTX (200 nM) bloqueó la generación del potencial de acción, aunque permanece un componente que sugiere la presencia de una corriente entrante (*). La línea punteada representa el valor $+a$ 0 mV.

como los parámetros morfológicos detallados de estas células y algunas de sus propiedades electrofisiológicas que indican que se trata de células viables y funcionalmente similares a las que se encuentran en el tejido *in vivo*, en lo que respecta a su morfología, características de la corriente de Na⁺ y capacidad para descargar de forma repetitiva.

La viabilidad celular que se obtuvo al usar la disociación con colagenasa y tripsina fue del 80.7%. No existen datos en la literatura que permitan comparar la eficiencia de este método con otros.

Las características morfológicas de las células en nuestros cultivos fueron similares a las descritas para las células del ganglio estatoacústico del ratón excepto por el diámetro somático (11.31 μm en el ratón, contra 22.47 μm en nuestros cultivos); sin embargo, en este caso las células se obtuvieron en etapa embrionaria e incluían células vestibulares y cocleares.²⁵ El crecimiento neurítico durante las primeras 48 horas (3 - 8 μm) fue similar al reportado en neuronas cocleares en cultivo (6 - 8 μm).²⁶ Trabajos en que se analiza el efecto de factores neurotróficos en células del ganglio vestibular en

ratas no proporcionan ningún dato sobre la morfología de las neuronas en cultivo.^{27,28}

En nuestros cultivos, al igual que se ha descrito en cultivos de neuronas del ganglio estatoacústico del ratón, las neuritas nunca rebasaron los límites de las células que utilizaron como substrato para crecer.²⁵ Esto es debido a que el contacto de la punta de un filopodio con otra célula, o con cualquier objeto recubierto con poliornitina o con un substrato de laminina, permite la formación de la neurita.²⁹ La poli-D-lisina y el colageno, si bien favorecen que las células se adhieran adecuadamente, no promueven el crecimiento neurítico. Por lo anterior, la formación de las neuritas sólo pudo generarse por el contacto con otras células (células gliales y fibroblastos).

El anticuerpo monoclonal contra NF-160 kDa permitió la identificación de las neuronas en cultivo. La morfología de las neuronas marcadas en las cuatro condiciones de cultivo fue muy similar. En la mayoría de las neuronas bipolares uno de los segmentos de las neuritas fue más grueso que el otro; esto coincide con lo descrito para las neuronas vestibulares *in situ* del mono ardilla, donde el segmento más grueso es el que se dirige hacia el tallo cerebral y el más delgado es el telodendrón.³⁰

La inmunorreactividad de las neuronas con el anticuerpo contra NF-160 kDa fue variable, ya que se encontraron neuronas marcadas intensamente y otras en las que el marcaje fue evidentemente menor. Diferencias semejantes en la inmunorreactividad contra NF-160 kDa se han reportado en los ganglios vestibulares de varias especies: la rata,^{20,21} el ratón,²⁵ el humano³¹ y el axolotl.³²

El mayor número de neuronas en los cultivos en los que se usó L-15 comparados con los cultivos donde se usó Neurobasal® demuestra que la supervivencia neuronal fue mayor cuando las células se cultivaron en medio L-15 sin importar el substrato utilizado.

En todas las células examinadas encontramos corrientes con características semejantes, lo que indica que las neuronas en cultivo expresan sus conductancias iónicas independientemente de las condiciones experimentales que hemos examinado en este trabajo. Este es un dato muy significativo y para el cual no existen antecedentes en la literatura, ya que demuestra que la expresión de ciertas conductancias iónicas es un rasgo fenotípico estable.

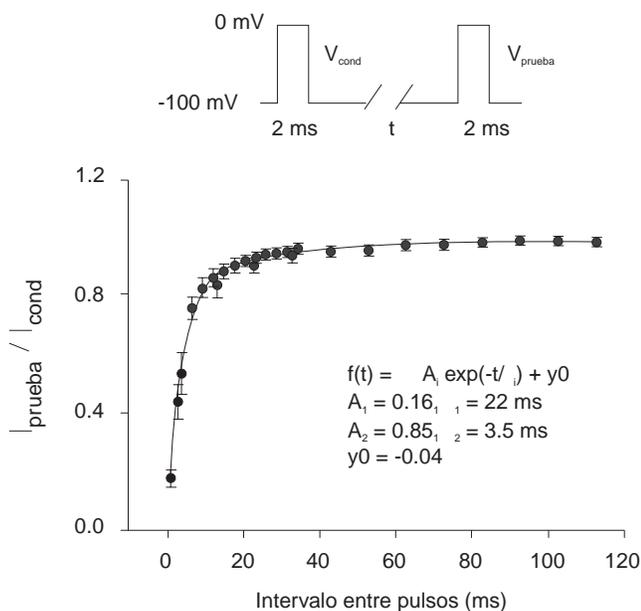


Figura 5. Reactivación de la corriente de Na⁺. La gráfica muestra el valor de la corriente al pico en el segundo pulso normalizada en función de su valor al pico en el prepulso contra el intervalo de tiempo entre pulsos (n = 5). El curso temporal de la reactivación se ajustó con una ecuación exponencial doble cuyos parámetros aparecen junto con la gráfica. En el recuadro superior se esquematizan los protocolos de fijación de voltaje utilizados.

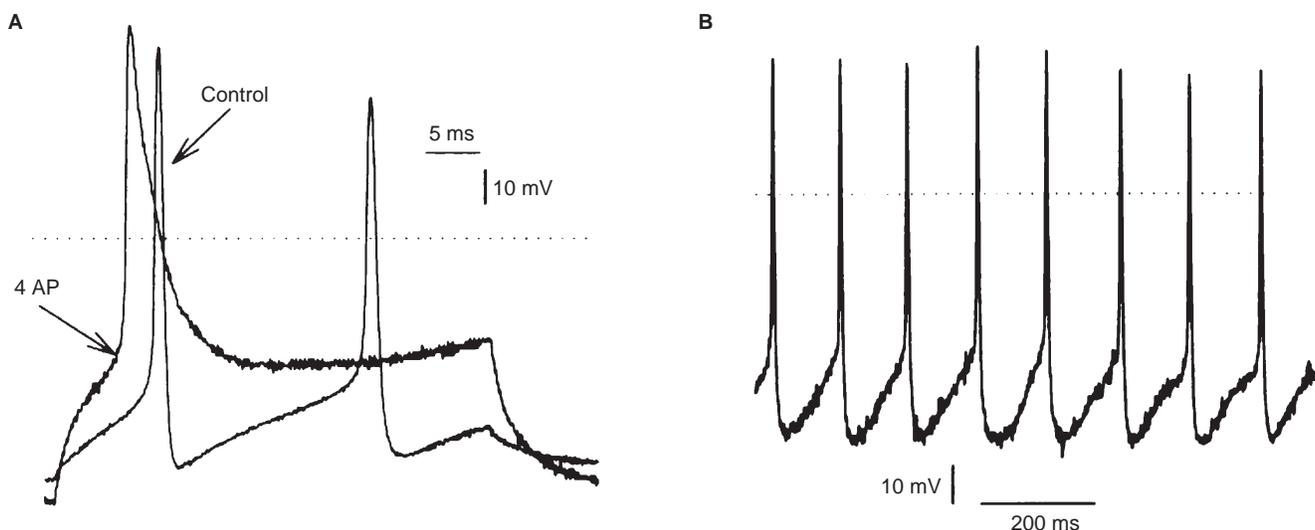


Figura 6. Efecto de la 4-AP sobre las corrientes iónicas y la generación del potencial de acción. En A, en condiciones de fijación de corriente se estimuló la preparación con pulsos que parten de un potencial de -70 mV. La aplicación de la 4-AP aumentó la amplitud y la duración del potencial de acción, modificó la resistencia de entrada y redujo la latencia de aparición del potencial de acción. En B, la aplicación de 4-AP 10 mM a las células en cultivo determinó la aparición de potenciales de acción espontáneos.

En nuestras condiciones de registro hemos observado 5 corrientes iónicas: tres salientes (de K^+) y dos entrantes (una rápida de Na^+ , y una lenta rectificante de entrada). Tenemos evidencias indirectas de que estas células expresan también corrientes de Ca^{2+} .^{33,34}

Resultados previos de nuestro laboratorio, obtenidos mediante registros intracelulares en neuronas aferentes de los canales semicirculares del axolotl, indican que las corrientes de K^+ participan en la determinación de la regularidad de la descarga de las neuronas aferentes vestibulares.¹¹ Un hallazgo notable de este trabajo, y que coincide con esos antecedentes, es que las neuronas en cultivo que se exponen a la 4-AP durante más de 10 minutos producen potenciales de acción de forma rítmica y autosostenida. Este hecho demuestra que, contrario a lo que se ha propuesto con base en los registros *in vivo*, las neuronas aferentes sí son capaces de generar actividad marcapaso.

Basándonos en estos datos pensamos que la regularidad de la descarga de las neuronas aferentes vestibulares que, se ha considerado, constituye un parámetro fundamental en la codificación sensorial en el sistema vestibular, estaría regulada en una parte importante por la relación entre las magnitudes y propiedades cinéticas de las corrientes salientes de K^+ y no exclusivamente por la inervación y la entrada sináptica, como ha sido propuesto por otros autores.^{1,5,8}

En relación con la corriente de Na^+ , sus propiedades de activación e inactivación coinciden con las descritas para la corriente de Na^+ sensible a TTX en las neuronas aisladas del ganglio vestibular del ratón.¹⁵ El estudio de la inactivación y reactivación de la I_{Na} demuestra que su cinética es sumamente relevante en la determinación de los patrones de descarga de las neuronas aferentes y no, como erróneamente se tiende a pensar, que esta corriente sólo determina la generación del potencial de acción. El hecho de que la reactivación de la I_{Na} tenga una constante de tiempo lenta (τ_1) de 22 ms y otra rápida (τ_2) de 3.5 ms implica que para frecuencias de descarga cercanas o mayores a 50 impulsos por segundo habrá fenómenos de acumulación de la inactivación de la I_{Na} .

Conclusiones

La sobrevivencia en cultivo de las neuronas del ganglio vestibular de la rata depende fundamentalmente del medio. La mayor sobrevivencia de las neuronas se obtuvo con el medio L-15; las neuronas que crecieron en poli-D-lisina y Neurobasal® tuvieron una mayor velocidad de crecimiento neurítico y un mayor número de ramificaciones.

Sobre la base de las características morfológicas de las neuronas en cultivo, su inmunorreactividad, la distribución de los diámetros somáticos y la

presencia de corrientes iónicas y potenciales de acción tanto evocados por estimulación eléctrica como espontáneos, podemos afirmar que dichas neuronas son representativas de las neuronas presentes en el animal íntegro, y que los cultivos que hemos desarrollado constituyen un modelo experimental adecuado para el estudio de las propiedades de las neuronas aferentes vestibulares.

Referencias

1. **Goldberg JM, Fernández C.** The vestibular system. In: Handbook of Physiology: The Nervous System: Sensory Systems Part III, Ed. I. Darian-Smith, Bethesda, MD, 1984,977-1022.
2. **deWaele C, Muhlethaler M, Vidal PP.** Neurochemistry of the central vestibular pathways. *Brain Res.* 1995;20:24-46.
3. **Lorente de Nó R.** Etudes sur l'anatomie et la physiologie du labyrinthe et du VIII nerf. Deuxième partie. Quelques données au sujet de l'anatomie des organes sensoriels du labyrinthe. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ Madrid* 1926;24:53-153.
4. **Fernández C, Baird RA, Goldberg JM.** The vestibular nerve of the chinchilla. I. Peripheral innervation patterns in the horizontal and superior semicircular canals. *J. Neurophysiol.* 1988;60:167-181.
5. **Goldberg JM, Desmadryl G, Baird R, Fernández C.** The vestibular nerve of the chinchilla. IV. Discharge properties of utricular afferents. *J. Neurophysiol.* 1990;63:781-790.
6. **Lysakowski A, Minor LB, Fernández C, Goldberg M.** Physiological identification of morphologically distinct afferent classes innervating the cristae ampullares of the squirrel monkey. *J. Neurophysiol.* 1995;73:1270-1281.
7. **Goldberg JM, Lysakowski A, Fernández C.** Morphophysiological and ultrastructural studies in the mammalian cristae ampullares. *Hearing Res.* 1990;49:89-102.
8. **Goldberg JM, Desmadryl G, Baird R, Fernández C.** The vestibular nerve of the chinchilla. V. Relation between afferent discharge properties and peripheral innervation patterns in the utricular macula. *J. Neurophysiol.* 1990;63:791-804.
9. **Francis HW, Nadol JB Jr.** Patterns of innervation of outer hair cells in a chimpanzee: II. Efferent endings. *Hearing Res.* 1993;64:217-221.
10. **Honrubia V, Hoffman LF, Sitko S, Schwartz IR.** Anatomic and physiological correlates in the bullfrog vestibular nerve. *J. Neurophysiol.* 1989;61:688-701.
11. **Flores A, Cebada J, Soto E.** Ionic mechanisms associated with the discharge regularity of vestibular afferent neurons. *Soc. Neurosci. Abs.* 1996;22:1065.
12. **Boyle R, Carey JP, Higstein SM.** Morphological correlates of response dynamics and efferent stimulation in horizontal semicircular canal afferents of the toadfish, *Opsanus tau*. *J. Neurophysiol.* 1991;66:1504-1521.
13. **Davis L.** Differential distribution of potassium channels in acutely demyelinated, primary-auditory neurons *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 1996;76:438-447.
14. **Desmadryl G, Chambard JM, Valmier J, Sans A.** Multiple voltage-dependent calcium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. *Neuroscience.* 1997;78:511-522.
15. **Chabbert C, Chambard J, Valmier J, Sans A, Desmadryl G.** Voltage activated sodium currents in acutely isolated mouse vestibular ganglion neurons. *Neuroreport.* 1997;8:1253-1256.
16. **Chambard JM, Chabbert C, Sans A, Desmadryl G.** Developmental changes in low and high voltage-activated calcium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. *J. Physiol.* 1999;518:141-149.
17. **Sokolowski B.** Development of excitation in cells of the inner ear. *Proceedings of the International Békésy Conference.* 1999,41-58
18. **Cebada J.** Caracterización de las corrientes iónicas de las neuronas aferentes vestibulares del axolotl (*Ambystoma tigrinum*). Tesis de Maestría, Instituto de Fisiología de la Universidad Autónoma de Puebla, 1997.
19. **Banker G, Goslin K.** *Culturing Nerve Cell.* Banker G, Goslin K (Eds.) MIT Press. Cambridge Massachusetts, 1991,11-109.
20. **Demêmes D, Raymond J, Atger P, Grill C, Winsky L, Dechesne C.** Identification of neuron subpopulations in the rat vestibular ganglion by calbindin-D 28 K, calretinin and neurofilament proteins immunoreactivity. *Brain Res.* 1992;582:168-172.
21. **Ylikoski J, Pirvola U, Häppölä O.** Characterization of the vestibular and spiral ganglion cell somata of the rat by distribution of neurofilament proteins. *Acta Otolaryngol. Suppl (Stockh).* 1993;503:121-6.
22. **Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakman B, Sigworth FJ.** Improved patch clamp technique for high resolution current recording from cell and cell free membrane patches. *Pflügers Arch.* 1981;391:85-100.
23. **Connor JA, Stevens CF.** Voltage clamp studies of a transient membrane outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol.* 1971;213:21-30.
24. **Armstrong C, Roberts W.** Electrical properties of frog saccular hair cells: distortion by enzymatic dissociation. *J. Neurosci.* 1998;18:2962-2973.
25. **Rabejac D, Raymond J, Dechesne C.** Characterization of different neuron populations in mouse statoacoustic ganglion cultures. *Brain Res.* 1994;652:249-256.
26. **Lin X.** Action potentials and underlying voltage-dependent currents studied in cultured spiral ganglion neurons of the postnatal gerbil. *Hearing Res.* 1997;108:157-179.
27. **Montcouquiol M, Valat J, Travo C, Sans A.** Short-term response of postnatal rat vestibular neurons following brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3 application. *J. Neurosci. Res.* 1997;50:443-449.
28. **Zheng JL, Randall RS, Gao WQ.** Neurotrophin-4/5, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 promote survival of cultured vestibular ganglion neurons and protect them against neurotoxicity of ototoxins. 1995; *J. Neurobiol.* 28:330-340.
29. **Smith C.** Cytoskeletal movements and substrate interactions during initiation of neurite outgrowth by sympathetic neurons *in vitro*. *J. Neurosci.* 1994;14:384-398.

30. **Fermin C.** Neurotransmisión vestibular central. I. componentes y definiciones. En: neurobiología de los sistemas sensoriales. Meza G (Ed.) UNAM, México 1995, pp 285-315.
31. **Thornell L, Anikko M, Virtanen I.** Cytoskeletal organization of the human inner ear. *Acta Otolaryngol.* 1987;437:5-27.
32. **Limón A.** Ubicación del ganglio vestibular y presencia de NF-160 kDa en neuronas aferentes vestibulares del VIII par craneal del *Ambystoma tigrinum*. Tesis de Licenciatura, Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Puebla, 1998.
33. **Soto, E. Limón, A. y Vega, R.** Morphology and ionic current expression of the rat vestibular ganglion neurons in primary culture. *Assoc. Res. Otolaryngol, Abst.* 2001;24:21553
34. **Perin P, Soto E, Vega R, Botta L, Masetto S, Zucca G, Valli P.** Calcium channels functional roles in the frog semicircular canal. *Neuroreport* 2000;11:417-420.

