

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO -**

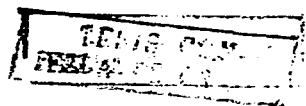
**DOCTORADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA -  
SEDE: INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR.**

**FARMACOLOGIA DE AMINOACIDOS  
EXCITADORES EN EL OIDO  
INTERNO.**

Tesis que para obtener el grado de;  
Doctor en Investigación Biomédica Básica (Neurociencias).

Presenta:  
**ENRIQUE SOTO EGUIBAR**

**MEXICO  
ABRIL DE 1988**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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

RESUMEN .....	1
LA TRANSMISION SINAPTICA AFERENTE EN SISTEMAS SENSORIALES DE CELULAS PILOSAS .....	4
SINAPSIS AFERENTE .....	6
NEUROTRANSMISORES .....	11
GABA .....	12
AMINOACIDOS EXCITADORES .....	14
NEUROPEPTIDOS .....	21
CATECOLAMINAS .....	23
ANAS .....	23
PROPOSITO DEL TRABAJO .....	25
MATERIAL Y METODOS .....	26
Disecccion .....	26
Registro .....	27
Farmacos usados .....	31
Técnica de perfusión .....	32
Procesamiento de resultados .....	33
RESULTADOS .....	33
GABA .....	33
AMINOACIDOS EXCITADORES .....	34
DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	55
BIBLIOGRAFIA .....	64
TRABAJO I .....	76
TRABAJO II .....	81
TRABAJO III .....	111
TRABAJO IV .....	119

## RESUMEN.

En este trabajo se pretende determinar cuales sustancias cumplen con los criterios fisiológicos que permitan proponerlas como transmisores en la sinapsis aferente del sistema vestibular. Para ello se ha usado el registro de la actividad de las aferentes primarias del sistema vestibular del axolotl (*Ambystoma mexicanum*), como un índice del efecto de diversas drogas agonistas y antagonistas de los transmisores putativos.

Se ha estudiado el efecto del GABA, sus agonistas y antagonistas (muscimol, bicuculina, picrotoxina), encontrando que los agonistas tienen efectos que no remedan la respuesta fisiológica del sistema, en tanto los antagonistas producen un efecto inhibitor muy debil. Estos resultados no confirman el posible papel del GABA como transmisor en esta sinapsis.

Estudiando el efecto del glutamato, del aspartato y de aminoácidos excitatorios (AAE) relacionados, se ha encontrado que estas sustancias producen un efecto excitador potente sobre las aferentes vestibulares, en tanto que sus antagonistas inhiben la actividad basal y la respuesta ante estimulación mecánica de estas fibras. El efecto excitador de los agonistas de los AAE persiste aún

cuando se perfunde con soluciones con alto  $Mg^{++}$  y bajo  $Ca^{++}$ , indicando que su acción es postsináptica.

El estudio de las potencias relativas de los agonistas y antagonistas de los AAE ha mostrado que el ácido kainico y el quisquálico tienen una gran potencia excitadora, siguiendo en potencia el D-aspartico, L-Glutámico, el D-glutámico, L-aspartico y por último el N-metil D-aspartico. Utilizando antagonistas de los aminoácidos excitadores se ha encontrado que el ácido kynurénico es el más potente inhibidor tanto en la descarga basal como en la evocada por estímulos fisiológicos, siguiendo el L-glutamato dietil éster, el DL-2-amino-4-fosfeno-butírico, D-alfa amino adípico y el DL-2-amino-5 fosfeno-valérico.

Estos resultados sugieren que un aminoácido excitador es el transmisor en la sinapsis aferente del sistema vestibular y que los receptores involucrados son de tipo Kainico-Quisquálico.

La presente tesis reúne el trabajo desarrollado por el autor en el Departamento de Ciencias Fisiológicas, ICIAP, de la Universidad Autónoma de Puebla. Como parte de la misma se incluyen los siguientes trabajos:

I. Is GABA an afferent transmitter in the vestibular system. Vega, R., Soto, E., Budelli, R. and González Estrada, M.T., Hearing Research 29 (1987) 163-167.

II. Actions of excitatory amino acid agonists and antagonists on the primary afferents of the vestibular system of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Soto, E. and Vega, R., (enviado a consideración editorial)

III. A Turbo Pascal program for on line spike data acquisition and analysis using a standard serial port. Soto, E. and Vega, R., Journal. of Neuroscience Methods. 19 (1987) 61-68.

IV. Computer program for statistical U-Mann-Whitney non-parametric analysis of neuronal activity. Soto, E., Echague, J.V. and Vega, R., (enviado a consideración editorial).

La referencia a estos trabajos se hace a lo largo de la exposición por el número Romano asignado.

LA TRANSMISION SINAPTICA  
AFERENTE EN SISTEMAS  
SENSORIALES DE CELULAS  
PILOSAS -

Los órganos sensoriales encargados de detectar la posición del organismo en el espacio se componen de un tipo celular común a todos ellos: las células pilosas<sup>1</sup>. Este tipo de células mecanorreceptoras se encuentran formando los órganos de la línea lateral, el sistema vestibular y la cóclea. Se caracterizan por tener gran cantidad de pseudocilios y un cilio verdadero en su cara apical. Se encuentran diferencias morfológicas y funcionales entre las células pilosas que forman estos órganos sensoriales (Figura 1). Sin embargo, se reconoce una estirpe celular única, en base a la cual se agrupan la cóclea, el vestibulo y la línea lateral bajo la denominación común de sistema acústico-lateral o sistemas sensoriales de células pilosas.

En esta parte del trabajo se discuten algunos aspectos de la sinapsis en los sistemas de células pilosas. Se hace especial énfasis en la transmisión sináptica aferente en el sistema vestibular; órgano en el que hemos realizado nuestro trabajo experimental. Se mantiene en esta revisión la especie y el órgano particular, como elementos inseparables de los diferentes resultados experimentales, generalizando los resultados cuando esto parece pertinente.

---

<sup>1</sup> De acuerdo a la Nomina Histológica, el término adecuado en Español para referirse a este tipo de células es el de células pilosas. En lo personal y en acuerdo con gran cantidad de textos en Español, me agrada más la denominación de células ciliadas.



## TRANSMISION SINAPTICA EN EL SISTEMA ACUSTICOLATERAL.

La mayoría de sistemas sensoriales de células pilosas están inervados por fibras aferentes, y fibras eferentes. Las aferentes, reciben influencias sinápticas de la célula sensorial, y transmiten información al SNC. Las fibras eferentes, provienen del tallo cerebral y terminan estableciendo sinapsis en las células pilosas o en las fibras aferentes. Las fibras eferentes parecen ejercer efectos inhibitorios en las células pilosas y las fibras aferentes por intermedio de sinapsis químicas. Sin embargo, el terminar sobre la célula pilosa o sobre la fibra aferente, determinará un efecto muy diferente, ya que se ejercerá una inhibición presináptica, o postsináptica según el caso (Flock, 1973).

### SINAPSIS AFERENTE.

Desde el punto de vista morfológico se distinguen dos tipos de células pilosas en el vestibulo (Figura 1). Las diferencias fundamentales entre ellas se ubican a nivel de la sinapsis. De manera general podemos decir que la sinapsis entre la célula pilosa tipo II y la neurona aferente, es una sinapsis que reúne los criterios que la clasifican como de tipo químico: vesículas en la terminal presináptica, presencia de un cuerpo sináptico, existencia de un

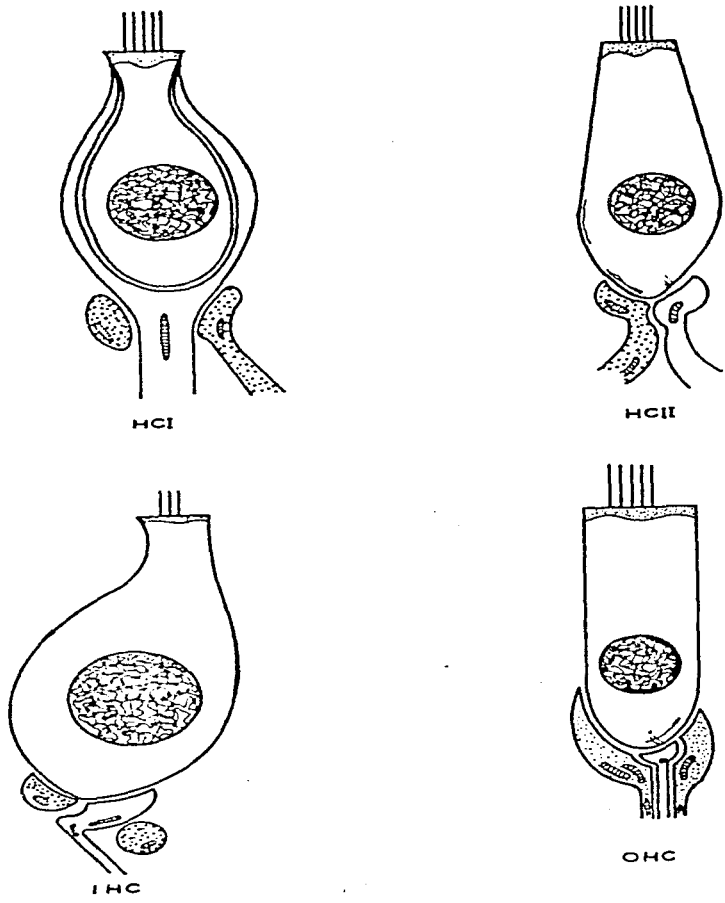


Fig. 1 Se esquematizan 4 tipos de células ciliadas del oído interno para mostrar los distintos patrones de inervación (en punteado las eferentes, blancas las aferentes). Las dos superiores corresponden al vestíbulo, HCI son las tipo I y HCII las tipo II. Las inferiores corresponden a la cóclea; IHC son las internas y OHC, las externas.

engrosamiento postsináptico, espacio intersináptico de aproximadamente 20 nm (Wersall, 1956; Smith y Sjöstrand, 1961; Ades y Engström, 1965, 1974; Wersall y Bagger-Sjöback, 1974). Aunados a estos criterios morfológicos, existen evidencias fisiológicas que indican que esta es una sinapsis de tipo químico. Los potenciales registrados en las fibras aferentes desaparecen al eliminar el  $Ca^{++}$ . El retardo sináptico, corresponde al de una sinapsis química (Furukawa y cols., 1972). La estimulación del sáculo del pez dorado con andanadas de tonos produce en la célula postsináptica potenciales que muestran una distribución semejante a la encontrada en la unión neuromuscular (del Castillo y Katz, 1954; Furukawa y cols, 1972, 1982; Rossi y cols, 1980).

Por otro lado, la sinapsis en la célula tipo I (Figura 1) no corresponde cabalmente con los criterios morfológicos que definen una sinapsis química, ni se han encontrado elementos que la caractericen definitivamente como eléctrica. Aunque existen vesículas en la región presináptica en las células tipo I, y una barra sináptica en torno a la cual se agrupan estas vesículas, no existe engrosamiento postsináptico, y el espacio intersináptico es en algunas ocasiones menor a 10 Å (Hamilton, 1968; Gulley y Bagger-Sjöback, 1979). Llama también la atención el extenso contacto entre la célula pilosa y la aferente, ya que esta última cubre prácticamente toda la superficie basolateral de

la célula pilosa (Gulley y Sjöback, 1979; Engström y Engström, 1981)

Se ha buscado infructuosamente la presencia de uniones comunicantes o conexiones, (gap junctions) entre la célula pilosa tipo I, y la fibra aferente (Gulley y Bagger-Sjöback, 1979; Gulley y Reese, 1977). Este tipo de uniones se han encontrado entre las células de sostén del epitelio vestibular (Zahm, 1980; Santos Sacchi y Dallos, 1983; Santos Sacchi 1984), y entre las células pilosas y las células de sostén (Nadol y col., 1976; Hama, 1980). Se han descrito estructuras en forma de túbulos, entre las células pilosas tipo I y las fibras aferentes (Hamilton, 1968; Favre y Sans, 1979). Sin embargo, estas no corresponden a la morfología típica de las uniones comunicantes, desconociéndose hasta la actualidad su significado funcional.

Estos resultados hacen difícil el mantener la hipótesis de transmisión eléctrica en la sinapsis tipo I. No existe hasta la actualidad ningún trabajo (ni me parece factible), en que se hayan empalado con microelectrodos las terminales pre y post-sinápticas, para pasar corriente y definir si estas células están acopladas eléctricamente. Schessel y Highstein (1981) en un intento por definir esta situación, registraron intracelularmente de fibras de los canales semicirculares en la lagartija. Las células registradas

fueron marcadas con peroxidasa de rábano encontrando que las fibras que inervan células tipo I presentan potenciales sinápticos subumbrales, del tipo de los observados en las sinapsis químicas

Se ha propuesto también que pudiera existir en esta sinapsis una transmisión de tipo efáptico, en base a la gran extensión de la superficie de contacto, y a la cercanía entre la aferente y la célula pilosa (Gulley y Sjöback, 1979). Hasta la actualidad ningún estudio aporta evidencia en favor ni en contra de esta hipótesis.

En resumen, nos parece que las evidencias experimentales indican que las sinapsis en las células tipo II son de tipo químico. Este no es el caso de la sinapsis aferente en las células tipo I, en las cuales se encuentran elementos que pudieran indicar una transmisión de tipo eléctrico. Este hecho dificulta obviamente la interpretación de los resultados obtenidos en animales superiores, ya que estos poseen ambos tipos celulares. (Cabe aquí mencionar que en nuestro trabajo experimental hemos usado como modelo el oído interno del axolotl (*Ambystoma mexicanum*), el cual posee únicamente células pilosas tipo II).

## NEUROTRANSMISORES

Con referencia a la naturaleza química del transmisor aferente, se han realizado muchos trabajos con resultados contradictorios (Guth y Melamed, 1982). El ácido gamma amino-bútrico (GABA) las catecolaminas, el glutamato, el aspartato, la histamina y hasta un factor activador del nervio auditivo (ANAS), han sido propuestos como transmisores de las vías aferentes vestibulo-cocleares y de la línea lateral (Guth y Melamed, 1982; Bobbin y cols., 1985a, b; Klinke, 1986).

Recordemos que para aceptar que una sustancia "x" es el neurotransmisor en un sistema, deben cumplirse los siguientes criterios: a).- demostrar que la célula presináptica, es capaz de sintetizar el transmisor putativo, b).- que el transmisor efectivamente se libera con la activación presináptica c).- debe existir un mecanismo de terminación de la acción de dicho transmisor, d).- la administración del transmisor putativo (en concentraciones cercanas a las esperadas en el espacio sináptico), debe remedar la acción de la estimulación presináptica, e).- agentes farmacológicos (agonistas o antagonistas) deben ejercer el efecto esperado de acuerdo a su mecanismo de acción (Werman, 1966; Cooper y cols., 1984).

**GABA.**

Respecto al GABA , se ha trabajado para demostrar todos estos criterios, con resultados contradictorios. Se ha encontrado que las células del vestíbulo del sapo, la raya y el pollo concentran activamente GABA, y en ellas existen las enzimas necesarias para la síntesis del GABA (Flock y Lam, 1974; Meza y Cols 1981, 1982; Meza, 1984, 1985). Los niveles de la descarboxilasa del Acido glutámico (GAD), enzima fundamental en la síntesis de GABA, aumentan durante el desarrollo de manera paralela a la invasión de las terminales aferentes al epitelio sensorial en el vestíbulo del pollo (Meza e Hinojosa, 1987). En el oído interno del pollo existe un alto nivel de inmunorreactividad al GABA en las células pilosas (Usami y cols. 1987a, 1987b). El GABA se une con alta afinidad, de manera saturable y  $\text{Na}^+$ -independiente a preparaciones membranales crudas en el vestíbulo del pollo (Meza y cols., 1985). En preparaciones in vivo el GABA es capaz de aumentar la frecuencia de descarga de las aferentes vestibulares cuando se perfunde en la región perilinfática en el sapo, la raya (Flock y Lam, 1974) y el gato (Felix y Ehrenberger 1982, 1985). Sustancias "similares" (GABA like) al GABA se incrementan en la perilinfa de cuyos sometidos a estimulación sonora (Drescher y cols 1983; Drescher y Drescher, 1985). Antagonistas del GABA como la picrotoxina y la bicuculina

pueden inhibir la respuesta de las aferentes vestibulares, así como eliminar los síntomas de vértigo de origen periférico en el humano cuando se administran por vía intravenosa (Ehrenberger y cols. 1982, Felix y Ehrenberger, 1985).

En contraposición a estos resultados, en la cóclea del gato y del cobayo no existen niveles suficientes de las enzimas clave asociadas a la síntesis y degradación del GABA: GAD, GABA- transaminasa (GABA-T) y deshidrogenasa de semialdehído succínico (SSADH) (Tachibana y Kuriyama, 1974; Fex y Wenthold, 1976). Coincidentemente, el GABA es incapaz de remedar el efecto de la estimulación de las fibras aferentes de la línea lateral del Necturus (Sand y Col, 1975) y del oído interno de la rana (Annoni y cols. 1984; Guth y Norris, 1984). Sus antagonistas no modifican significativamente la respuesta de las fibras aferentes cocleares en el gato (Klinke y Bertel, 1977), y tampoco las aferentes de los canales en la rana (Guth y Norris, 1984).

En conclusión, nos parece que no existe evidencia definitiva que demuestre que el GABA es el transmisor aferente en el vestibulo. Para complicar aún más el cuadro, se ha reportado que el GABA ejerce en la línea lateral de la rana un fuerte efecto inhibitorio, similar al de agonistas colinérgicos (Bobbin y cols. 1985 a). Estudios de tipo inmunohistoquímico, han permitido asociar el GABA a los



sistemas eferentes en la cóclea de cobayos y monos (Fex y Altschuler 1986; Fex y col., 1986; Thompson y cols., 1986; Eybalin y cols, 1988). Estos últimos resultados imponen un cuestionamiento al posible papel del GABA en la transmisión aferente.

En nuestro laboratorio hemos probado el efecto del GABA y algunos de sus agonistas y antagonistas, con la idea de contribuir a determinar el papel del GABA en la transmisión sináptica en el sistema vestibular (Vega y cols, 1987, trabajo I).

#### AMINOACIDOS EXCITADORES:

El glutamato y el aspartato son otras de las sustancias que han sido reiteradamente estudiadas y propuestas como probables transmisores aferentes en el sistema vestibular y la cóclea.

Se ha encontrado que el glutamato imita la acción de la sinapsis de los electroreceptores en los peces (Steinbach y Bennet, 1971) y en la línea lateral y los canales semicirculares de la rana (Bobbin and Morgan, 1980; Bledsoe y cols, 1983; Bobbin y cols, 1984 y 1985 b; Annoni y cols, 1984; Valli y cols, 1984). En la cóclea del cuyo tanto el glutamato como el aspartato, producen un efecto excitador sobre las fibras aferentes (Klinke y Oertel, 1975; Bobbin y

Thompson, 1978; Robbin, 1979; Comis y Leng, 1979; Robbin y cols 1984; Yu-Wen y cols, 1986). La perfusión del oído interno del gato con glutamato produce un aumento significativo en la frecuencia de descarga de las neuronas aferentes secundarias a nivel del núcleo coclear (Dechesne y cols, 1984).

Los principales agonistas de los aminoácidos excitadores (TABLA I) como los ácidos kainico (KA), quisquálico (QA) y el N-metil D-aspartico (NMDA) (Watkins y Evans, 1981; Foster y Fagg, 1984) han sido estudiados en los sistemas de células pilosas. Se ha encontrado que el NMDA, KA y el QA tienen un efecto activador en las aferentes de los canales semicirculares y la línea lateral en la rana (Annoni y cols., 1984; Bledsoe y cols., 1983; Robbin y cols, 1984 y 1985 b). En la cóclea del gato el KA produce una activación de las aferentes, que es 10 veces más potente que la producida por el glutamato (Dechesne y cols., 1984). En la cóclea del cuyo, el KA y el QA son potentes activadores de las fibras aferentes, en tanto el NMDA produce poco o ningún efecto (Bledsoe y cols, 1981; Jenison y Robbin, 1985; Robbin y cols., 1984; Jenison y cols. 1986). La administración local de KA por un periodo prolongado en la cóclea de ratas, produce alteraciones morfológicas de las aferentes asociadas a las células cocleares internas, sugiriendo la existencia de receptores glutamatérgicos en estas (Pujol y cols., 1985; McGeer y cols., 1978).

Tabla 1. Los antagonistas de los aminoácidos excitadores tales como el glutamato dietil ester (GDEE), el ácido D-alfa amino adípico (DAA), 2-amino 5-fosfonovalérico (APV), cis 2-3 piperidín dicarboxílico (PDA), gama-D-Glutamil-Glicina (DGG) y el ácido kynurénico (KY), producen una inhibición de la actividad unitaria de las aferentes primarias de los canales semicirculares, y de la línea lateral de la rana (Bledsoe y Bobbin, 1982; Annoni y cols., 1984; Bledsoe y cols., 1985; Bobbin y cols., 1985 a, b). El NMDA y los antagonistas asociados al receptor tipo NMDA como el APV, tienen un efecto menor que los antagonistas inespecíficos, indicando la participación de receptores no-NMDA (Watkins, 1984). La potencia del NMDA y drogas relacionadas parece ser menor en la cóclea que en la línea lateral y el vestíbulo (Bobbin y cols., 1985 b). Este último hallazgo, hace dudar de la posibilidad de generalizar los resultados obtenidos en un sistema de células pilosas a otros.

Se ha encontrado que la estimulación "fisiológica"<sup>2</sup> de la línea lateral en la rana, aumenta significativamente la liberación de glutamato (Bledsoe y cols., 1980, 1986). La estimulación con alto K<sup>+</sup> en la cóclea del cuyo y en la línea lateral de la rana, produce también un aumento significativo

<sup>2</sup> El término "fisiológica" se pone entrecomillado, para indicar que se trata de un modelo, el cual se aproxima a las condiciones fisiológicas en el animal íntegro, pero en el mejor de los casos se trata de animales bajo anestesia cuando no de preparaciones in vitro.

TABLA I. Clasificación de receptores aminoacidicos

	NMDA	NO-NMDA		
AGONISTAS ESPECIFICOS	NMDA NMLA	KAINICO DOMOICO	QUISQUALICO AMPA	APB
ANTAGONISTAS ESPECIFICOS	APV APH Mg <sup>2+</sup>	GAMS		
AGONISTAS INESPECIFICOS	IBOTENICO HOMOCISTEICO D-GLU L-GLU			
ANTAGONISTAS INESPECIFICOS	DGGG PDA GDEE KYNURENICO DAAA ESTREPTOMICINA ?			

Modificado de ( Watkins y Evans, 1981; Foster y Fagg, 1984 ).  
 AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolepropionato;  
 APB- 2-amino-4-fosfono butirato; APH ácido 2 amino 7 fosfono  
 heptanoico; APV-ácido amino fosfono valerico; DAAA- ácido D-alfa  
 amino adipico; DGGG- D-gama glutamil glicina; D-GLU y L-GLU -  
 ácido L y D glutamico; GAMS-ácido D-glutamil axino metil sulfónico;  
 GDEE- glutacato dietil ester; NMDA y NMLA - ácido N metil D y L  
 aspartico.

en la liberación del glutamato, así como de algunas otras sustancias (taurina, una sustancia semejante al GABA, y una sustancia que eluye en la HPLC entre el glutamato y la asparagina) (Jenison y cols., 1985; Bledsoe y cols., 1986).

Las células pilosas de la cóclea son capaces de transportar activamente glutamato y glutamina por un sistema de alta afinidad  $\text{Na}^+$ -dependiente (Eybalin y Pujol, 1983; Ryan y Schwartz 1984). Considerando el acople metabólico de la glutamina y el glutamato, la incorporación activa de glutamina puede ser una vía para la síntesis de glutamato tal como ha sido propuesto en el SNC. Adicionalmente, se ha encontrado en la cóclea que las enzimas asociadas a la síntesis del glutamato y aspartato; glutaminasa y aspartato amino transferasa (AAT), se encuentran en altas concentraciones. La glutaminasa se localiza especialmente en las células cocleares internas. La distribución de la AAT parece indicar una mayor participación de esta enzima en el metabolismo energético de las células, que en la transmisión sináptica (Fex y cols., 1982, 1985; Altschuler y cols., 1984; Fex y Altschuler, 1985, 1986; Wiet y cols., 1986).

En contraposición a estos resultados que indican la participación de los aminoácidos excitadores en la transmisión de información en diversos sistemas de células pilosas, se ha reportado, que la actividad producida por el glutamato en las aferentes primarias en los canales

semicirculares de la rana, se asocia con una despolarización de las células pilosas que estas inervan (Valli y cols., 1984). Los autores sugieren que este efecto presináptico del glutamato podría explicar la excitación observada por otros autores al estudiar únicamente la actividad de las fibras aferentes. Sin embargo, me parece que el glutamato no es la sustancia más adecuada para demostrar un efecto presináptico de los AAE, ya que su efecto despolarizante se produce de manera general en los sistemas excitables, por lo cual es esperable que ejerza una despolarización en las células sensoriales vestibulares. Para demostrar la existencia de receptores presinápticos debieran usarse agonistas específicos de los receptores de los AAE. En los electroreceptores del *Plotosus*, se ha demostrado que el glutamato aplicado iontoforéticamente en el órgano ampular de la línea lateral, produce un efecto excitador postsináptico, que no es susceptible de bloqueo con  $Co^{++}$  o  $Mg^{++}$ . Sin embargo, la aplicación de la toxina de la araña Joro (JSTX), bloqueador específico de receptores glutamatérgicos, produce una inhibición de la respuesta al glutamato, el KA y el QA aplicados iontoforéticamente, pero no de la descarga basal de las aferentes, ni de la respuesta a la estimulación eléctrica del receptor. Estos resultados indican que en la línea lateral del *Plotosus*, existen receptores aminoacídicos (glutamatérgicos) localizados a nivel postsináptico, los cuales sin embargo, no parecen participar en la respuesta fisiológica (Nagai y cols.,

1984). En estudios mediante HPLC, tampoco se ha demostrado un aumento significativo en la liberación de glutamato y aspartato ante estimulación auditiva de la cóclea del cuyo (Melamed y cols., 1982; Drescher y cols, 1983).

A pesar de evidencias parciales, no se cumplen los criterios que permitan afirmar que el glutamato es el transmisor aferente en los sistemas de células pilosas. Por ejemplo; no se ha logrado demostrar de manera convincente que el glutamato realmente se libere durante la estimulación (al menos en la cóclea). La existencia de mecanismos de síntesis y degradación del glutamato, no indica (al igual que en el caso del GABA) que estos estén asociados necesariamente a su función como neurotransmisores ya que pueden asociarse al metabolismo normal de la célula (Melamed y cols., 1982). Aún más, los experimentos en que se prueba el efecto del glutamato son difíciles de interpretar, ya que esta sustancia tiene un efecto excitador generalizado (Freeman, 1976). Por otro lado, a pesar de las evidencias que indican que el glutamato pudiera ser el transmisor en las células pilosas, no se ha logrado caracterizar con precisión en un mismo sistema, la acción de diferentes agonistas y antagonistas, así como estudiar su efecto en la descarga basal y en la respuesta ante la estimulación "fisiológica".

En este trabajo se han estudiado los efectos de aminoácidos excitadores, sus agonistas y antagonistas en el sáculo, la lagena y los canales semicirculares del axolotl *Ambystoma mexicanum*. Los resultados obtenidos se presentan extensivamente en esta tesis y en el trabajo II.

#### NEUROPEPTIDOS:

La existencia de péptidos neuroactivos en la cóclea fue descrita por primera vez por Fex y Altschuler (1981). Ellos demostraron la presencia de inmunorreactividad del tipo de la encefalina en el órgano de Corti del cuyo, asociada exclusivamente a las fibras cocleares eferentes. Estos estudios fueron posteriormente confirmados por la identificación, mediante HPLC, de sustancias del tipo de las encefalinas en la cóclea (Fex y Altschuler, 1981, 1985; Hoffman y cols., 1983, 1984, 1985; Eybalin y cols., 1983, 1984, 1985a, 1985b; Hoffman, 1986). Estudios inmunohistológicos ulteriores han permitido demostrar un efecto diferencial en el grado en que se marcan las eferentes que contactan las células cocleares internas y externas, sugiriendo la existencia de subsistemas de fibras eferentes (Eybalin y cols., 1983; Eybalin y Pujol, 1984). La inmunorreactividad a encefalinas desaparece en animales des-eferentados, indicando la asociación de estas sustancias al sistema eferente (Altschuler y cols., 1984a). Recientemente se ha encontrado inmunorreactividad asociada a péptidos



derivados de la encefalina B (prodinorfina), glucagon, insulina, colecistocinina y prolactina en la cóclea de cuyos (Hoffman y cols., 1985; Nowak y cols., 1986a, b). Respecto a los receptores involucrados existe poca información, en la coclea del cuyo se encuentran receptores tipo *f* y *k*, que inducen una inhibición de la adenilato ciclasa reversible por naloxona (Eybalin y cols, 1987).

En el sistema vestibular del conejo, existe fuerte inmunorreactividad a sustancia P, especialmente localizada en las terminales aferentes en forma de cáliz que inervan las células pilosas tipo I, del utrículo y el sáculo (Ylikoski y cols., 1984). Trabajos posteriores han encontrado inmunorreactividad a sustancia P y a colecistocinina en el cuerpo de las células pilosas (Nowak y cols., 1986 b). En la línea lateral de la rana se ha encontrado un péptido relacionado con el gen de la calcitonina en el sistema eferente (Adams y cols., 1987).

Es aún difícil llegar a una concepción integrada de esta información. Para la cóclea aparecen los neuropéptidos junto con la acetilcolina y el GABA como neurotransmisores asociados al sistema eferente. Sin embargo, no existe evidencia que permita decidir si se trata de diferentes subsistemas de fibras eferentes, o si existe una co-localización de neurotransmisores en una misma fibra,

como ha sido demostrado en las fibras olivococleares del cuyo (Altschuler y cols, 1984 a; Abou-Madi y cols, 1987).

#### CATECOLAMINAS:

Las catecolaminas también han sido estudiadas como posibles transmisores aferentes en células pilosas (Osborne y Thornhill, 1972). Los resultados en este caso son más consistentes, ya que no se ha encontrado que los antagonistas adrenérgicos tengan efecto alguno en la descarga de las fibras aferentes cocleares (Klinke y Evans, 1977), ni que la noradrenalina ejerza un efecto excitador sobre las mismas (Comis y Leng, 1979). Tampoco se ha encontrado actividad de la tirosina hidroxilasa en la cóclea de mamífero. En definitiva, la evidencia actual indica que las catecolaminas no participan en la transmisión aferente en sistemas de células pilosas.

#### ANAS (Substancia activadora del nervio auditivo):

En la perilinfa de sapos y cobayos sujetos a estimulación auditiva se ha detectado que se libera una substancia, la cual ejerce un efecto excitador sobre la frecuencia de descarga, en fibras aisladas del nervio auditivo. Por este motivo se le ha denominado Substancia Activadora del Nervio Auditivo (ANAS) (Sewell y cols, 1978; Guth y cols, 1985). En una revisión cuidadosa del trabajo donde se describe esta

substancia, encontramos que no se reporta haber estudiado los niveles de  $K^+$  en el perfusado con que se hizo el bioensayo, control que parece indispensable dadas las condiciones de la preparación, y la estimulación intensa a la que es sometida. Recientemente se han aportado nuevas evidencias que indican que existen factores activadores del nervio auditivo cuya estructura química no ha sido determinada aún (Sewell y Mroz, 1987). Se han encontrado al menos dos sustancias excitadoras que se liberan del oído interno del pez: una de bajo peso molecular (cerca de 200) y otra de mayor peso (cerca de 5000). En algunos extractos se ha identificado también una sustancia con efecto inhibitor sobre la descarga de las aferentes con peso molecular mayor a 5000.

#### PROPOSITO DEL TRABAJO.

En el presente trabajo me he propuesto estudiar los criterios electrofisiológicos (similitud de la acción, efecto de antagonistas) que permitan determinar cual de estas sustancias puede realmente ser propuesta como un transmisor aferente de los sistemas de células pilosas y particularmente en el modelo usado, el oído interno del axolotl (*Ambystoma mexicanum*). En base a los antecedentes presentados nos parece que el GABA y los aminoácidos excitadores son los candidatos más probables.

## MATERIAL Y METODOS.

El animal utilizado en los experimentos fue el axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Se usaron animales en estado larvario con un peso de 25 a 30 grs y una longitud de 15 a 20 cm. Se escogió el axolotl como modelo experimental debido a varios criterios: a). fácil manejo de estos animales en el laboratorio. b). es un animal de sangre fría por tanto no se requieren sistemas de control de temperatura durante el experimento. c). el sistema vestibular tiene un tamaño relativamente grande. d). presenta únicamente células pilosas del tipo II, las cuales reúnen las características morfológicas y fisiológicas de una sinapsis de tipo químico.

### Disección.

Los animales se decapitan sin anestesia, separando el maxilar inferior del resto de la cabeza. Se identifica visualmente la región del oído interno, la cual aparece como una zona blanquecina bilateral, en la parte posterior del paladar. Se abre la cápsula ótica exponiendo la región sacular. Inmediatamente se procede a sumergir la preparación en solución de Ringer de anfibio (NaCl 111 mM, KCl 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM Hepes 5 mM, glucosa 5 mM; Bracho y Budelli, 1978; Soto y cols, 1984; Slaughter y Miller, 1985). Posteriormente, bajo microscopio estereoscópico y en el baño de Ringer se disecciona la cápsula ótica, hasta identificar las

regiones de la mácula sacular, la mácula de la lagena y las ámpulas de los canales semicirculares (Figura 2).

La preparación se monta en una cámara en donde se fija por medio de alfileres, con la parte ventral hacia arriba.

#### Registro.

Se usaron tres técnicas de registro: dos para registro extracelular del nervio y otra para registro intracelular en las fibras aferentes y en las células pilosas. Para el registro extracelular, se disecciona y secciona todo el VIII par craneal. En un caso se toma con una pinza, que posee un tornillo que permite fijarla en una posición. El nervio queda atrapado en la pinza la cual funciona como electrodo de registro figura 3. Una vez fijo el nervio se procede a resecar parte de las fibras que lo forman hasta que en el registro de actividad eléctrica, sea posible distinguir claramente (relación señal ruido 2:1) una unidad de la actividad de fondo. Esta técnica, descrita originalmente por Lowenstein y Roberts (1949), tiene la ventaja de permitir estimular la preparación con desplazamientos mecánicos. En nuestro caso, la preparación se montó en una plataforma que puede inclinarse, lo que permite identificar la respuesta a estímulos fisiológicos de la fibra registrada. En otro caso se usó un electrodo de succión, que permite hacer un registro extracelular de actividad multi-unitaria, al mismo tiempo que la preparación puede estimularse mecánicamente.



Fig. 2. Vista del cat. interno del axon. En el microscopio  
electrónico, para una zona que muestra una estructura de  
filamentos que se conectan con el sistema de las fibras que  
forman el cat. externo. El axon. Para un estudio de la  
estructura del cat. interno.



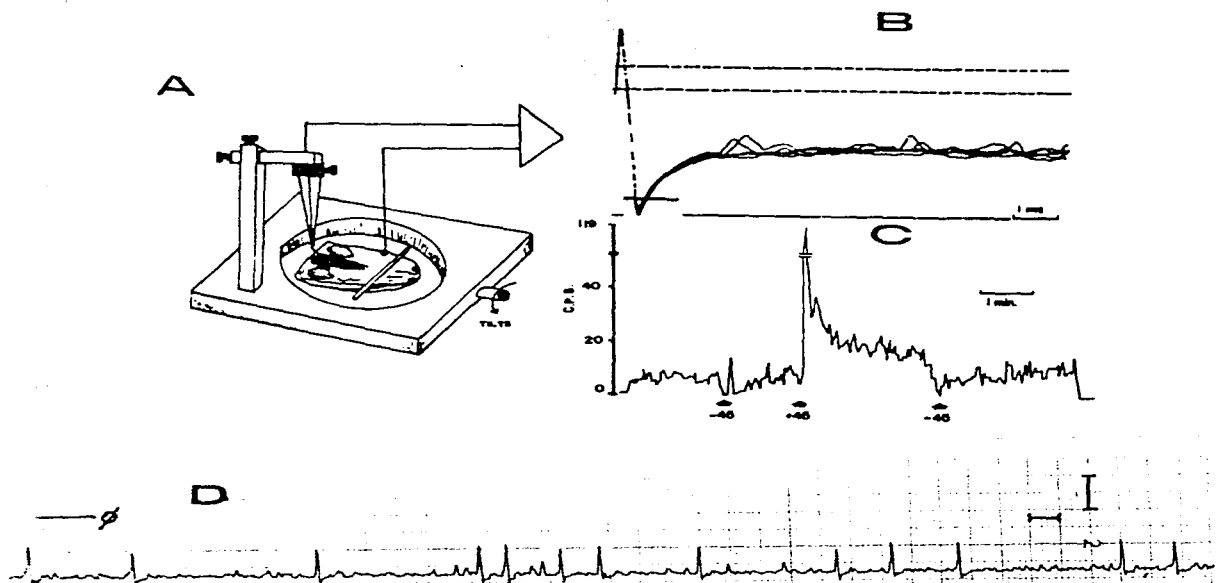


Fig 3. En A. se esquematiza la cámara para registro, la tapa de del acetato y un electrodo que establece contacto con las fibras aferentes. La preparación se monta en una superficie que permite estimular con inclinaciones. En B. registro multiunitario de la actividad aferente, un potencial de acción destaca claramente de la actividad de fondo, alcanzando el umbral del discriminador de ventanas. En C. histograma de frecuencias de una fibra sometida a estimulación, primero se registra la actividad en reposo, cuando la preparación se inclina a  $-45^{\circ}$  hay una disminución de la descarga, una transición de  $90^{\circ}$  en sentido contrario, produce una gran activación de las fibras seguida de adaptación. Inclinando nuevamente a  $-45^{\circ}$ , hay una disminución de la actividad. En D. registro intracelular en una fibra aferente, se aprecia claramente la actividad sináptica en forma de potenciales subumbrales, los cuales cuando alcanzan el nivel umbral generan un potencial de acción. La amplitud y la duración de los potenciales de acción aparecen modificadas, debido a las características de respuesta del registrador utilizado. Calibración horizontal 10 msec, vertical 20 mV.



Para este tipo de registro el nervio vestibular se secciona proximalmente al cerebro y el cabo libre se succiona en una pipeta de vidrio, de esta manera se produce un sello de alta resistencia eléctrica entre el vidrio y el nervio. Esta técnica tiene la ventaja de que permite registrar bajo perfusión constante (Valli y cols, 1984).

En los otros procedimientos se usaron microelectrodos de vidrio llenos con KCl 3 M, con una resistencia de aproximadamente 30 megaohms. Se hizo con ellos registro intracelular de las fibras aferentes y de las células pilosas. Para el registro de las células pilosas, la disección se amplió hasta exponer el epitelio de la mácula sacular, procediendo a extraerlo y montarlo en una cámara de registro. Para el registro de las aferentes se usó el mismo tipo de disección y montaje descrito anteriormente para electrodos extracelulares.

La actividad proveniente de los electrodos se derivó a un amplificador convencional de DC. La salida del amplificador se conectó a un osciloscopio (Tektronix 5111A), a un amplificador de audio, a una grabadora de FM (Gould 6500). En algunos experimentos se derivó la información a un registrador de papel (Gould 220) y a una computadora mediante un conversor análogo-digital (Tecmar Lab-Master). Para el procesamiento de los resultados se usó un discriminador de ventana (WPI modelo 121) y una

microcomputadora PC compatible (Columbia 1600). El análisis de la actividad neuronal se realizó generalmente en línea con el experimento, mediante un procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio (Soto y Vega, 1987, III).

#### Fármacos usados.

En este estudio ensayamos agonistas y antagonistas GABAérgicos; entre los agonistas probamos al ácido gamma amino butírico, (GABA) y el muscimol y como antagonistas utilizamos bicuculina y picrotoxina.

Los aminoácidos excitatorios probados fueron: los Ácidos L-glutámico (LG), D-glutámico (DG), L-aspartico (LA), D-aspartico (DA), Kainico (KA), quisquálico (QA) y el DL-N-metil D-aspartico (NMDA) Como antagonistas de los aminoácidos excitadores se usaron: L-dietil éster del glutamato (GDDE) y los Ácidos DL-2-Amino 5-fosfono valérico (APV), DL- 2-amino 4- fosfono butírico (APB) el D-alfa amino adípico (DAAA) y el Ácido Kynurénico (KY).

Se estudió también el efecto de la estreptomycin, la cual ha sido propuesta como un antagonista de los receptores de los AAE (Stone y Perkins, 1983; Onodera y Takeuchi, 1977).

En algunos experimentos se modificó la concentración de sales en la solución de Ringey, administrándose soluciones

con alto  $Mg^{2+}$  (10 mM) y bajo  $Ca^{2+}$  (0.03 mM) las cuales se conoce bloquean la liberación del transmisor. En otros experimentos se estudió el efecto de soluciones sin  $Mg^{2+}$  sobre la actividad inducida por algunos AAE.

#### Técnica de perfusión.

La preparación se perfundió de manera constante con solución Ringer normal o Ringer modificado según se indica, a razón de 2 ml por min. Para la aplicación de drogas se utilizaron jeringas Hamilton, colocando la punta aproximadamente a 0.5 mm del origen de las aferentes en la mácula. En cada ocasión se administraron 20  $\mu$ l. Esta técnica de microperfusión tiene la ventaja que permite producir aumentos momentáneos de la concentración de la sustancia probada en la vecindad de la sinapsis. Sin embargo la concentración final de la droga no es conocida, aunque sabemos, por mediciones electro-químicas, que la droga se diluye de uno a dos órdenes de magnitud en un periodo muy corto.

En algunos casos de registro extracelular, que se indican en la sección de resultados, así como para el registro intracelular en células pilosas, las drogas se administraron en el baño a una concentración final conocida.

#### Procesamiento de resultados.

Para determinar si una droga tiene efecto en la frecuencia de descarga de una fibra, se realizó una prueba estadística no paramétrica: el test de U Mann Whitney. Para esto se realizó un programa de computación que permite seleccionar una región de un histograma de frecuencia (p.ej: descarga basal control) y compararlo con otra región del histograma de la misma célula (ej: descarga luego de aplicar la droga) (Soto, Echague y Vega, IV).

Para la comparación de efectos de una droga o manipulación experimental entre diferentes registros, se normalizaron los resultados como porcentaje de la descarga basal de la propia fibra. De esta manera se construyeron las gráficas dosis-efecto.

### RESULTADOS.

#### GABA.

Inicialmente se estudiaron los efectos del GABA, muscimol, picrotoxina y bicuculina. Para estos experimentos el registro en todos los casos fue extracelular usando una pinza como electrodo. Estos resultados han dado origen a la publicación que se encuentra en la parte II de esta tesis.

El GABA en concentraciones de 0.1 y 0.01 mM se probó en 28 células no encontrando efectos significativos (figuras 4 y 5), en concentración de 10 mM se probó en 36 células; sólo en el 30% de estas hubo un aumento en la frecuencia de descarga. Sin embargo en algunas ocasiones se encontró un aumento en la ritmicidad en la descarga basal de estas fibras.

El muscimol se probó en 21 fibras en concentraciones que iban de 0.1 a 0.001 mM. Cuando se perfunde el muscimol en altas concentraciones (0.1 mM), se produce una excitación moderada de las fibras aferentes que, sin embargo, no alcanza a ser significativa. En concentraciones menores el muscimol es inactivo en estas fibras.

Con los antagonistas usados, se encontró que la bicuculina en concentración de 1.0 y 0.1 mM es prácticamente inactiva en las fibras estudiadas, en tanto que la picrotoxina en concentración 1.0 y 0.1 mM muestra una actividad inhibitora poco potente en el 30% de las fibras estudiadas. En la figura 6 se muestran las gráficas dosis-efecto para las drogas estudiadas.

#### AMINOACIDOS EXCITADORES.

La mayoría de los experimentos en que se ha estudiado el efecto de agonistas y antagonistas de los AAE se

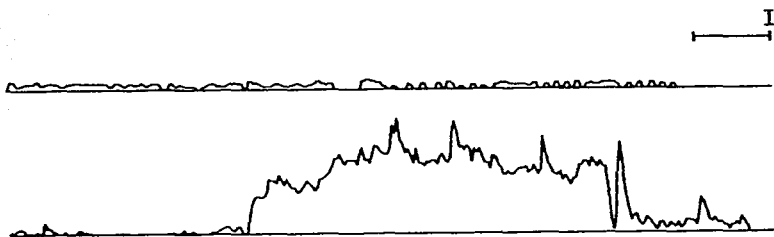


Fig 4. Histogramas de frecuencia de dos fibras de los canales semicirculares. En ambas gráficas, se muestra un registro control (NR), y aplicación de GABA 10 mM (G). En el registro superior, la aplicación de GABA produce un cambio en el patrón de descarga de la fibra. En el registro inferior un efecto excitador (se seleccionó el caso extremo en que encontramos la máxima respuesta al GABA entre todos nuestros experimentos). Calibración horizontal 1 min, vertical 10 Hz.

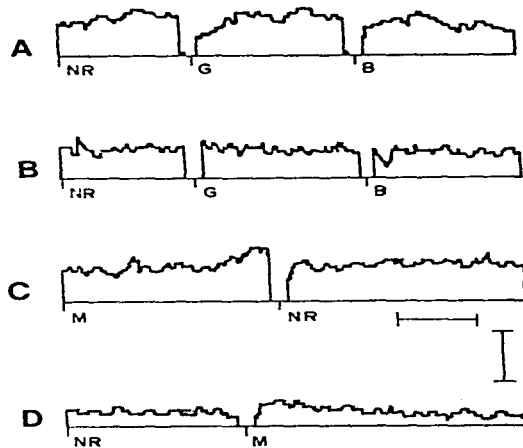


Fig 5. Histogramas de frecuencia de una fibra del sáculo (registros A y C) y de otra del canal (B y D). Ambas fibras son sometidas a las mismas manipulaciones experimentales, la aplicación de GABA (G) 10 mM, bicuculina 10 mM (B) y muscimol 0.01 mM (M). Únicamente en el registro D. puede observarse un efecto con respecto a la actividad control (NR). Calibración horizontal 1 min, vertical 10 Hz.

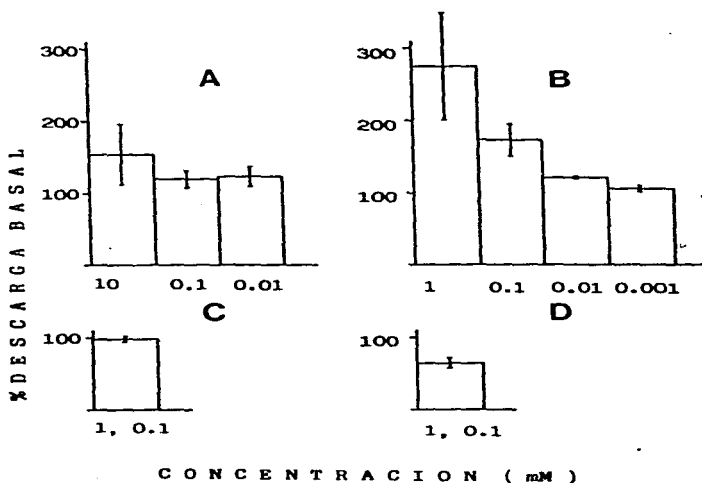


Fig 6. Graficas dosis-efecto de GABA (A), muscimol (B), bicuculina (C) y picrotoxina (D). El efecto del GABA aún en concentración 10 mM no alcanza a ser significativo, el muscimol (B) produce un efecto significativo cuando se administra en concentraciones de 1.0 mM o superiores. La bicuculina (C) es prácticamente inactiva en este sistema. La picrotoxina produce un decremento del 30% aproximadamente en la actividad de las aferentes vestibulares.



realizaron usando la técnica de registro intracelular. La excepción son los experimentos en que se estudió el efecto de antagonistas de los aminoácidos excitadores sobre la actividad evocada por estimulación fisiológica del vestíbulo, y los experimentos en que se estudió el efecto de estreptomycin, casos ambos en que se usaron las dos técnicas para registro extracelular.

El Ácido L-glutámico (n = 48) produce un efecto excitador dependiente de la dosis. Con una concentración de 10 mM la frecuencia basal de descarga se incrementa hasta 2.5 veces. El efecto del L-glutámico es rápido y de poca duración. A concentraciones menores (0.1 y 1.0 mM) el efecto es menor, pero generalmente de mayor duración (Figura 7). El Ácido L-aspartico (n = 53) en concentraciones de 0.1 a 10 mM tiene una potencia similar a la del glutámico pero su efecto es generalmente de mayor duración (Figura 7). En cambio, su isómero D-aspartico (n = 24) es mucho más potente en algunas de las células estudiadas, y su efecto puede durar hasta varios minutos (Figuras 7 y 8). Con pruebas sucesivas de estas sustancias en una misma fibra no se encontró desensibilización.

Se usaron también algunos agonistas más específicos para determinar el tipo de receptor involucrado en este efecto excitador del Ácido glutámico y el aspártico.

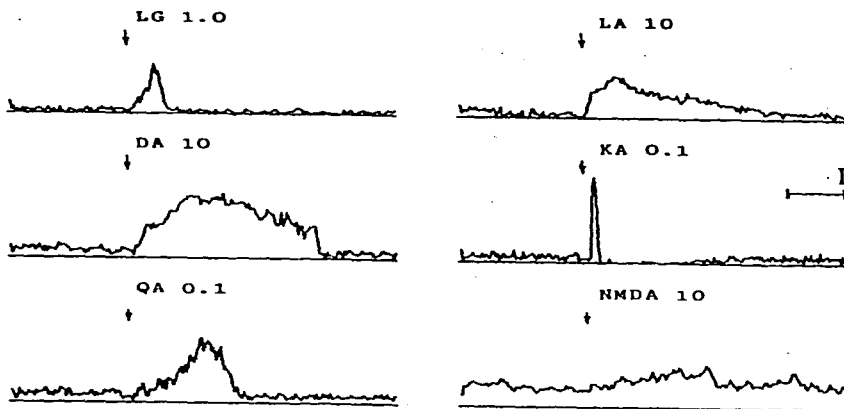


Fig. 7. Registros típicos del efecto inducido por los agonistas de los AAE ensayados. Los agonistas más activos son el kainico (KA) y el quisquálico (QA). Los efectos del LA, DA y QA tienen un curso temporal más prolongado que los de LG y KA. El NMDA es casi inactivo en las aferentes vestibulares. El número al lado de cada droga indica la concentración utilizada. Calibración horizontal 1 min, vertical 10 Hz.

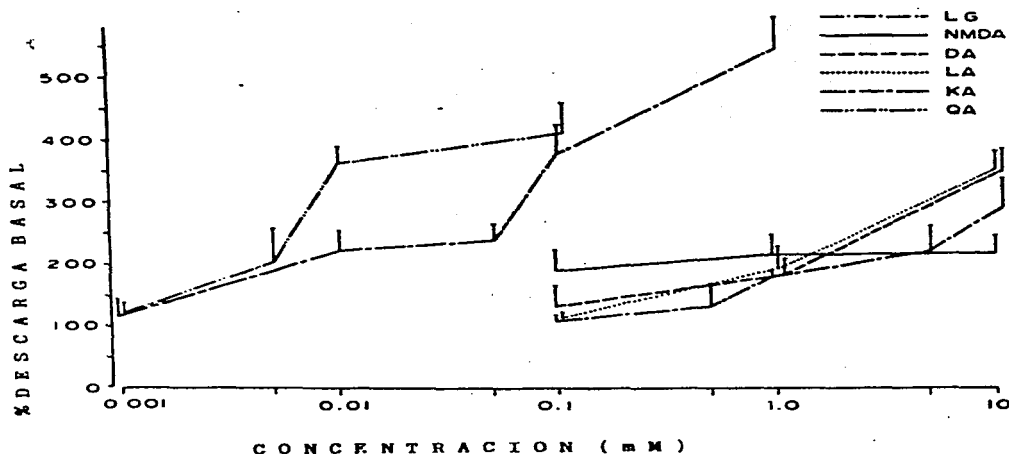


Fig 8. Curvas dosis efecto para los agonistas estudiados. Se aprecia claramente que el KA y el OA son los agonistas más potentes, presentando actividad en concentración de 0.005 mM. Las demás drogas estudiadas producen todos efectos semejantes entre sí. Las barras verticales en torno al promedio representan el error estandar.

El NMDA se estudió en un total de 50 células. Cuando las pruebas se realizaron con Ringer normal (32 células) el máximo incremento en la frecuencia de descarga fue del 200% con concentración 10 mM. Cabe destacar que la curva dosis-efecto para el NMDA en las concentraciones ensayadas (0.1 a 10 mM) es casi plana mostrando un efecto poco dependiente de la concentración usada (Figura 8). Al quitar el  $Mg^{2+}$  del Ringer encontramos un aumento en la actividad del NMDA, sin embargo este aumento no es estadísticamente significativo.

Entre los agonistas probados los que producen el mayor aumento en la frecuencia de descarga son: el Acido kainico (n = 29) y quisquálico (n = 31). El efecto producido por estas sustancias llegó hasta 700% de incremento en la actividad basal. El Acido Kainico en concentración de 0.01 mM produce un incremento significativo de la actividad, mostrando una clara dependencia del efecto con respecto a la concentración usada (Figura 8). A las concentraciones ensayadas (0.001 a 1.0 mM) el Acido kainico produce un efecto rápido y de muy poca duración seguido generalmente de una depresión de la actividad basal de las fibras (Figura 7). El Acido quisquálico en concentraciones de (0.001 a 0.1 mM), produjo un efecto de amplitud similar al inducido por el kainico, pero con curso temporal mucho más prolongado no seguido de inhibición (Figura 7).

Entre los antagonistas de los AAE se estudiaron los efectos del D-alfa amino adipico, glutamato dietil éster, DL-2-amino 5-fosfona butírico, DL-2-amino fosfona valérico y el ácido kynurénico.

El D-alfa amino adipico (DAAA), se ensayó en 20 células. Se obtuvo un decremento en la frecuencia de descarga cuando la concentración fue mayor a  $10^{-3}$  recuperándose la actividad basal un minuto después (Figura 9).

El DL-2-amino 5-fosfona butírico (APB) fue estudiado en 24 células. En concentraciones de 1.0, 5.0 y 10.0 mM, produjo un efecto inhibitor dependiente de la dosis (Figura 9). La inhibición inducida por el APB es de larga duración (5 min) (Figura 9). Cabe destacar que en algunas ocasiones el APB induce un efecto bifásico caracterizado por una rápida excitación (20 - 30 seg) seguida de una inhibición más duradera (4 - 5 min).

El ácido kynurénico se estudio en 29 fibras, este es el antagonista más potente de los que se estudiaron, ya que en concentración 10 mM produce una inhibición total de la actividad aferente y es activo aún a concentración de 0.1 mM (Figura 10). La inhibición inducida por el kynurénico al igual que en el resto de antagonistas estudiados es

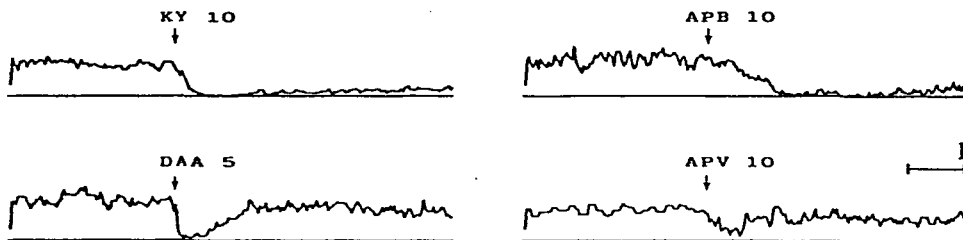


Fig. 9. Histogramas de frecuencia del efecto tipico de los antagonistas de los AAE. La inhibición inducida por el DAA y por el APV es de corta duración (1 min). El resto de antagonistas ejercen un efecto inhibitor más prolongado. El kynurénico es el más potente de los antagonistas estudiados por nosotros, y el que ejerce su efecto con una latencia menor. El APV muestra muy poca actividad en esta preparación. Calibración horizontal 1 min, vertical 10 Hz.

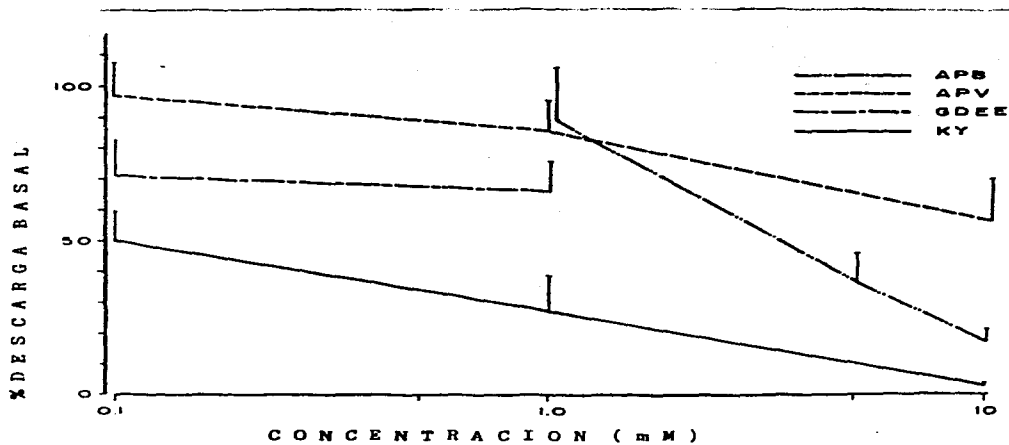


Fig 10. Curvas dosis efecto de los antagonistas ensayados. El más potente es el kynurénico, el cual reduce la descarga basal hasta un 50% en concentración de 0.01 mM. En la curva dosis efecto para el APV se observa su baja potencia inhibidora.

completamente reversible luego de aproximadamente 5 min. El ácido kynurénico bloquea no solo la actividad espontánea de las fibras aferentes, sino también la excitación inducida por el kainico y el quisquálico (Figuras 9 y 11).

El glutamato dietil éster (GDEE) se estudió en 28 fibras, en concentraciones de 0.1 y 1.0 mM (Figura 10). Esta droga produce una inhibición poderosa de la actividad basal y su efecto es de larga duración y reversible.

El DL-2 amino 5-fosfona valérico (APV) (específico para receptores tipo NMDA) se estudio en 12 fibras, encontramos que produce una inhibición poco potente y de corta duración (1 min) de la actividad basal. Su efecto es parecido en el curso temporal al del DAAA, aunque de menor potencia. En las curvas dosis-efecto encontramos que el APV es el menos potente de los antagonistas estudiados ya que en concentración de 10 mM produce un 30% de decremento en la actividad basal (Figura 9) y en concentraciones menores (0.1 y 1.0 mM) el APV es prácticamente inactivo (Figura 10).

Se estudió también el efecto de la estreptomycin sobre la actividad de las fibras aferentes vestibulares y el potencial de membrana de las células pilosas. La estreptomycin no tiene ningún efecto significativo sobre el potencial de membrana de las células pilosas aún cuando se perfunde continuamente por una hora (Figura 12). En el



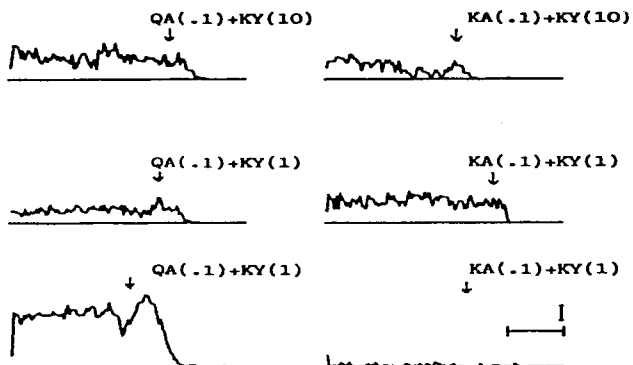


Fig. 11 Histogramas de frecuencia de fibras a las cuales se aplico conjuntamente un agonista y un antagonista. A la izquierda aplicacion conjunta de ácido kainico y ácido kynurenico. A la derecha se aplico conjuntamente ácido quisqualico y ácido kynurenico. El número asociado a cada droga indica la concentración mM. Se observa en general un bloqueo de la activación inducida por el agonista. Calibración horizontal 1 min, vertical 10 Hz.

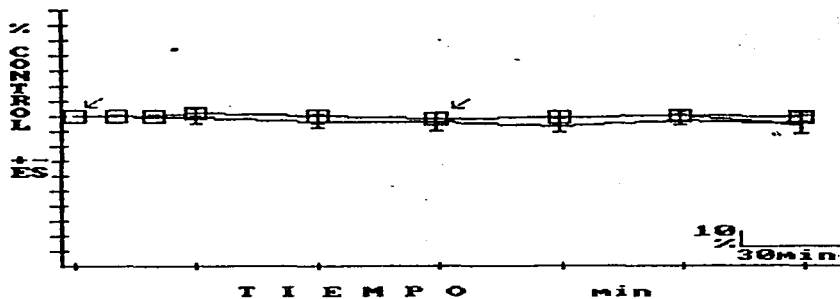


Fig 12. Registro del potencial de membrana en células ciliadas, en presencia de estreptomicina. En la gráfica se resume el resultado de 10 experimentos control (□) y 6 experimentos en los que la preparación se sometió al efecto de la estreptomicina durante 90 min (flechas). Como puede apreciarse la estreptomicina no ejerce un efecto significativo sobre el potencial de membrana de las células ciliadas.

registro con electrodo de succión de las aferentes, encontramos que la estreptomycinina aplicada en el baño en concentración 1 mM inhibe la actividad espontánea de estas fibras. Esta inhibición es de larga duración (3 - 10 min) y completamente reversible. La estreptomycinina inhibe la actividad espontánea, sin embargo, no es capaz de inhibir la excitación inducida por la aplicación de kainico (0.1 mM), glutámico (1 mM) o NMDA (1 mM) (Figura 13), ni la respuesta de las aferentes ante la estimulación con inclinaciones.

En un intento por definir la participación de los AAE en la actividad fisiológica de las aferentes vestibulares, se estudió el efecto de el APV y el ácido kynurénico sobre la respuesta evocada por estimulación fisiológica (inclinaciones) de la preparación. Para ello se usó la técnica de registro extracelular con macroelectrodo (pinza), la cual permite estimular con movimientos la preparación. En estas condiciones se encontró que el ácido kynurénico (1 mM) bloquea no solo la actividad espontánea, sino también la respuesta a la estimulación fisiológica, en tanto el APV (1 y 10 mM) no tiene un efecto significativo sobre la respuesta del sistema a la estimulación (Figura 14).

En otros experimentos, se estudió el efecto de soluciones Ringer con alto  $Mg^{2+}$  (10 mM) y bajo  $Ca^{2+}$  (0.09 mM) sobre la actividad inducida por los agonistas de los AAE. La perfusión con Ringer con alto  $Mg^{2+}$  y bajo  $Ca^{2+}$

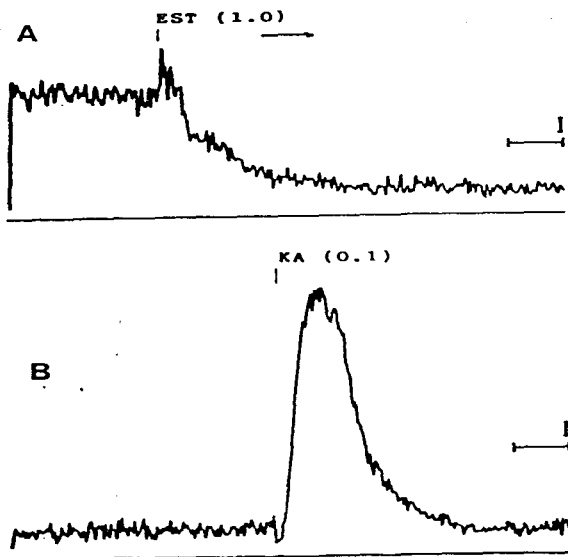


Fig 13. Histograma de frecuencia de fibras sometidas al efecto de la estreptomina. En A el registro en condiciones control, posteriormente se aplica estreptomina (Est) 1 mM en el café. En B, luego de 10 min de perfusión con estreptomina se aplicó ácido kainico (KA) 0.1 mM. En los registros multiunitarios, como el que se presenta en esta figura, comúnmente y a bajas dosis no se observa un periodo de silencio luego de la aplicación de kainico. Calibración horizontal 1 min vertical 10 Hz.

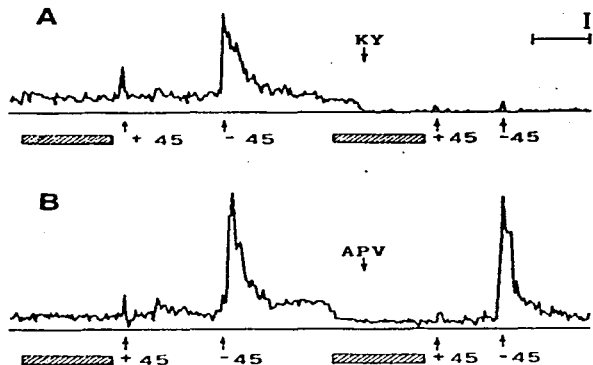


Fig 14. Efecto de antagonistas de los AAE en la respuesta a estimulación mecánica. En A, periodo de control, posteriormente se estimula la preparación con una inclinación hacia  $+45^\circ$ , que produce una respuesta muy corta, estimulando con una inclinación a  $-45^\circ$ , se produce una clara respuesta seguida de adaptación y un periodo de actividad sostenida. Posteriormente la preparación se regresa a la posición horizontal, y se aplica KY (1.0 mM) el cual produce una inhibición de la actividad basal. Se repiten las maniobras de estimulación encontrando que el KY bloquea completamente la respuesta a inclinaciones. En B, manipulaciones experimentales similares, aplicando APV (1 mM) en lugar de KY. Como puede observarse el APV no tiene prácticamente efecto sobre la actividad basal y no bloquea la respuesta a la estimulación mecánica.

induce un bloqueo rápido de la actividad espontánea de las aferentes vestibulares y la desaparición de potenciales postsinápticos, así como una hiperpolarización de alrededor de 5 a 10 mV. Para estudiar el estado funcional de las aferentes cuando la actividad basal ha sido bloqueada por las soluciones con alto  $Mg^{2+}$  y bajo  $Ca^{2+}$ , se decidió estimular algunas fibras ( $n = 10$ ) con pulsos eléctricos. Se encontró que las fibras responden normalmente ante la estimulación eléctrica (Figura 15), y el umbral para la respuesta se encuentra en los mismos niveles que en soluciones con Ringer normal (8 a 15 mV). En estas condiciones, el L-glutámico, D-aspartico, quisquálico y kainico producen un claro efecto excitador, indicando que su acción muy probablemente es a nivel postsináptico (Figura 16). El efecto excitador inducido por estas sustancias en Ringer con alto  $Mg^{2+}$  bajo  $Ca^{2+}$  es en general de menor amplitud (medida al pico del efecto máximo), y con un curso temporal diferente al observado en Ringer normal.

En otro grupo de experimentos se estudió el efecto del ácido kainico y el glutamato, ambos en concentración 1.0 mM, sobre el potencial de reposo de las células pilosas. Nuestros resultados muestran que ambos compuestos no producen un efecto significativo sobre el potencial de membrana de estas células (Figura 17).

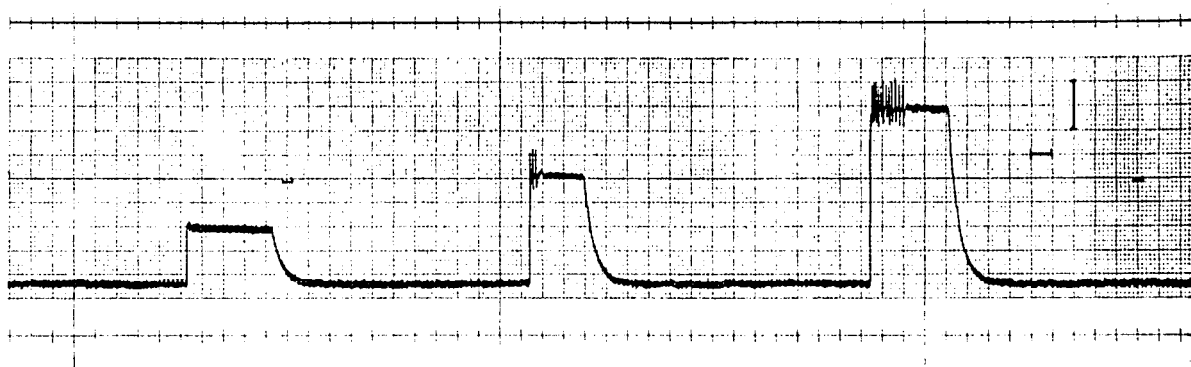


Fig. 15. Registro intracelular en una fibra aferente en la cual se ha bloqueado completamente la actividad basal perfundiendo con solución Ringer con alto contenido de  $Mg^{2+}$  y bajo  $Ca^{2+}$ . La estimulación con pulsos eléctricos (a, b, c) induce actividad cuando estos rebasan el nivel umbral de la fibra (b, c). La descarga presenta fenómenos de adaptación los cuales también se observan en Ringer normal. La línea de base del registro muestra una actividad sinusoidal constante que tiene su origen en el sistema de registro electrónico. Calibración horizontal 200 msec, vertical 10 mV.

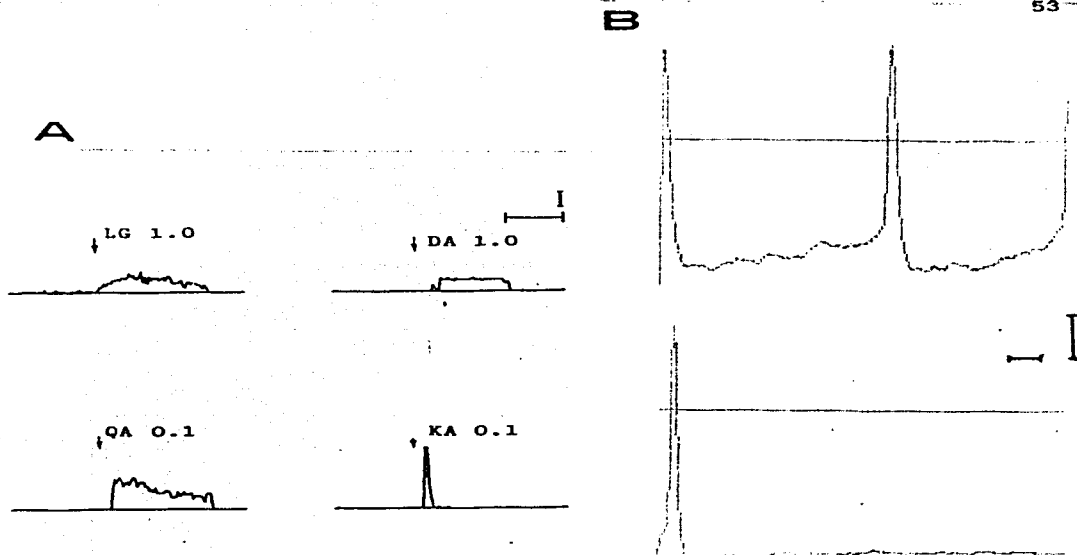
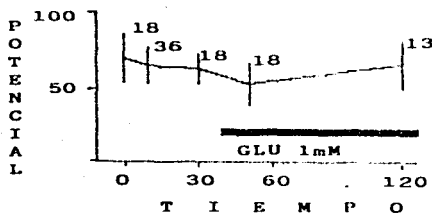


Fig 15. En A, histogramas de frecuencia de fibras a las cuales se aplico un agonista de los AAE en Ringer con alto  $Mg^{2+}$  (10 mM) y bajo  $Ca^{2+}$  (0.09 mM). En estas condiciones se produce una rapida disminucion de la actividad basal debido al bloqueo de la liberacion de neurotransmisor. Luego que la actividad basal ha disminuido significativamente se aplicaron agonistas de los AAE: L-glutamico (1 mM, n = 15), D-aspartico (1 mM, n = 6), quisqualico (0.1 mM, n = 5) y kainico (0.1 mM, n = 6), los cuales muestran un claro efecto excitador. Calibracion horizontal 1 min, vertical 10 Hz. En B, registro intracelular de una fibra aferente. En el registro superior durante la perfusion con solucion de Ringer normal, en la parte inferior cuando se perfunde con solucion de Ringer con alto  $Mg^{2+}$  y bajo  $Ca^{2+}$ . Para permitir una adecuada comparacion se escogio un segmento del registro con alto  $Mg^{2+}$  y bajo  $Ca^{2+}$  durante el cual no estaba bloqueada completamente la actividad de la fibra, la cual muestra un potencial de accion de morfologia semejante a los que se presentan en el registro con Ringer normal. Se aprecia claramente la disminucion en la actividad subumbral cuando el registro se hace en Ringer con alto  $Mg^{2+}$  y bajo  $Ca^{2+}$ . Calibracion horizontal 1 mseg, vertical 10 mV.



A



B

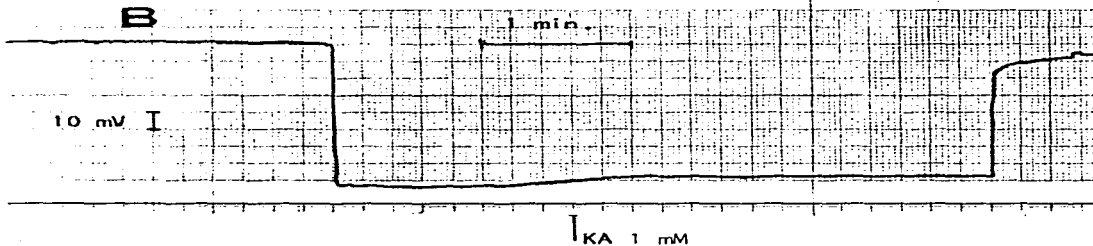


Fig. 17. Registro intracelular en el epitelio sensorial de la macula del saculo. En A, grafica de potencial contra tiempo de grupos de células (el número asociado a cada punto significa el número de células) registradas antes y durante la aplicación de glutamato 1 mM en el baño (marca). Se observa una tendencia a disminuir en el potencial de membrana de estas células. La aplicación de glutamato en el baño no modifica significativamente esta tendencia. Luego de más de una hora de perfusión constante con glutamato, se observa que el potencial continúa en los valores control (potencial en mV, tiempo en min). En B, registro de potencial de membrana en una célula a la cual se aplicó ácido kainico 1 mM. Este tipo de registros no son perfectamente estables como puede observarse en la tendencia de la célula a despolarizarse. Los casos en que se logra perfundir mientras se registra el potencial son pocos (n = 3), por ese motivo para el glutamato se usó otro enfoque experimental registrando grupos de células.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Nuestros resultados indican que de entre las drogas relacionadas con el GABA y con los AAE, únicamente estas últimas cumplen con los criterios fisiológicos que permitan proponerlos como transmisores de la sinapsis aferente. Esto es: remedan la activación producida por la estimulación fisiológica, sus antagonistas bloquean tanto la activación inducida por la estimulación fisiológica, como la inducida por los agonistas, el efecto se ejerce a nivel postsináptico. Si bien estos criterios indican cuales sustancias actúan sobre los receptores sinápticos, nada nos dicen en torno a las sustancias endógenas que median esta respuesta. Nuestro trabajo aporta evidencia en torno a los agentes que presentan un efecto farmacológico en la sinapsis y a partir de esto inferimos cual es el probable transmisor endógeno.

Las potencias relativas de los agonistas y antagonistas de los AAE, sugieren que los receptores involucrados en la respuesta son del tipo no-NMDA (Watkins, 1984), ya que los agonistas que muestran una mayor potencia excitadora son el Acido kainico y el quisquálico, amén de que el NMDA es casi inactivo, en tanto el APV antagonista específico para receptores tipo NMDA es casi inactivo y los antagonistas con

mayor potencia son del tipo inespecifico. El efecto de bloqueo que produce el ácido kynurénico sobre la descarga evocada por estimulación mecánica del vestibulo, constituye un hallazgo importante ya que demuestra que los antagonistas de los AAE son capaces de bloquear completamente la transmisión en este sistema. Este resultado permite afirmar que la transmisión aferente es mediada por receptores a AAE. Cabe destacar que el APV que es un antagonista específico de los receptores tipo NMDA no logra bloquear completamente la respuesta a estímulos mecánicos, lo cual confirma la idea de que los receptores involucrados son fundamentalmente de tipo no-NMDA. Sin embargo, debe tenerse cautela al interpretar estos resultados, particularmente en lo que se refiere a la caracterización del tipo de receptor involucrado, ya que se han probado únicamente algunos agonistas y antagonistas de los AAE, además de que algunos de los fármacos usados son muestras racémicas (ej: DL-APB, DL-APV) y se conoce que generalmente uno de los isómeros es más activo que el otro (Watkins y Olverman, 1987). Por tanto hasta no probar el efecto de las formas L y D puras, no es posible afirmar con certeza el tipo de receptores involucrados y su grado de participación en la respuesta fisiológica del sistema. Por otro lado, la calidad de los fármacos disponibles aparentemente varía por lotes y procedencia. Se ha reportado que el GDEE comúnmente está contaminado con glutamato, teniéndose en consecuencia una mezcla de agonista y antagonista (López-Colomé and Roberts, 1987; López-Colomé,

comunicación personal). En nuestro trabajo no hemos tenido la precaución de purificar estas drogas, lo cual pudiera en parte explicar la relativamente baja potencia del GDEE.<sup>3</sup>

Aunado al criterio de similitud del efecto inducido por los agonistas con la respuesta fisiológica, debe considerarse la concentración a la cual estos agonistas ejercen dicho efecto. En nuestro caso, al analizar las concentraciones utilizadas, debe considerarse el método mediante el cual se aplicó la droga. Para los análogos del GABA, se trabajó mediante sustitución completa del baño, por lo tanto las concentraciones expresadas en la sección de resultados representa la concentración final. En cambio, para drogas relacionadas con los AAE, se trabajó mediante microperfusión (excepto en el caso de la estreptomycinina que se aplicó tanto por microperfusión como por sustitución del baño), por tanto las concentraciones expresadas en la sección de resultados se encuentran uno a dos órdenes de magnitud por arriba de la concentración final.

---

<sup>3</sup> De hecho en experimentos recientes con registro multiunitario (no incluidos en este trabajo), hemos encontrado que el Ac. quisqualico de un lote recientemente adquirido de Sigma, presenta una potencia mucho mayor en comparación con la que habíamos observado anteriormente, siendo activo cuando se administra por microperfusión en concentración de 0.00001 mM.

El efecto de bloqueo sobre la liberación de neurotransmisores de las soluciones con alto  $Mg^{2+}$  y bajo  $Ca^{2+}$  se ha estudiado en muy diversas preparaciones. En el oído interno se ha encontrado que las soluciones con alto  $Mg^{2+}$  y bajo  $Ca^{2+}$  no modifican el mecanismo generador de espigas de las aferentes en la cóclea (Siegel y Relkin, 1987). Por otro lado se ha obtenido evidencia directa indicando que la liberación de transmisor en el sistema vestibular y en la línea lateral es dependiente de  $Ca^{2+}$  (Furukawa y cols, 1972; Rossi y cols, 1977; Drescher y Drescher, 1987). Nosotros encontramos que la perfusión con soluciones con alta concentración de  $Mg^{++}$  y bajo  $Ca^{++}$  bloquean la actividad de las aferentes al mismo tiempo que desaparecen del registro los potenciales sinápticos. En estas condiciones la estimulación eléctrica de las aferentes induce una actividad normal, indicando que en nuestra preparación no parece haber modificaciones del mecanismo generador de espigas. En estas condiciones el efecto excitador inducido por los agonistas de los AAE demuestra que existen receptores localizados a nivel postsináptico, ya que el bloqueo de la liberación presináptica del neurotransmisor, no modifica sustancialmente la activación inducida por agonistas de los AAE. Aunada a esta evidencia, encontramos en el registro intracelular en las células pilosas, que el kainico y el glutámico son inactivos en la terminal presináptica desde el punto de vista electrofisiológico.

Al estudiar los efectos inducidos en soluciones con alto  $Mg^{2+}$  y bajo  $Ca^{2+}$ , debe tenerse en consideración, que este tipo de modificaciones en la concentración de iones en el baño se refleja necesariamente en las corrientes iónicas que pudieran generarse a nivel de la fibra aferente. Aunque desconocemos para nuestro sistema en particular las corrientes iónicas que se activan en respuesta a los AAE, parece especialmente relevante en el caso de fármacos relacionados con los receptores tipo NMDA, ya que se ha encontrado que las corrientes iónicas inducidas por esta sustancia tienen una clara modulación por  $Mg^{2+}$  (Nowak y cols, 1984; Mayer y cols, 1984; MacDermott y Dale, 1987; Ascher y Nowak, 1987; Mayer y Westbrook, 1987). En nuestra condición experimental tendríamos teóricamente bloqueados los canales iónicos asociados a receptores tipo NMDA, debido a la alta concentración de  $Mg^{2+}$ , particularmente cuando usamos Ringer con alto  $Mg^{2+}$  y bajo  $Ca^{2+}$ . Hasta que grado las diferencias observadas en la respuesta con Ringer normal y Ringer con alto  $Mg^{2+}$  y bajo  $Ca^{2+}$  se deben a un bloqueo de corrientes debido al  $Mg^{2+}$  ?. Un intento primario por evaluar esta posibilidad lo hicimos mediante la eliminación del  $Mg^{2+}$  del Ringer, sin embargo no encontramos que esta maniobra nos permitiera, como en otras preparaciones desenmascarar los efectos inducidos por NMDA. Pienso que es necesario realizar experimentos adicionales para definir si los receptores tipo NMDA en esta preparación existen y en este caso se comportan

diferente a los encontrados en otras preparaciones, o simplemente este tipo de receptores no se encuentran en el sistema.

Los resultados que hemos obtenido estudiando agonistas y antagonistas de los AAE coinciden en general con los que se han reportado por otros autores estudiando estas sustancias en el SNC (Cotman y cols, 1981; Watkins y Evans, 1982; Foster y Fagg, 1984; Watkins, 1984; McLennan, 1987; Mayer y Westbrook, 1987). Llama la atención algunas diferencias; por ejemplo, no conocemos de ningún trabajo previo que reporte efectos tan prolongados cuando se perfunde el D-aspartato. En nuestras condiciones esta droga presenta efectos excitadores muy prolongados que en casos extremos llegan hasta los 20 min. Algunos autores (Balcar y Johnston, 1972) han pensado que el efecto del D-aspartato se ejerce a nivel presináptico por bloqueo de los sistemas de recaptura del transmisor endógeno, o bien ya que el D-aspartato se ha demostrado que es un sustrato para estos sistemas, podría producirse un fenómeno de intercambio por el transmisor endógeno (Davies y Johnston, 1976; Harris y cols, 1987). En un intento por definir si ésta pudiera ser la explicación de nuestros hallazgos, estudiamos el efecto del D-aspartato cuando ha sido bloqueada la liberación del transmisor por alto  $Mg^{2+}$  y bajo  $Ca^{2+}$ . Encontramos que en esta condición persiste el efecto excitador del D-aspartato,

indicando que su efecto es postsináptico y no exclusivamente presináptico.

Parece muy llamativa la diferencia en la duración del efecto de las drogas agonistas de los AAE estudiadas. Por ejemplo, el Ácido kainico y el quisquálico, tienen efectos de amplitud semejante, pero de duración muy diferente. El Ácido quisquálico produce un efecto excitador que se caracteriza por un incremento lento de la actividad de las aferentes y que se mantiene por hasta 3 min. En cambio el Ácido kainico produce una activación súbita y de corta duración de la descarga aferente. Este hallazgo me parece atractivo y permite sugerir como hipótesis, que la respuesta del sistema vestibular a la estimulación fisiológica estaría mediada por dos componentes; uno inicial de tipo fásico mediado por la interacción del transmisor endógeno con receptores del tipo kainico y un segundo componente lento de tipo tónico mediado por la interacción del transmisor con receptores del tipo quisquálico. Esta hipótesis aunque atractiva no es sujeto de prueba experimental en tanto no existan antagonistas específicos que permitan discernir claramente entre los efectos mediados por los receptores que prefieren kainico y los que prefieren quisquálico. Sin embargo, no se puede excluir el hecho de que las diferencias en potencia y curso temporal observadas pudieran deberse a diferencias farmacocinéticas entre las drogas utilizadas.



Considero que la inhibición de la descarga espontánea por la estreptomycinina constituye un resultado interesante. Se ha descrito que la estreptomycinina bloquea la transducción en células pilosas (Ryhak, 1986). Sin embargo esto no permite explicar nuestros resultados, ya que la descarga espontánea parece depender más bien del potencial de membrana de la terminal presináptica, el cual en nuestras condiciones no se ve afectado por la estreptomycinina. Se ha propuesto también, que la estreptomycinina bloquea la corriente de  $Ca^{2+}$  que media la liberación de transmisor (Williams y cols, 1987), lo cual constituye una posible explicación del efecto inhibitor que observamos. Esta interpretación se refuerza por el hecho de que esta droga no bloquea el efecto inducido por agonistas (glutamato, kainico, NMDA) de los AAE (vale la pena destacar que no hemos probado el efecto de estreptomycinina sobre las respuestas inducidas por el ácido quisquálico).

Los resultados obtenidos con los análogos del GABA, coinciden con reportes previos en la literatura, en los cuales se ha encontrado que el GABA es inactivo en el oído interno de anfibios. Desde el punto de vista de criterios fisiológicos, no se ha logrado demostrar su papel como transmisor aferente. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el GABA podría jugar un papel modulador en el

oído interno del axolotl. Queda también la posibilidad de que el GABA sea el transmisor en otros sistemas de células pilosas como en el oído del pollo (Meza y cols., 1984) y algunos mamíferos (Felix y Erenberger, 1984).

## BIBLIOGRAFIA.

- Abou-Madi, L., Pontarotti, P., Tramu, G., Cupo, A. y Eybalin, M. (1987): Coexistence of putative neuroactive substances in lateral olivocochlear neurons of rat and guinea pig. *Hearing Res.* 30, 135-146.
- Adams, J.C., Mroz, E.A. y Sewell, W.F. (1987): A possible neurotransmitter role for CGRP in a hair cell sensory organ. *Brain Res.* 419, 347-351.
- Ades, H.W y Engström, H. (1965): Form and innervation of the vestibular epithelia. In: *The Role of the Vestibular Organ in the Exploration of Space:23-40.* NASA Report No. SP-77.U.S. Naval School of Aviation Medicine. Pensacola.Fla.
- Ades, H.W. y Engstrom, H. (1974): Anatomy of the inner ear. In: *Handbook of Sensory Physiology.* Vol V/I (ed.) Keidel, W.D. and Neff, W.D. Springer Verlag. Berlin. 125-158.
- Altschuler, R.A. y Fex, J. (1986): Efferent neurotransmitters. In: *Neurobiology of Hearing: The Cochlea.* Altschuler, R.A., Hoffman, D.W. and Bobbin, R.P. (eds). Raven Press, New York. pp 383-396.
- Altschuler, R.A., Fex, J., Parakkal, M.H. y Eckstein, F. (1984 a): Colocalization of enkephalin like and choline acetyltransferase like immunoreactivities in olivocochlear neurons of the guinea pig. *J. Histochem. Cytochem.* 32, 839-843.
- Altschuler, R.A., Parakkal, M.H., Rubio, J.A., Hoffman, D.W. y Fex, J. (1984 b): Enkephalin like immunoreactivity in the guinea pig organ of Corti: ultrastructural and lesion studies. *Hearing Res.* 16, 17-31.
- Altschuler, R.A., Wenthold, R.J., Schwartz, A.M., Haser, W.G., Curthoys, N.P. y Parakkal, M.H. (1984): Immunocytochemical localization of glutaminase like immunoreactivity in the auditory nerve. *Brain Res.* 291, 173-178.
- Annoni, J., Cochran, S. y Precht, W. (1984): Pharmacology of the vestibular hair cell afferent fiber synapse in the frog. *J. of Neurosci.* 4, 2106-2116.
- Ascher, P. y Nowak, L. (1987): Electrophysiological studies of NMDA receptors. *10*, 284-288.
- Balcar, V.J. y Johnston, G.A.R. (1972): The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. *J. Neurochem.* 19, 2657-2666.

- Bledsoe, S.C. y Bobbin, R.P. (1982): Effects of D-alfa-aminoadipate on excitation of afferent fibers in the lateral line of Xenopus laevis. Neurosci. Lett. 32, 315-320.
- Bledsoe, S.C., Bobbin, R.P. y Chihal, D.M. (1981): Kainic acid: An evaluation of its action on cochlear potentials. Hearing Res. 4, 109-120.
- Bledsoe, S.C., Bobbin, R.P., Thalmann, R. y Thalmann, I. (1980): Stimulus induced release of endogenous amino acids from skins containing the lateral line organ in Xenopus laevis Exp. Brain Res. 40, 97-101.
- Bledsoe, S.C., Chihal, D.M., Bobbin, R.P. y Morgan, D.N. (1983): Comparative actions of glutamate and related substances on the lateral line of Xenopus laevis. Comp. Biochem Physiol. 75C, 199-206.
- Bledsoe, S.C., McLaren, J.D. y Meyer, J.R. (1986): Potassium induced, calcium dependent release of endogenous amino acids from the Xenopus lateral line. Assoc. Res. Otolaryngol. Abs. 9, 89-90.
- Bledsoe, S.C. Meyer, J.R. y Howland, M.M. (1985): Effects of excitatory amino acid receptor antagonists on synaptic excitation in the lateral line of Xenopus laevis. Assoc. Res. Otolaryngol. Abs. 8, 111.
- Bobbin, R.P. (1979): Glutamate and aspartate mimic the afferent transmitter in the cochlea. Exp. Brain Res. 34, 389-393.
- Bobbin, R.P., Bledsoe, S.C. y Jenison, G.L. (1984): Neurotransmitters of the cochlea and lateral line organ. In: Hearing Sciences: Recent Advances, Berlin, C.I. (ed.), College Hill Press, San Diego, CA. pp. 159-180.
- Bobbin, R.P., Bledsoe, S.C., Winbery, S., Ceasar, G. y Jenison, G.L. (1985 a): Comparative actions of GABA and acetylcholine on the Xenopus laevis lateral line. Comp. Biochem. Physiol. 80C, 313-318.
- Bobbin, R.P., Bledsoe, S.C., Winbery, S.L. y Jenison, G.L. (1985 b): Actions of putative neurotransmitters and other relevant compounds on Xenopus laevis lateral line. In: Auditory Biochemistry, Drescher, D.G. (ed.), Charles C. Thomas, Springfield, Illinois. pp. 102-121.
- Bobbin, R.P. y Morgan, D.N. (1980): Glutamate mimics the afferent transmitter in the Xenopus laevis lateral line. In: Birth Defects: Original Article Series, Vol. (XVI). Gorlin, R.J. (ed.), Alan R. Liss, New York for the March of Dimes Defects Foundation. pp. 107-109.

Bobbin, R.P. y Thompson, M.H. (1978): Effects of putative transmitters on afferent cochlear transmission. *Annals of Otol. Rhinol. Laryngol.* 87, 185-190.

Bracho, H. y Budelli, R. (1978): Generation of resting membrane potentials in an inner ear cell system. *J. Physiol.* 281, 445-465.

Comis, S.D. y Leng, G. (1979): Action of putative neurotransmitters in the guinea pig cochlea. *Exp. Brain Res.* 36, 119-128.

Cooper, J. R., Bloom, F.E. y Roth, R.H. (1984): *Las bases bioquímicas de la neurofarmacología*. 2a. Ed. Manual Moderno, Mexico.

Cotman, C. W., Foster, A. y Lanthorn, T. (1981): An overview of glutamate as a neurotransmitter. In: *Glutamate as a neurotransmitter*. DiChiara, G. y Gessa, G. L. (eds), Raven Press, New York, pp 1-27.

Davies, L. P. y Johnston, G. A. R. (1976): Uptake and release of D- and L-aspartate by rat brain slices. *J. Neurochem.* 26, 1007-1016.

Dechesne, C., Raymond, J. y Sans, A. (1984): Action of glutamate in the cat labyrinth. *Annals of Otol. Rhinol. & Laryngol.* 93, 163-165.

del Castillo, J. y Katz, B. (1954): Quantal components of the end plate potential. *J. Physiol.* 124, 560-573.

Drescher, D.G. y Drescher, M.J. (1985): HPLC analysis of presumptive neurotransmitters in perilymph. In: *Auditory Biochemistry*, Drescher, D.G. (ed.), Charles C. Thomas, Springfield, Illinois. pp. 50-67.

Drescher, D.G. y Drescher, M.J. (1987): Calcium and magnesium dependence of spontaneous and evoked afferent neural activity in the lateral line organ of *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A, 305-310.

Drescher, J.M, Drescher y Medina, J.E. (1983): Effect of sound stimulation at several levels on concentrations of primary amines, including neurotransmitter candidates, in perilymph of the guinea pig inner ear. *J. Neurochem.* 41, 309-320.

Ehrenberger, K., Benkoe, E. y Felix, D. (1982): Suppressive action of picrotoxin a GABA antagonist on labyrinthine spontaneous nystagmus and vertigo in man. *Acta otolaryngol.* 93, 269-273.

- Engström, H. y Engström, B. (1981): The structure of the vestibular sensory epithelium. En *Vestibular System: Function and morphology*. Ed.: Gualtierotti, T. Springer-Verlag, New York: 3-38.
- Eybalin, M., Abou-Madi, L., Rossier, J. y Pujol, R. (1985 a): Electron microscopic localization of N-terminal proenkephalin (syntenkephalin) immunostaining in the guinea pig organ of Corti. *Brain Res.* 358, 354-359.
- Eybalin, M., Cupo, A. y Pujol, R. (1983): Localisation ultrastructurale des immunoréactions a' un anticorps met-enkephaline dans l'organe de Corti. *C.R. Acad. Sci. (Paris) serie III*, 296, 1125-1128.
- Eybalin, M., Cupo, A. y Pujol, R. (1984): Met-enkephalin characterization in the cochlea: high performance liquid chromatography and immunoelectron microscopy. *Brain Res.* 305, 313-322.
- Eybalin, M., Cupo, A. y Pujol, R. (1985 b): Met-enkephalin-arg<sup>4</sup>-gly<sup>7</sup>-leu<sup>8</sup> in the organ of Corti: high performance liquid chromatography and immunoelectron microscopy. *Brain Res.* 331, 389-395.
- Eybalin, M., Parnaud, C., Geffard, M. y Pujol, R. (1988): Immunoelectron microscopy identifies several types of GABA-containing efferent synapses in the guinea-pig organ of Corti. *J. Neurocytol.* 24, 29-38.
- Eybalin, M. y Pujol, R. (1983): A radiographic study of [<sup>3</sup>H]-glutamate and [<sup>3</sup>H]-glutamine uptake in the guinea pig cochlea. *Neurosci.* 9, 863-871.
- Eybalin, M. y Pujol, R. (1984): Immunofluorescence with met-enkephalin and leu-enkephalin antibodies in the guinea pig cochlea. *Hearing Res.* 13, 135-140.
- Eybalin, M., Pujol, R. y Bockaert, J. (1987): Opioid receptors inhibit the adenylate cyclase in guinea pig cochleas. *Brain Res.* 421, 336-342.
- Favre, D. y Sans, A. (1979): Morphological changes in afferent vestibular hair cell synapses during the postnatal development of the cat. *J. Neurocytol.* 8, 765-775.
- Felix, D. y Ehrenberger, K. (1982): The action of putative neurotransmitter substances in the cat labyrinth. *Acta Otolaryngol.* 93, 101-105.
- Felix, D. y Ehrenberger, K. (1985): The action of putative neurotransmitter substances in the mammalian labyrinth. In: *Auditory Biochemistry*, Drescher, D.G. (ed.), Charles C. Thomas, Springfield, Illinois. pp. 68-79.

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

Fex, J. y Altschuler, R.A. (1985): Immunocytochemistry of the mammalian cochlea: results and expectations. Auditory Biochemistry, (ed.) Drescher, D.G., Charles C. Thomas, Springfield, Illinois. pp. 5-30.

Fex, J. y Altschuler, R.A. (1986): Neurotransmitter related immunocytochemistry of the organ of Corti. Hearing Res. 22, 249-263.

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

Fex, J., Altschuler, A., Wenthold, J. y Parakkal, M. H. (1982): Aspartate aminotransferase immunoreactivity in cochlea of guinea pig. Hearing Res. 7, 149-160.

Fex, J., Kachar, B., Rubio, J.A., Parakkal, M.H. y Altschuler, R.A. (1985): Glutaminase like immunoreactivity in the organ of Corti of guinea pig. Hearing Res. 17, 101-113

Fex, J. y Wenthold, J. (1976): Cholin acetyltransferase, glutamate decarboxylase and tyroxine hydroxylase in the cochlea and cochlear nucleus of the guinea pig. Brain Res. 109, 575-585.

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

Flock, A. y Russell, I. (1973): Efferent nerve fibers: postsynaptic action on hair cells. Nature 243, 89-91.

Foster, A.C. y Fagg, G.E. (1984): Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptor. Brain Res. Rev. 7, 103-164.

Freeman, A. (1976): Studies of an excitatory neurotransmitter: synaptic and nonsynaptic interactions of L-glutamic acid. En: Electrobiolgy of nerve, synapse and muscle. Eds.: Rueben, J., Purpura, D. y Bennett, M.V.L. Raven Press, New York. 61-90.

- Furukawa, T., Hayashida, Y. y Matsuura, S. (1978): Quantal analysis of the size of excitatory post synaptic potentials at synapses between hair cells and afferent nerve fibres in goldfish. *J. Physiol.* 276, 211-226.
- Furukawa, T., Ishii, Y. y Matsuura, S. (1972): Synaptic delay and time course of postsynaptic potentials at the junction between hair cells and eighth nerve fibers in the goldfish. *Jap. J. Physiol.* 22, 617-635.
- Furukawa, T., Kuno, M. y Matsuura, S. (1982): Quantal analysis of a decremental response at hair cell afferent fibre synapses in the goldfish sacculus. *J. Physiol.* 322, 181-195.
- Gulley, R.L. y Bagger-Sjoberg, D. (1979): Freeze-fracture studies on the synapses between the type I hair cell and the calyceal terminals in the guinea pig vestibular system. *J. Neurocytol.* 8, 591-603.
- Gulley, R.L., Fex, J. y Wenthold, R.J. (1979): Uptake of putative neurotransmitters in the organ of Corti. *Acta Otolaringol.* 88, 177-182.
- Gulley, R.L. y Reese, T.S. (1977): Freeze fracture studies on the synapses in the organ of Corti. *J. Comp. Neurol.* 171, 517-544.
- Guth, P.S. y Melamed, B. (1982): Neurotransmission in the auditory system: a primer for pharmacologists. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22, 383-412.
- Guth, P.S., Norris, C. H. y Sewell, W.F. (1985): Primary afferent transmission in acousticolateralis organs. In: *Auditory Biochemistry*, Drescher, D.G. (ed.), Charles C. Thomas, Springfield, Illinois. pp. 42-49.
- Guth, S.L. y Norris, C.H. (1984): Pharmacology of the isolated semicircular canal: effect of GABA and picrotoxin. *Exp. Brain Res.* 56, 72-78.
- Hama, K. (1980): Fine structure of the afferent synapse and gap junctions on the sensory hair cell in the saccular macula of goldfish: a freeze fracture study. *J. Neurocytol.* 9, 845-860.
- Hamilton, D. (1968): The calyceal synapse of type I vestibular hair cells. *J. Ultrastructure Res.* 23, 98-114.
- Harris, E. W., Stevens, D. R. y Cotman, C. W. (1987): Hippocampal cells primed with quisqualate are depolarized by AP4 and AP6, ligands for a putative glutamate uptake site. *Brain res.* 418, 361-365.



Hoffman, D.W. (1986): Opioid mechanisms in the inner ear. In: Neurobiology of hearing: the cochlea. Altschuler, R.A., Hoffman, D.W. y Bobbin, R.P. (eds.), Raven Press, New York. 371-382

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

Hoffman, D.W., Rubio, J.A., Altschuler, R.A. y Fex, J. (1984): Several distinct receptor binding enkephalins in olivocochlear fibers and terminals in the organ of Corti. Brain Res. 322, 59-65.

Hoffman, D.W., Zamir, N., Rubio, J.A., Altschuler, R.A. y Fex, J. (1985): Proenkephalin and prodynorphin related neuropeptides in the cochlea. Hearing Res. 17, 47-50.

Jenison, G.L. y Bobbin, R.P. (1985): Quisqualate excites spiral ganglion neurons of the guinea pig. Hearing Res. 20, 261-265.

Jenison, G.L. y Bobbin, R.P. y Thalmann, R. (1985): Potassium induced release of endogenous amino acids in the guinea pig cochlea. J. Neurochem. 44, 1845-1853.

Jenison, G.L., Winbery, S. y Bobbin, R.P. (1986): Comparative actions of quisqualate and N-methyl-D-aspartate, excitatory amino acid agonists, on guinea pig cochlear potentials. Comp. Biochem. Physiol. 84C, 385-389.

Klinke, R. (1986): Neurotransmission in the inner ear. Hearing Res. 22, 235-243.

Klinke, R. y Evans, E.F. (1977): Evidence that catecholamines are not the afferent transmitter in the cochea. Exp. Brain Res. 28,315-324.

Klinke, R. y Oertel, W. (1975): Transmitter physiology of cochlear synapses. Exp. Brain Res. Suppl. 23, 150.

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

López-Colomé, A.M. y Roberts, P.J. (1987): Effect of excitatory amino acid analogues on the release of D-[<sup>3</sup>H]aspartate from chick retina. European J. Pharmacol. 142, 409-417.

Lowenstein, O. y Roberts, T.D.M. (1949): The equilibrium function of the otolith organs of the Thornback ray (*Raja clavata*). *J. Physiol* (London) 110, 392-415.

MacDermott, A.B. y Dale, N. (1987): Receptors, ion channels and synaptic potentials underlying the integrative actions of excitatory amino acids. *Trends in Neurosci.* 10, 280-284.

Mayer, M.L. y Westbrook, G.L. (1987): The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. in Neurobiol.* 28, 197-276.

Mayer, M.L., Westbrook, G.L. y Guthrie, P.B. (1984): Voltage dependent block by  $Mg^{2+}$  of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309, 261-263.

McGeer, P.L., McGeer, E.G. y Hattori, T. (1978): Kainic acid as a tool in neurobiology. In: Kainic acid as a tool in neurobiology. McGeer, E.G., Olney, J.W. y McGeer, P.L. (eds.) Raven Press, New York. pp. 123-137.

McLennan, H. (1987): Setting the scene: the excitatory amino acids - 30 years on. *Excitatory amino acid transmission*. Hicks, T. P., Lodge, D. y McLennan, H. (Eds.): Alan R. Liss, New York, pp 1-18.

Melamed, B., Norris, C., Bryant, G. y Guth, P. (1982): Amino acid content of guinea pig perilymph collected under conditions of quiet or sound stimulation. *Hearing Res.* 7, 13-18.

Meza, G. (1984): Some characteristics of glutamic acid decarboxylase of chick ampullary cristae. *J. of Neurochem.* 43, 634-639.

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, Illinois. pp. 80-101.

Meza, G., Carabez, A. y Ruiz, M. (1982): GABA synthesis in isolated vestibular tissue of chick inner ear. *Brain Res.* 241, 157-161.

Meza, G., González Viveros, M.T. y Ruiz, M. (1985): Specific [ $^3H$ ]gamma aminobutyric acid binding to vestibular membranes of the chick inner ear. *Brain Res.* 337, 179-183.

Meza, G., Hernández, C. y Ruiz, M. (1981):  $^3H$ -GABA uptake in isolated vestibular cristae of chick inner ear. *Soc. Neurosci. abs.* 7, 147.

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

Nadol, J.B., Mulroy, M.J., Goodenough, D.A. y Weiss, T.F. (1976): Tight and gap junctions in a vertebrate inner ear. *Am. J. Anatomy* 147, 281-302.

Nagai, T., Obara, S. y Kawai, N. (1984): Differential blocking effects of a spider toxin on synaptic and glutamate responses in the afferent synapse of the acustico-lateralis receptors of Plotosus. *Brain Res.* 300, 183-187.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. y Prochiantz, A. (1984): Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462-465.

Nowak, R., Dorn, A., Bernstein, H.G., Rinne, A., Scholtz, H.J. y Ziegler, M. (1986 a): Immunocytochemical detection of peptides in the guinea pig cochlea. *Arch. Otorhinolaryngol.* 243, 36-38.

Nowak, R., Dorn, A., Bernstein, H.G., Rinne, A., Ziegler, M. y Scholtz, H.J. (1986 b): Neuropeptides in macula utriculi and macula sacculi of guinea pig labyrinth an immunohistochemical study. *Acta Histochem.* 78, 219-221.

Onodera, K. y Takeuchi, A. (1977): Inhibitory effect of streptomycin and related antibiotics on the glutamate receptor of the crayfish neuro-muscular junction. *Neuropharmacol.* 16, 171-177.

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

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

Rossi, M.L., Prigioni, I., Valli, P. y Casella, C. (1980): Activation of the efferent system in the isolated frog labyrinth: effects on the afferent epsps and spike discharge recorded from single fibres of the posterior nerve. *Brain Res.* 185, 125-137.

Rossi, M.L., Valli, P. y Casella, C. (1977): Post-synaptic potentials recorded from efferent nerve fibres of the posterior semicircular canal of the frog. *Brain Res.* 135, 67-75.

- Ryan, A.F. y Schwartz, I.R. (1984): Preferential glutamine uptake by cochlear hair cells: implications for the afferent cochlear transmitter. *Brain Res.* 290, 376-379.
- Ryan, A.F. y Schwartz, I.R. (1986): Nippecotic acid: preferential accumulation in the cochlea by GABA uptake systems and selective retrograde transport to brainstem. *Brain Res.* 399, 399-403.
- Rybak, L.P. (1986): Drug ototoxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26, 79-99.
- Sand, O., Ozawa, S. y Hagiwara, S. (1975): Electrical and mechanical stimulation of hair cells in the mudpuppy. *J. Comp. Physiol. A* 102, 13-26.
- Santos Sacchi, J. (1984): A re-evaluation of cell coupling in the organ of Corti. *Hearing Res.* 14, 203-204.
- Santos Sacchi, J. y Dallos, P. (1983): Intercellular communication in the supporting cells of the organ of Corti. *Hearing Res.* 9, 317-326.
- Schessel, D.A. y Highstein, S.M. (1981): Is transmission between the vestibular type I hair cell and its primary afferent chemical?. *Ann. New York Acad. Sci.* 374, 210-214.
- Schwartz, I.R. y Ryan, A.F. (1983): Differential labeling of sensory cells and neural populations in the organ of Corti following aminoacid incubations. *Hearing Res.* 9, 185-200.
- Sewell, W.F. y Mroz, E.A. (1987): Neuroactive substances in inner ear extracts. *J. Neuroscience* 7, 2465-2475.
- Sewell, W.F., Norris, C.H. y Guth, P.S. (1978): Detection of an auditory nerve activating substance. *Science* 202, 910-912.
- Siegel, J.H. y Relkin, E.M. (1987): Antagonistic effects of perilymphatic calcium and magnesium on the activity of single cochlear afferent neurons. *Hearing Res.* 290, 376-379.
- Slaughter, M.M. y Miller, R.F. (1985): Identification of a distinct synaptic glutamate receptor on horizontal cell in mudpuppy retina. *Nature* 314, 96-97.
- Smith, C.A. y Sjöstrand, F.S. (1961): A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea. *J. Ultrastruct. Res.* 5, 184-192.
- Soto, E. y Vega, R. (1987): A Turbo Pascal program for on-line spike data acquisition and analysis using a standard serial port. *J. Neurosci. Meth.* 19, 61-68.

Soto, E., Budelli, R., González Estrada, M.T. y Bracho, H. (1984): Is the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase symmetrically distributed in the neuroepithelium of the vestibular system in the axolotl (Ambystoma mexicanum)?. Hearing Res. 16, 201-203.

Steinbach, A. B. y Bennet, M. V. L. (1971): effects of divalent ions and drugs on synaptic transmission in phasic electroreceptor in a mormyrid fish. J. Gen. Physiol. 58, 580-598.

Stone, T.W. y Perkins, M.N. (1983): Quisqualic acid excitation of cortical neurones is selectively antagonized by streptomycin. Brain Res. 260, 347-349.

Tachibana, M. y Kuriyama, K. (1974): Gamma-aminobutyric acid in the lower auditory pathway of the guinea pig. Brain Res. 69, 370-374.

Thompson, G.C., Cortez, A.M. y Igarashi, M. (1986): GABA like immunoreactivity in the squirrel monkey organ of corti. Brain Res. 372, 72-79.

Usami, S., Igarashi, M. y Thompson, G.C. (1987 a): GABA like immunoreactivity in the chick vestibular end organs. Brain Res. 418, 383-387.

Usami, S., Igarashi, M. y Thompson, G.C. (1987 b): GABA like immunoreactivity in the chick basilar papilla and the lagenar macula. Hearing Res. 30, 19-22.

Valli, P., Zucca, G., Prigioni, I., Botta, L. Casella, C. y Guth, P.S. (1984): The effect of glutamate on the frog semicircular canal. Brain Res. 330, 1-9.

Vega, R., Soto, E., Budelli, R. y González-Estrada, M.T. (1987): Is GABA an afferent transmitter in the vestibular system?. Hearing Res. 29, 269-275.

Watkins, J.C. (1984): Excitatory amino acids and central synaptic transmission. Trends. Pharmacol. Sci. 5, 373-376.

Watkins, J.C. y Evans, R.H. (1981): Excitatory amino acid transmitters. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21, 165-204.

Watkins, J.C. y Olverman, H.J. (1987): Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. Trends in Neurosci. 10, 265-272.

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

Wersall, J. (1956): Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullaris in the guinea pig. A light and electron microscopic investigation. Acta otolaryngol. Suppl. 126, 1-85.

Wersall, J y Bagger-Sjöback, D. (1974): Morphology of the vestibular sense organ. In: Handbook of Sensory Physiology. (ed.) Kornhuber, H.H. New York Springer-Verlag, 1974. 6, 123-170.

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

Williams, S. E., Zenner, H. P. y Schacht, J. (1987): Three molecular steps of aminoglycoside ototoxicity demonstrated in outer hair cells. Hearing Res. 30, 11-18.

Ylikoski, J., Päivarinta, H., Eränkö, L. Mrena, I. y Lehtosalo, J. (1984): Is substance P the neurotransmitter in the vestibular end organs?. Acta Otolaryngol. 97, 523-528.

Yu-Wen, S., Yi-Xiong, Z. y Dan-Ping, D. (1986): Effects of L-aspartate and oxaloacetic acid on click-evoked cochlear potentials. Hearing Res. 21, 83-86.

Zahm, D.S. (1980): Gap junctions between sensory and supporting cells of the utricular and saccular maculae in Anolis carolinensis examined by transmission electron microscopy. Am. J. Anatomy 158, 263-273.

HRR 00950

## Is GABA an afferent transmitter in the vestibular system?

Rosario Vega, Enrique Soto, Ruben Budelli and Ma. Teresa González-Estrada

*Departamento de Ciencias Fisiológicas, Instituto de Ciencias, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla Pue, México*

(Received 19 May 1986; accepted 25 March 1987)

This study was undertaken to determine the possible role of GABA as an afferent transmitter in the vestibular system of the axolotl. We studied the effects of GABA, muscimol, bicuculline and picrotoxin on the spontaneous spike discharge of the afferent fibers of the sacculi lagena and anterior semicircular canal. It was found that GABA and muscimol produce a very weak excitatory effect which does not mimic either the temporal course or the amplitude of the response of vestibular afferents to physiological stimuli. The GABA antagonist bicuculline has no significant effect on these fibers, and picrotoxin partially blocks the spontaneous activity in 33% of the fibers studied. These results indicate that GABA is probably not an afferent transmitter in the vestibular system as has previously been proposed.

**GABA; Muscimol; Bicuculline; Picrotoxin; Hair cell; Vestibular system**

Since the original proposal of Flock and Lam (1974), that GABA might be the afferent transmitter in hair cell sense organs, several papers have supported this hypothesis. It has been found that GABA has an excitatory effect on the vestibular fibers in the cat (Felix and Ehrenberger, 1982), and that picrotoxin inhibits vertigo in man (Ehrenberger et al., 1982). It has also been shown that glutamic acid decarboxylase (GAD) and specific GABA-binding sites exist in the vestibular system of the chick (Meza et al., 1982, 1985; Meza, 1984).

In contrast, it has been reported that GABA has no effects on the cochlear afferent fibers of the cat (Klinke and Oertel, 1977), nor in the semicircular canals of the frog (Annoni et al., 1984; Guth and Norris, 1984). Finally GABA has been described to exert an inhibitory effect on the lateral line of *Xenopus laevis* (Bobbin et al., 1985a).

In an attempt to elucidate these controversial results, we have studied the effect of GABA, and some of its agonists and antagonists, on the spontaneous discharge of vestibular afferents of the

axolotl (*Ambystoma mexicanum*). To determine if there are several pharmacologically different classes of primary afferents (Ryan and Schwartz, 1983), as has been postulated for the efferent fibers (Schwartz and Ryan, 1983), we studied the effect of the above listed drugs on fibers of different origin: sacculi, lagena and semicircular canal.

Experiments were performed in wild Axolotls weighing from 25 to 30 g. The animals were decapitated and the otic capsule reached through the cartilaginous palate. The fibers from the inner ear were cut proximally to the brain, and their anterior and posterior bundles carefully detached. Once the origin of the fibers was identified the bundle selected for recording was held in a steel tweezer which operates as an active electrode. The bundle was further dissected until a record in which a single unit discharge was clearly distinguishable from the background noise (signal-to-noise ratio greater than 2).

Extracellular electrical activity of afferent fibers was recorded by means of an AC amplifier, the output of which was connected to an oscilloscope, a window discriminator and a tape recorder for standard off-line processing the afferent activity as frequency histograms (Glaser and Ruchkin, 1976). The whole preparation was mounted on a

Correspondence to: R. Vega, Departamento de Ciencias Fisiológicas, ICUAP, Apartado Postal no. 406, Puebla Pue, México.

manual tilting table in order to study the vestibular afferents response to tilts (Budelli and Macadar, 1979) (Fig. 1). Tilts of  $45^\circ$  were done in less than 1 s and the table maintained in the new position for more than 1 min.

The results presented here correspond to fibers recorded for no more than 5 h, during which time the basal discharge of the fibers remains stable (in fact, we were able to follow the activity of a fiber for as long as 15 h). Usually we studied the effect of one drug on a fiber more than once.

The preparation was perfused with axolotl Ringer (115 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$  and 5 mM HEPES, pH 7.4; Bracho and Budelli 1978). Drugs in pH adjusted Ringer's solution were bath applied dropping them from a pipet in the vicinity of the fiber's origin. Ringer's solution was removed during recording leaving just the cartilaginous otic capsule as the bath, so the volume of the drug applied suffices to com-

pletely change the Ringer in contact with the synaptic area. Time was allowed between drug applications for a complete washing of the drugs; normally no change was detected in the response after subsequent application of the same drug. GABA  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  and  $10^{-3}$  M; muscimol  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  M; bicuculline methiodide  $10^{-8}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  M and picrotoxin  $10^{-8}$  and  $10^{-4}$  M (all from Sigma Chemical Co.) were applied. Effects on basal spike discharge, were considered significant when there was at least a 20% change of the basal discharge frequency.

Effects of GABA superfusion were studied in 42 experiments (in 8 units more than one concentration was tried), in concentrations ranging from  $10^{-2}$  to  $10^{-4}$  M (lower doses of GABA did not produce detectable changes in all the fibers studied). It was found that GABA is unable to evoke any effect in the majority (about 70%) of the fibers studied (Fig. 2 and table 1). In two

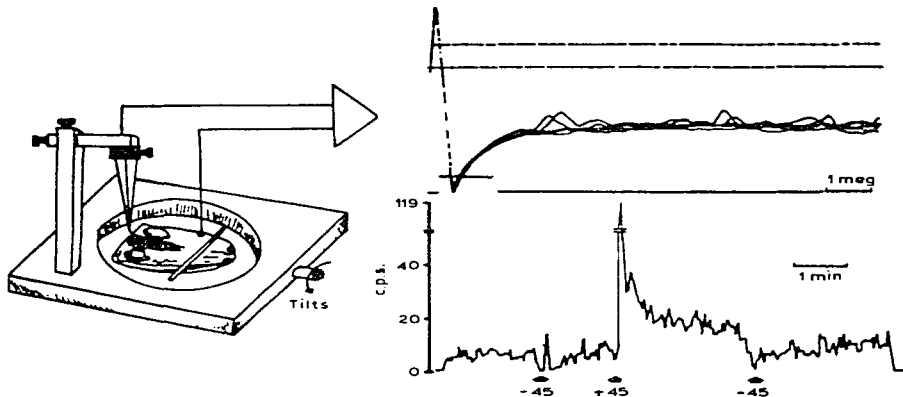


Fig. 1. Stimulation and recording technique. The head of the animal was held in a tilting table (ventral side up). Tilts were around the sagittal axis. Recording was made between a forceps to which a bundle of fibers was attached and an indifferent electrode. (Top right) Recording of an action potential and its detection (above window) by a double-threshold window discriminator. (Bottom right) Bin-rate histogram of a fiber from anterior semicircular canal and its response to tilts. Arrows indicate the transition from one position to another ( $90^\circ$  transition from  $+45^\circ$  to  $-45^\circ$ ).



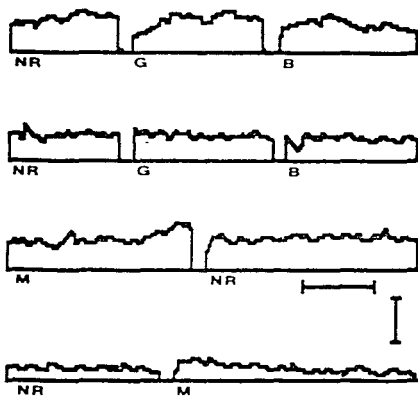


Fig. 2. Frequency histograms of two different fibers. Each row shows the application of various drugs to the same fiber. Interruptions between each drug application are due to processing disconnection. The upper histogram of a fiber from the sacculi shows the effects of consecutive application of normal Ringer (NR), GABA,  $10^{-2}$  M (G), and bicuculline,  $10^{-2}$  M (B). (Second row) Effect of the same manipulations in a fiber from the semicircular canal. (Third row) A fiber from the sacculi is subjected to the application of muscimol,  $10^{-3}$  M (M) and then (NR) as control. (Fourth row) Fiber from the semicircular canal; basal discharge after Ringer application and response to muscimol,  $10^{-4}$  M. Calibration bars are 1 min and 10 c.p.s.

occasions it produced an excitatory effect of up to a five-fold increase in basal frequency (Fig. 3), but generally not more than a 30–50% increase in basal frequency was observed. It seems worth while to note that some cells do not change their firing frequency in the presence of GABA, even if they show a change in their discharge pattern. This is particularly notorious in the more irregular cells, in which GABA induces them to discharge in trains separated by silent periods (Fig. 3). No significant differences were found between the response of fibers from different origins.

TABLE 1

RESPONSES OF VESTIBULAR AFFERENTS TO APPLICATION OF GABA, ITS AGONISTS AND ANTAGONISTS

Fibers from sacculi and lagena have been grouped together +, frequency increase; =, no change; -, decrease of basal discharge. In some fibers more than one concentration of the same drug was applied.

Firing frequency:	Canal			Sacculi-lagena		
	+	=	-	+	=	-
GABA $10^{-2}$	6	17	2	4	7	0
GABA $10^{-4}$	0	4	0	3	7	0
Muscimol $10^{-3-6}$	1	6	0	1	6	0
Muscimol $10^{-4}$	0	2	0	1	4	0
Bicuculline $10^{-3-4}$	0	6	0	1	10	1
Picrotoxin $10^{-3-4}$	1	9	5	0	4	2

Muscimol application was studied in 21 experiments (16 fibers), in concentrations ranging from  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  and  $10^{-6}$  M. The cells were practically unresponsive to muscimol (see Table 1). This drug produced an excitatory effect in only two fibers at the maximal dose tried (Fig. 2).

Bicuculline methiodide application in concentrations of  $10^{-2}$  and  $10^{-4}$  M was studied in 18



Fig. 3. Frequency histograms of three fibers from the lateral semicircular canal. Upper record shows the effect of GABA,  $10^{-2}$  M, as compared with Ringer application. The discharge pattern of this cell changes under the influence of GABA, in taking the form of spike trains separated by silent periods of 2–3 s. (Second row) GABA,  $10^{-2}$  M, application produces a five-fold increase in the frequency of discharge of this fiber. (Bottom row) The effect of Kainic acid,  $10^{-3}$  M (K), application. For this case the amplitude has been divided by four in order to arrange the figure, so vertical calibration for third row represents 40 c.p.s.

fibers from different origins. It had some effect in only one fiber at  $10^{-2}$  M (Fig. 2 and Table I).

Picrotoxin in concentrations of  $10^{-3}$  and  $10^{-4}$  M was applied to 21 preparations. It produced a decrement in the afferent discharge in 33% of the fibers, and no effect in the remaining, whatever their origin and response to tilts.

Our experimental results do not give further support to the hypothesis of GABA being an afferent transmitter in hair cell sensory systems. However, GABA and muscimol (at high concentrations) may have an excitatory effect on afferent activity. This effect is very weak when compared with the one produced by excitatory amino acids (Bobbin, 1979; Comis and Leng, 1979; Annoni et al., 1984; Dechesne et al., 1984; Bobbin et al., 1985b; Soto and Vega, 1986), and it does not reproduce neither the amplitude nor the time course of the response to mechanical stimuli (Fig. 3). Additionally GABA antagonists bicuculline and picrotoxin, do not show the expected inhibitory effects, picrotoxin being active only at high concentrations. These negative results contrast with the effect of excitatory amino acid agonists and antagonists which produce a notorious modification in the frequency of discharge of these fibers (Fig. 3, bottom).

These results lead us to speculate that GABA may probably have a modulatory role in afferent transmission in hair cell systems, a suggestion supported by the observed modification in the pattern of discharge of some afferent fibers in the presence of GABA. Since our results do not fully substantiate this hypothesis, further analysis is being done in our laboratory in order to test it.

The possibility of a non-uniform afferent vestibular system innervation is not supported by our results. Instead, they point towards homogeneous pharmacological properties of the vestibular primary afferents, regardless of their origin and response characteristics.

#### Acknowledgements

We are grateful to Dr. Bjorn Holmgren and Javier Birwe for their critical reading of the manuscript, to Gertrudis Payás for her editorial advice and to Dr. E. Salinas for the preparation of figures. This research was partially supported by

PRONAES 84-01-0196 grant from the Secretaría de Educación Pública (SEP), México; CECyT 1985 grant from Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Puebla, México; and CONACYT PCEXCNA 40571 grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

#### References

- Annoni, J.M., Cochran, S.L. and Precht, W. (1984) Pharmacology of the vestibular hair cell afferent fiber synapse in the frog. *J. Neurosci.* 4, 2106-2116.
- Bobbin, R.P. (1979) Glutamate and aspartate mimic the afferent transmitter in the cochlea. *Exp. Brain Res.* 34, 389-393.
- Bobbin, R.P., Bledsoe Jr., S.C., Winbery, S., Ceasar, G. and Jenison, G.L. (1985a) Comparative actions of GABA and acetylcholine on the *Xenopus laevis* lateral line. *Comp. Biochem. Physiol.* 80C, 313-318.
- Bobbin, R., Bledsoe, S.C., Winberry, S.L. and Jenison, G.L. (1985b) Actions of putative neurotransmitters and other compounds on *Xenopus laevis* lateral line. In: *Auditory Biochemistry*, pp. 102-122. Editor: D.G. Drescher. Charles C. Thomas, Springfield, IL.
- Brachco, H. and Budelli, R. (1978) The generation of resting membrane potentials in an inner ear hair cell system. *J. Physiol.* 281, 445-465.
- Budelli, R. and Macadar, O. (1979) Statacoustic properties of utricular afferents. *J. Neurophysiol.* 42, 1479-1493.
- Comis, S.D. and Leng, G. (1979) Action of putative neurotransmitters in the guinea pig cochlea. *Exp. Brain Res.* 36, 119-128.
- Dechesne, C., Raymond, J. and Sans, A. (1984) Action of glutamate in the cat labyrinth. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 93, 163-165.
- Ehrenberger, K., Benkoe, E. and Felix, D. (1982) Suppressive action of picrotoxin, a GABA antagonist, on labyrinthine spontaneous nystagmus and vertigo in man. *Acta Oto-Laryngol.* 93, 269-273.
- Felix, D. and Ehrenberger, K. (1982) The action of putative neurotransmitter substances in the cat labyrinth. *Acta Oto-Laryngol.* 93, 101-105.
- Flock, A. and Lam, D.M.K. (1974) Neurotransmitter synthesis in inner ear and lateral line sense organs. *Nature* 249, 142-144.
- Glaser, E.M. and Ruckkin, D.S. (1976) Principles of neurobiological signal analysis. Academic Press, London.
- Guth, S.L. and Norris, C.H. (1984) Pharmacology of the isolated semicircular canal; Effect of GABA and picrotoxin. *Exp. Brain Res.* 56, 72-78.
- Klinke, R. and Oertel, W. (1977) Evidence that GABA is not the afferent transmitter in the cochlea. *Exp. Brain Res.* 28, 311-314.
- Meza, G. (1984) Some characteristics of glutamic acid decarboxylase of chick ampullary cristae. *J. Neurochem.* 43, 634-639.
- Meza, G., Carabez, A. and Ruiz, M. (1982) GABA synthesis in isolated vestibular tissue of chick inner ear. *Brain Res.* 241, 157-161.

Meza, G., González-Viveros, M.T. and Ruiz, M. (1985) Specific [ $^3\text{H}$ ]-aminobutyric acid binding to vestibular membranes of the chick inner ear. *Brain Res.* 337, 179-183.

Ryan, A.F. and Schwartz, R.I. (1983) Preferential amino acid uptake identifies Type II spiral ganglion neurons in the gerbil. *Hear. Res.* 9, 173-184.

Schwartz, I.R. and Ryan, A. (1983) Differential labeling of sensory cell and neural populations in the organ of Corti following amino acid incubations. *Hear. Res.* 9, 185-200.

Soto, E. and Vega, R. (1986) Amino acidic neurotransmitters effects on primary afferents of the vestibular system. *Assoc. Res. Otolaryngol. Abstr.* 9, 56.

**Actions of excitatory amino acid agonists and antagonists on  
the primary afferents of the vestibular system of the  
Axolotl (*Ambystoma mexicanum*).**

**Enrique Soto<sup>1</sup> and Rosario Vega-**

*Departamento de Ciencias Fisiológicas, ICUAP,  
Universidad Autónoma de Puebla., Puebla, Pue.  
México.*

---

<sup>1</sup> Offprint requests to: E. Soto, Depto. de Ciencias Fisiológicas, ICUAP, Universidad Autónoma de Puebla, Apartado Postal 406, Puebla, Pue, México-

In order to determine the nature of the transmitter in the synapse between hair cells and primary afferent fibers, both resting and evoked spike activity of vestibular system afferents were recorded. Excitatory amino acid agonists and antagonists were applied by micro perfusion. Excitatory amino acid agonists consistently increased the firing rate of these afferents. The rank order in potencies of the agonists tested was: kainate  $\approx$  quisqualate  $>$  D-aspartate  $\approx$  L-glutamate  $\approx$  L-aspartate  $>$  N-methyl D-aspartate. Blockade of synaptic transmission with high  $Mg^{2+}$  and low  $Ca^{2+}$  solutions did not seem to affect the responses to the excitatory amino acid agonists indicating their postsynaptic action. Excitatory amino acid antagonists inhibit both resting and physiologically evoked activity. The rank order of inhibitory potency was: kynurenate  $>$  L-glutamate diethyl ester  $>$  DL-2-amino-4-phosphono-butyrates  $>$  D-alpha amino adipate  $>$  DL-2-amino-5-phosphonovalerate.

These findings suggest that an amino acid related compound may be the transmitter at this synapse. The relative potencies of agonists and antagonists tested provide evidence that the

1948

...

...

**RESUMEN.**

En este trabajo se pretende determinar cuales sustancias cumplen con los criterios fisiológicos que permitan proponerlas como transmisores en la sinapsis aferente del sistema vestibular. Para ello se ha usado el registro de la actividad de las aferentes primarias del sistema vestibular del axolotl (Ambystoma mexicanum), como un indice del efecto de diversas drogas agonistas y antagonistas de los transmisores putativos.

Se ha estudiado el efecto del GABA, sus agonistas y antagonistas (muscimol, bicuculina, picrotoxina), encontrando que los agonistas tienen efectos que no remedan la respuesta fisiológica del sistema, en tanto los antagonistas producen un efecto inhibitor muy debil. Estos resultados no confirman el posible papel del GABA como transmisor en esta sinapsis.

Estudiando el efecto del glutamato, del aspartato y de aminoácidos excitatorios (AAE) relacionados, se ha encontrado que estas sustancias producen un efecto excitador potente sobre las aferentes vestibulares, en tanto que sus antagonistas inhiben la actividad basal y la respuesta ante estimulación mecánica de estas fibras. El efecto excitador de los agonistas de los AAE persiste aún

cuando se perfunde con soluciones con alto  $Mg^{++}$  y bajo  $Ca^{++}$ , indicando que su acción es postsináptica.

El estudio de las potencias relativas de los agonistas y antagonistas de los AAE ha mostrado que el ácido kainico y el quisquálico tienen una gran potencia excitadora, siguiendo en potencia el D-aspártico, L-Glutámico, el D-glutámico, L-aspártico y por último el N-metil D-aspártico. Utilizando antagonistas de los aminoácidos excitadores se ha encontrado que el ácido kynurénico es el más potente inhibidor tanto en la descarga basal como en la evocada por estímulos fisiológicos, siguiendo el L-glutamato dietil éster, el DL-2-amino-4-fosfono-butírico, D-alfa amino adipico y el DL-2-amino-5 fosfono-valérico.

Estos resultados sugieren que un aminoácido excitador es el transmisor en la sinapsis aferente del sistema vestibular y que los receptores involucrados son de tipo Kainico-Quisquálico.



transmitter released from the hair cells' basal pole in the axolotl vestibular system interacts with postsynaptic Kainic / Quisqualic type receptors.

*Key words: vestibular system, hair cell, afferent synapse, excitatory amino acid receptors.*

## INTRODUCTION

The inner ear of amphibians constitutes an excellent model to test putative transmitters in hair cell systems. These animals lack type I hair cells which may have non classical chemical synapses <sup>13, 31, 14</sup>. In contrast, type II hair cell afferent synapses appear to be chemically-transmitting as judged by both morphological <sup>20</sup> and physiological features <sup>12, 21, 1</sup>.

While the electrophysiological evidence for chemically mediated transmission at type II hair cell synapses is convincing, the identity of the afferent neurotransmitter has not been established. Several substances have been implicated as possible transmitters in this synapse <sup>13, 4, 20, 17</sup>, but an excitatory amino acid (EAA) has remained as the most plausible putative transmitter. Glutamate has been found to produce an excitatory effect on the afferent fibers of the cochlea in guinea pig <sup>5, 7</sup>, in the frog and cat labyrinth <sup>1, 7, 27</sup> and in the afferents of the lateral line of *Xenopus laevis* <sup>3</sup>. Glutamate seems to be released from hair cells under stimulation with high potassium <sup>16</sup>, and under *physiological* stimulation <sup>4</sup>. Also, glutamine is actively taken up by hair cells of the cochlea <sup>11, 22</sup>. These results are coherent with the idea that glutamate, or a related substance, may be a possible transmitter in hair cell systems. Nonetheless, some controversy remains

concerning the nature of the transmitter <sup>17</sup>, the kind of receptors involved in the response to glutamate and the site of action of glutamate <sup>27</sup>.

To determine the type and localization of the receptor(s) which mediate(s) the EAA effects, we have investigated the activity of some EAA and their antagonists on the afferent fibers from the vestibular system of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Preliminary findings have been reported in abstract form <sup>24, 25</sup>.

#### MATERIAL AND METHODS

Experiments were performed in wild larval axolotls (*Ambystoma mexicanum*), weighing 25 - 30 g, unselected with regard to sex. Resting and evoked activity of primary afferents innervating the sacculus, lagena and semicircular canals were recorded. After decapitation of the axolotl, the otic capsule was identified through the palate and opened ventrally. The nerve fibers from labyrinthine organs were carefully identified and dissected. The head was then fixed in a recording chamber. The surgical procedure generally took 20 - 30 min, time during which the preparation was continually washed with normal amphibians' Ringer solution (composition: NaCl, 111 mM; KCl, 2.5 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1.8 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1 mM; glucose, 10 mM; HEPES, 5 mM; pH adjusted to 7.4). During the experiment the preparation was perfused

with normal Ringer at a rate of about 1.5 - 2.0 ml / min, at room temperature. The volume of the chamber was about 2.0 ml and solutions were changed by gravity flow.

Activity of afferent fibers was recorded with glass microelectrodes, filled with KCL 3 M and with a resistance between 30 - 50 M $\Omega$ . The electrodes were connected to a conventional intracellular DC amplifier, an oscilloscope and a window discriminator. Sometimes magnetic tape and pen recorders were also used. The output of the window discriminator was led to a microcomputer for on-line data acquisition and analysis <sup>22</sup>.

In some experiments, an extracellular multiunit recording technique was used. This technique allowed the preparation to be stimulated without losing the fiber being recorded. Details of this procedure have been described previously <sup>22</sup>. The preparation was mounted on a tilting table and mechanically stimulated. Using this technique we tested if antagonists may block the physiologically evoked activity of afferent fibers.

Frequency histograms were obtained from all fibers and interval histograms in some of them. To ascertain that a drug had an effect, Mann Whitney's U test was performed, comparing the control and the poststimulus records. Cross-comparisons required normalizing the data (basal

discharge = 100%, 381 fibers recorded from 123 animals). All normalized values for the same dose were then averaged, obtaining a percent change with respect to basal activity. These data are presented in the form of dose-effect graphs  $\pm$  S.E.

Drugs were applied by microperfusion, the tip of a micro syringe (Hamilton  $\text{E}$ ) being positioned adjacent to the recording area, approximately 0.5 mm from the sensory epithelia. EAA and their analogues were dissolved in the Ringer being used for perfusion. Drugs were manually ejected from the syringes in volumes of 20  $\mu$ l in 2-3 sec. Air was taken up into the tip of the syringes to prevent the drugs from diffusing into the bath. This method of drug application allowed us to obtain a peak in drug concentration in the synaptic vicinity, followed by a quick dilution of the drug in the bath. In the Results section all concentrations are expressed as the applied concentration. Sometimes more than one drug was tested in the same experiment. In these cases, sufficient time between drug applications was allowed to assure a complete washout of the drugs, until recovery of the control discharge pattern of the fibers was reached.

The following drugs were tested: L-glutamic acid (LG), L-aspartic acid (LA), D-aspartic acid (DA), kainic acid (KA), quisqualic acid (QA), N-methyl D-aspartic acid (NMDA),

L-glutamic acid diethyl ester (GDEE), D-alpha aminoadipic acid (DAA), DL-2-amino 4-phosphonobutyric acid (APB), DL-2-amino-5-phosphono valeric acid (APV), and kynurenic acid (KY) (all from Sigma Chemical Co.).

In some experiments, the normal Ringer solution was modified and no  $MgCl_2$  was used. In other experiments high  $Mg^{2+}$  (10 mM) and low  $Ca^{2+}$  (0.09 mM) solutions were used.

## RESULTS

Recordings of spontaneous activity of primary afferents at the macular exit were obtained from 341 fibers. Lagellar fibers characteristically exhibit a regular spontaneous discharge of around 11 impulses per second (ips) (range from 3 to 18 ips), saccular fibers have a mean spontaneous discharge of 18 ips (range from 5 to 43 ips). Some of the saccular fibers are extremely sensitive to vibration. Semicircular canal fibers have higher basal activities with an average of 25 ips (range from 5 to 55 ips). Fibers with no spontaneous discharge were recorded from all areas (not considered for range calculation). These were extremely sensitive to ground borne vibrations. Fibers with very regular high rate basal discharge and no detectable EPSPs were also recorded.

Usually saccular fibers were recorded. Since recordings from the lagena and the semicircular canals did not show any significant pharmacological differences with those obtained from the sacculus, no distinction is made between them in the subsequent analysis.

Typical records of afferent fiber responses to the application of EAA agonists are illustrated in fig. 1. All the drugs tested produced a dose dependent increase in the afferent activity. L-glutamate (n = 48), L-aspartate (n = 53) and D-aspartate (n = 24) were active when applied in concentrations higher than 0.1 mM (fig. 2). Lower doses of L-glutamate, L-aspartate and D-aspartate did not produce significant effects. Normally the excitation induced by D-aspartate lasted longer (close to 5 min) than that produced by L-aspartate or L-glutamate (fig 1).

Kainate effects were studied in 29 fibers. Concentrations of 0.1 mM, produced a very fast effect on average reaching a 350% of the control discharge. This period of high activity was followed by a diminution or abolition of the spike discharge lasting 2 to 5 min. Afterwards, the activity gradually returning to its basal level (fig. 1). This post-excitatory suppression was irreversible when kainate was applied in concentrations higher than 0.1 mM. When applied at 0.01 mM, kainate excitation was not followed by a silent period.

Quisqualate was studied in 31 fibers. With concentrations between 0.005 to 0.1 mM, it produced a dose dependent afferent activity increase (fig. 2) comparable in its amplitude to the kainate effect, but with a very different time course (fig. 1). Thus, while quisqualate exerted a slowly increasing excitation which reached its maximum after about 1 min and lasted about 1 or 2 min, the kainate excitatory effect lasted only a few seconds. With higher doses ( 1 mM ) quisqualate also induced a blockade of activity in the fibers studied.

The effect of aspartate analogue NMDA was studied in 50 fibers. In our experimental conditions, NMDA had very low activity even at concentrations of 10 mM (fig 2). When  $Mg^{2+}$  was eliminated from the bath (n = 18), NMDA (0.5 - 10 mM) also induced an excitatory effect. However, the overall responses did not reflect a significant change in the dose-response curve for NMDA. Magnesium free solutions did not significantly modify the responses of afferent fibers to L-glutamate ( 1 mM ), L-aspartate ( 1 mM ) or D-aspartate ( 1 mM ).

Plots of the percentage increase of the basal discharge of afferent fibers induced by EAA agonists as a function of the logarithm of the concentration are shown in fig. 2. The response depends on the concentration for all the drugs



tested. Quisqualate and kainate were active in lower concentration ranges than glutamate, aspartate and NMDA. Dose response curves show practically no differences between L-glutamate, L-aspartate, D-aspartate and NMDA.

Typical records of the afferents response to the EAA antagonists employed are illustrated in fig. 3. They exerted dose dependent inhibitory effects of different magnitude and duration. Kynurebate (n = 29) was the most active, it produced a complete block of afferent activity when applied in concentrations of 0.5 mM or greater (fig. 4). Its effect lasted for about 4 min, followed by a gradual return to the control resting discharge. At lower doses, 0.1 mM kynurebate produced a partial reduction of the afferent activity. GDEE (n = 28) and APB (n = 24) in concentrations of 1 and 10 mM also induced an inhibition of similar duration as that produced by kynurebate, but of lower amplitude. APB sometimes showed a biphasic effect characterized by a short excitation (10 to 30 s) followed by a longer lasting (4 to 5 min) inhibition. DAA (n = 20) 0.5 mM produced a shorter inhibitory period of about 1 min (fig. 3). APV (n = 12) in concentrations from 0.1 to 10 mM produced a weak inhibitory effect. At concentrations of 10 mM, APV reduced the basal discharge in about 30%. With lower doses of APV no significant effects were observed (fig. 4).

The dose response graph of the antagonists tested is illustrated in fig 4. Plotted data represents the percentage decrease of basal firing frequency as a function of the logarithm of the concentration. Antagonists also shows a dose dependent activity, as noted above kynurebate was the most active of the antagonists tested.

The effect of APV and kynurebate on the physiologically evoked activity of afferent fibers was also studied. Only in these experiments the extracellular multiunit recording technique was used. Kynurebate in concentrations of 1 mM completely blocked the basal and the tilt evoked response of afferent fibers (fig. 5). The basal activity and the response to tilts returned to their normal levels after a 4 to 6 min washing period. APV applied at the same doses did not significantly modifies the basal activity or the response to tilts, even when it remained in contact with the preparation for more than 10 min.

In other set of experiments we studied the effect of some EAA agonists while the preparation was being bathed with low  $Ca^{2+}$  and high  $Mg^{2+}$  solutions. We found that low  $Ca^{2+}$  (0.09 mM) and high  $Mg^{2+}$  (10 mM) Ringer's solution inhibited the basal activity of the afferent fibers. The inhibition of basal activity was accompanied by an hyperpolarization of around 5 to 10 mV, and a reduction of the post-synaptic potentials recorded. The effect of

Kainate (0.1 mM, n = 6), quisqualate (0.1 mM, n = 5), L-glutamate (1 mM, n = 15) and D-aspartate (1 mM, n = 6) was assessed in these conditions. Frequency histograms of the control period showed a very low or no basal activity. The application of all four substances induced clear excitatory effects (fig. 6). The responses induced in low  $Ca^{2+}$  and high  $Mg^{2+}$  Ringer were somewhat lower and their time course slightly different than those induced in normal Ringer, except for kainate whose time course and amplitude was nearly the same in both types of solutions (fig. 6).

#### DISCUSSION

This study shows that an important synaptic input to first order vestibular afferents in the axolotl is mediated by a glutamate-related transmitter, possibly acting through kainate-quisqualate receptors. The term glutamate-related indicates that no structural identification of the "true" endogenous neurotransmitter is possible from our results.

In our experimental conditions (bath volume of 2 ml, and applied drug volume of 20  $\mu$ l), drugs dilute quickly to a final concentration which is 100 times lower than the concentration applied. Therefore, the final concentrations of kainate and quisqualate reached in the bath seem to be in the  $\mu$ M range. Additionally, some diffusional barriers exist for the drugs to reach the synaptic region, Thus indicating

that their effects are not due to non-specific pharmacological actions. Other substances like L-glutamate, L and D aspartate and NMDA, required doses at least one or two orders higher to produce excitatory effects, suggesting a lower affinity for the receptors involved in the response. However, the fact that differences in potency and time course might be due to different pharmacokinetic properties of the drugs tested cannot be excluded.

The rank order in potency of the agonists tested was: kainate  $\approx$  quisqualate  $>$  D-aspartate  $\approx$  L-glutamate  $\approx$  L-aspartate  $>$  NMDA. For the antagonists it was: Kynurenate  $>$  GDEE  $>$  APB  $>$  DAAA  $>$  APV. These results indicate that EAA responses are mediated mainly by non-NMDA (kainate/quisqualate) type receptors. The low activity of NMDA and APV coincides with previous results of other authors  $\text{\textcircled{R}}$ ,  $\text{\textcircled{L}}$  suggesting that NMDA type receptors may play a secondary role in afferent transmission in hair cells. However, more work is needed to clarify the role of NMDA receptors in vestibular system transmission particularly regarding the unresponsiveness of NMDA effects to changes in  $\text{Mg}^{2+}$  concentration  $\text{\textcircled{R}}$ ,  $\text{\textcircled{L}}$ .

In contrast with APV, kynurenate, which has been reported as a non-selective NMDA antagonist  $\text{\textcircled{R}}$ , exerted a strong inhibitory effect on both the evoked and the spontaneous activity of afferent fibers. This indicates the

participation of non-NMDA receptors on the *physiological* activation of afferent fibers. This result also shows that spontaneous and evoked activity are mediated by the same transmitter.

There have been numerous reports concerning the actions of EAA on vertebrate central neurons <sup>28, 30</sup>. Our findings are in general agreement with the results of these investigations, but there exist some differences worthy of mention. Of these, the very long lasting effect of D-aspartate is particularly striking. It has been shown that D-aspartate is a substrate for L-glutamate transport system <sup>6</sup>, consequently D-aspartate may competitively block the uptake of the endogenous transmitter <sup>7</sup>. Since D-aspartate exerts an excitatory effect even in high  $Mg^{2+}$  and low  $Ca^{2+}$  solutions, then D-aspartate activity should be postsynaptically mediated and not merely due to a secondary accumulation of the endogenous transmitter.

The differences in the time course of the effects evoked by amino acid analogues constitute an exciting finding. All agonists studied produce either a very quick excitatory effect (Kainate and glutamate), or a slowly rising long-lasting response (quisqualate, NMDA and D-aspartate). Responses elicited by L-glutamate may vary from one kind to the other depending on the dose applied. The most striking is the difference between kainate and

quisqualate excitation which having effects of similar amplitudes show very different time courses. These results lead us to speculate that kainate induced excitation may be equated with the quick initial response of afferent fibers to physiological stimuli, while quisqualate type effects resemble the sustained slowly adapting response. Thus it might be possible that the normal responses of the system to the endogenous transmitter may be mediated by the activation of both kainate and quisqualate type receptors; their combined activation might explain the characteristic time course of afferent response to natural stimulation.

Perfusion of the perilymphatic spaces of the vestibular system with low  $\text{Ca}^{2+}$  and high  $\text{Mg}^{2+}$  solutions, did not appear to have significant effects on the hair cells' membrane potential nor in the postsynaptic action potential generation mechanism <sup>23</sup>. Other studies of hair cell afferent synapses have directly demonstrated that  $\text{Mg}^{2+}$  inhibits transmitter release <sup>12, 21, 1, 10</sup>. The reduction in neural activity is due to the antagonism between  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  in controlling transmitter release which seems to be a general principle at chemical synapses.

From the foregoing, our experiments with high  $\text{Mg}^{2+}$  and low  $\text{Ca}^{2+}$  solutions, indicate that the effect of the drugs tested (kainate, quisqualate, D-aspartate and L-glutamate) is exerted at the postsynaptic level. These results contrast

with those previously reported by Valli et al. (1985) <sup>27</sup> in which they found that in low  $Ca^{2+}$  and high  $Mg^{2+}$ , glutamate evoked a depolarization of the afferent fibers but no spike activity. The differences between their results and ours, might be due to the method of drug application, since they applied glutamate in very low and sustained concentrations, thus inducing a slowly rising depolarization of the fiber which may not reach the firing level.

In order to study the possible presynaptic effect of EAA, the resting membrane potential of hair cells of the sacculus has been recorded, employing large doses of kainate (1 mM) and of L-glutamate (1 mM) (Soto and Tecuanhuey, unpublished results). These amino acids did not exert a depolarizing effect on the presynaptic cells which could otherwise explain the increase in the activity of afferent fibers. The membrane potential of hair cells was affected only after continuous exposure to kainate 1 mM for more than 30 min.

In summary, the dose dependent activity of EAA agonists and antagonists on the spontaneous and evoked activity of vestibular primary afferents, strongly supports the role of an EAA related substance as a neurotransmitter in the afferent synapses of the vestibular system. The rank order of activity of agonists and antagonists suggests that EAA effects are mediated by kainic / quisqualic type receptors.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Authors wish to thank Dr. P. Valli, Dr. B. Holmgren, Dr. O. Díez-Martínez and Dr. H. Nuñez for critical reading of the manuscript, and to M. E. Pérez for her participation in some of the experiments here reported. This research was partially supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, PCEXCNA 40571); Secretaría de Educación Pública (SEP, DGICSA 861545); and by Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Puebla (CECYT, 1987).



### FIGURE LEGENDS

Figure 1. Typical records of individual afferent fiber responses to EAA. Application of the drug (indicated by the arrows) is made after a control resting discharge record. To arrange the figure concentrations which almost induced the same response were selected. The number after each substance indicates the millimolar concentration. Calibration bars are 1 min and 10 ips.

Figure 2. Dose response curves of the EAA tested. Vertical bars represent S.E.. Responses are plotted as a percentage increase of basal discharge. Kainate and quisqualate constitute the most potent drugs, inducing excitatory responses from these fibers. The effect of the other drugs is of nearly the same magnitude for all of them.

Figure 3. Typical responses of individual afferent fibers to EAA antagonists. Application of the drugs (indicated by arrows) is made after a control resting discharge period. APB, DAA and kynurenate produce clear inhibitory effects of varying amplitude and time course. APV has almost no effects on these fibers. Calibration bars are 1 min and 10 ips.

Figure 4. Dose-response curves of the antagonists tested. Kynurebate is the most potent inhibitory drug, being active in lower concentrations than APV and GDEE. APV even at high doses has a very low inhibitory effect.

Figure 5. Extracellular recording of afferent fibers subjected to stimulation and EAA antagonists. In the upper record, a control period (shadowed) is followed by a tilting to  $+45^\circ$ , a transition from  $+45^\circ$  to  $-45^\circ$ , produced a clear response which was followed by a quick adaptation, and a period of sustained high activity. The application of kynurebate 1 mM in the resting horizontal position, blocked the spontaneous activity and eliminated the response to tilts. In the lower record, a fiber was subjected to the same experimental manipulations, but APV (1 mM) was applied instead of KY. APV did not produce a significant change of the basal spike activity nor of the afferent fiber responses to the stimulation. Calibration bars are 1 min and 10 ips.

Figure 6. Frequency histograms of fibers subjected to the application of amino acid agonists in low  $\text{Ca}^{2+}$  and high  $\text{Mg}^{2+}$  Ringer's solution. For the application of these substances they were also dissolved in Ringer with low  $\text{Ca}^{2+}$ , high  $\text{Mg}^{2+}$ . The excitatory effect of L-glutamate, D-aspartate, kainate and quisqualate is clearly appreciated in these records since there is no basal activity during the control period. Calibration bars are 1 min and 10 ips.

**BIBLIOGRAPHY.**

1. Annoni, J.M., Cochran, S.L. and Precht, W., Pharmacology of the vestibular hair cell afferent fiber synapse in the frog. *J. Neurosci.*, 4 (1984) 2106-2116.
2. Balcar, V.J. and Johnston, G.A.R., The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. *J. Neurochem.*, 19 (1972) 2657-2666.
3. Bledsoe, S.C., Chihal, D.M., Bobbin, R.P. and Morgan, D.N., Comparative actions of glutamate and related substances on the lateral line of *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75C (1983) 199-206.
4. Bledsoe, S.C., Bobbin, R.P., Thalmann, R. and Thalmann, I., Stimulus induced release of endogenous amino acids from skins containing the lateral line organ in *Xenopus laevis*. *Exp. Brain Res.*, 40 (1980) 97-101.
5. Bobbin, R.P., Glutamate and aspartate mimic the afferent transmitter in the cochlea. *Exp. Brain Res.*, 34 (1979) 389-393.

6. Bobbin, R.P., Bledsoe, S.C. and Jenison, G.L., Neurotransmitters of the cochlea and lateral line organ. In: Berlin, C.I. (Ed.) Hearing Sciences, College-Hill Press, San Diego, 1984, pp. 159-180.
7. Comis, S.D. and Leng, G., Action of putative neurotransmitters in the guinea pig cochlea. *Exp. Brain Res.*, 36 (1979) 119-128.
8. Davies, L.P. and Johnston, G.A.R., Uptake and release of D- and L-aspartate by rat brain slices. *J. Neurochem.*, 26 (1976) 1007-1016.
9. Dechesne, C., Raymond, J. and Sans, A., Action of glutamate in the cat labyrinth. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 93 (1984) 163-165.
10. Drescher, D.G. and Drescher, M.J., Calcium and magnesium dependence of spontaneous and evoked afferent neural activity in the lateral line organ of *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87 A (1987) 305-310.
11. Eybalin, M. and Pujol, R., A radioautographic study of [ $^3$ H]L-glutamate and [ $^3$ H]L-glutamine uptake in the guinea pig cochlea. *Neurosci.*, 9 (1983) 863-871.

12. Furukawa, T., Ishii, Y. and Matsuura, S., Synaptic delay and time course of postsynaptic potentials at the junction between hair cells and eighth nerve fibers in the goldfish. *Jap. J. Physiol.*, 22 (1972) 617-635.

13. Guth, P.S. and Melamed, E., Neurotransmission in the auditory system: a primer for pharmacologists. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22 (1982) 383-412.

14. Hama, K., Fine structure of the afferent synapse and gap junctions on the sensory hair cell in the saccular macula of goldfish: a freeze fracture study. *J. Neurocytol.*, 9 (1980) 845-860.

15. Hamilton, D.W., The calyceal synapse of type I vestibular hair cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 23 (1968) 9-114.

16. Jenison, G.L., Bobbin, R.P. and Thalmann, R., Potassium induced release of endogenous amino acids in the guinea pig cochlea. *J. Neurochem.*, 44 (1985) 1845-1853.

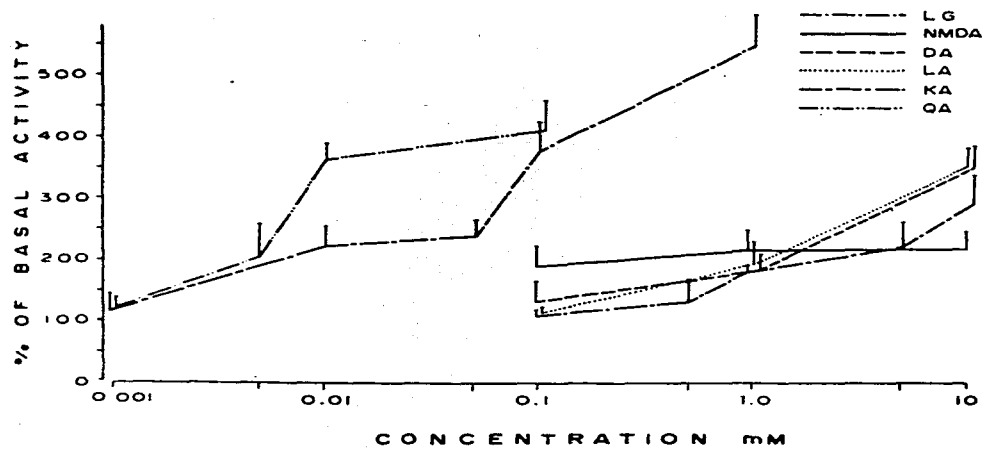
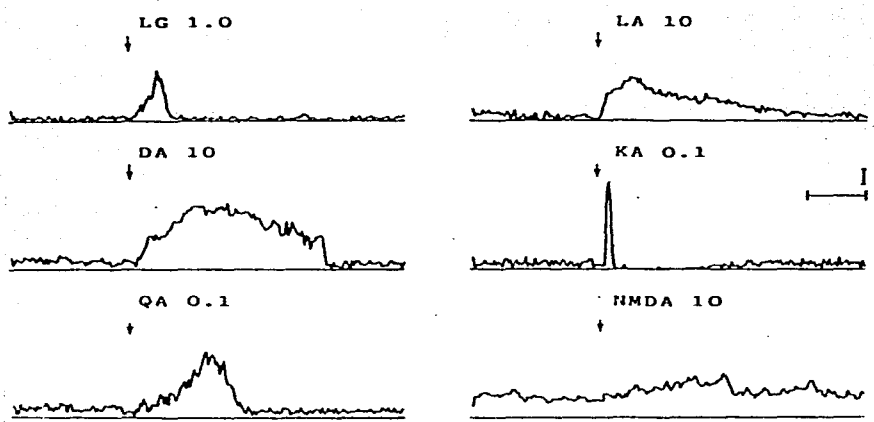
17. Klinke, R., Neurotransmission in the inner ear. *Hearing Res.*, 22 (1986) 235-243.

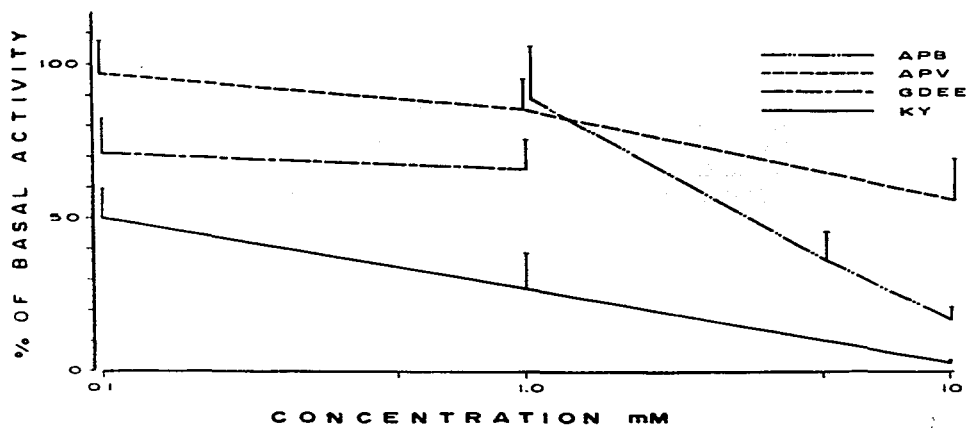
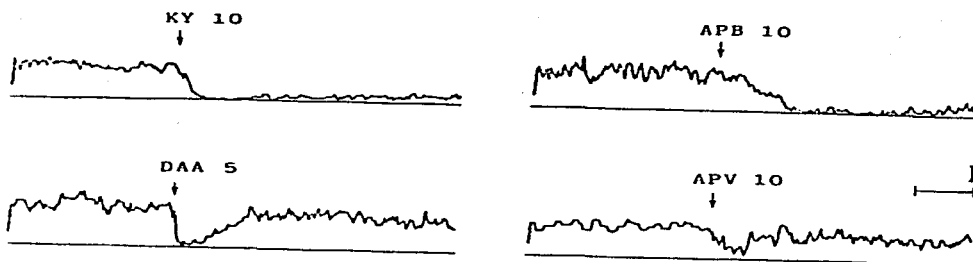
18. Mayer, M.L., Westbrook, G.L. and Guthrie, P.B. Voltage dependent block by  $Mg^{2+}$  of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309 (1984) 261-263.
19. Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. and Prochiantz, A., Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307 (1984) 462-465.
20. Meza, G., Characterization of GABA-ergic and cholinergic neurotransmission in the chick inner ear. In: Drescher, D.G. (ed.). *Auditory Biochemistry*, Charles C. Thomas, Springfield, IL., 1984 pp. 80-101.
21. Rossi, M.L., Valli, P. and Casella, C., Post-synaptic potentials recorded from afferent nerve fibers of the posterior semicircular canal in the frog. *Brain Research*, 135 (1977) 67-75.
22. Ryan, A.F. y Schwartz, I.R., Preferential glutamine uptake by cochlear hair cells: implications for the afferent cochlear transmitter. *Brain Research*, 290 (1984) 376-379.
23. Siegel, J. H. and Relkin, E. M., Antagonistic effects of perilymphatic calcium and magnesium on the activity of single cochlear afferent neurons. *Hearing Res.*, 28 (1987) 131-148.

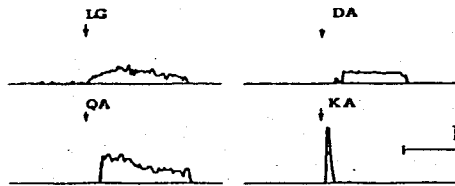
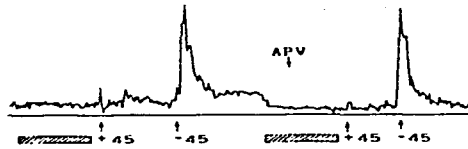
24. Soto, E. and Vega, R., Microperfusion of excitatory amino acid analogues on the axolotl *Ambystoma mexicanum* inner ear. Soc. Neurosci. Abs., 12 (1986a) 253.
25. Soto, E. and Vega, R., Effects of aspartate and related drugs on saccular and lagenar afferents of the axolotl inner ear. Neurosci. Lett. Suppl., 26 (1986b) 286.
26. Soto, E. and Vega, R., A Turbo Pascal program for on line data acquisition and analysis using a standard serial port. J. Neurosci. Meth., 19 (1987) 61-68.
27. Valli, P., Zucca, G., Prigioni, I., Botta, L., Casella, C. and Guth, P.S., The effect of glutamate on the frog semicircular canal. Brain Research, 330 (1985) 1-9.
28. Vega, R., Soto, E., Budelli, E. and Gonzalez-Estrada, M.T., Is GABA an afferent transmitter in the vestibular system?. Hearing Res., 29 (1987) 163-167.
29. Watkins, J.C. and Evans, R.H., Excitatory amino acid transmitters. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 21 (1981) 165-204.
30. Watkins, J.C., Excitatory amino acids and central synaptic transmission. Trends Pharmacol. Sci., 5 (1984) 373-376.



31. Wersäll, J. and Bagger-Sjöbäck, D., Morphology of the vestibular sense organ. In: Kornhuber, H.H. (ed). Handbook of Sensory Physiology. Vestibular System. Basic Mechanisms. Vol. 6, pt 1. Springer Verlag, New York, 1974, pp 123-170.







*Journal of Neuroscience Methods*, 19 (1987) 61-68  
Elsevier

NSM 00646

## A Turbo Pascal program for on line spike data acquisition and analysis using a standard serial port

Enrique Soto and Rosario Vega

*Departamento de Ciencias Fisiológicas, Instituto de Ciencias, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla (México)*

(Received 15 April 1986)

(Revised 31 April 1986)

(Accepted 20 August 1986)

**Key words:** Data acquisition; Interval histogram; Frequency histogram; Microcomputer; IBM PC; Spike train; Vestibular system

A Turbo Pascal program for data acquisition and analysis is presented. The program detects incoming data as TTL pulses through the serial port of an IBM-PC and compatible computers and displays the instantaneous frequency plot and the interval histogram on-line. Novel features of this Pascal program are: (1) no special hardware requirements and (2) on-line analysis of more than one source at a time. No hardware additions to the supplied computer and easy operation make this program a valuable tool, directly useable in an IBM-PC and compatible computers.

There are biological processes in which specific sequences of events are the relevant data. Neurophysiologists very often deal with these kind of processes in which little or no basic importance may be given to the particular wave form of the signal. One such process is the neuronal activity recorded as action potential trains (spikes). In this case the information transmitted by a neuron is assumed to be determined by the specified distribution of spikes over time (Moore et al., 1966; Glaser and Ruchkin, 1976).

Usually, the data obtained from neuronal recording are displayed as frequency (rate) or interval histograms. Neurophysiologists commonly use special purpose computers for this kind of analysis and very often the task is accomplished by means of analog to digital converters or of some kind of special electronic timer-counters (Cohen and Pfaff, 1984).

Our main interest was to develop a method for event counting and interval analysis in our Columbia PC compatible computer, which depends exclusively on the supplied computer hardware, without having to develop electronic interfaces or analog to digital converters.

---

*Correspondence:* E. Soto, Departamento de Ciencias Fisiológicas, ICUAP, Universidad Autónoma de Puebla, Apartado Postal 406, Puebla, Pue, México

The program presented here allows the computer to accept TTL (0.2–0.8 V logical zero; 2.0–5.0 V logical one) data stream directly through its "standard" serial port, and to analyze their time distribution, plotting the rate and the interval histogram as data arrive. The program accepts data from more than one source at the same time, although there is a tradeoff between temporal resolution and number of data sources. Our program allows data acquisition from two sources with a time resolution of 1 ms and on-line display of rate plot and interval histogram of up to 20 min. In addition the system also includes the option of storing data on disk and obtaining elemental statistics.

### Material and Methods \*

The basic computer set-up required for the acquisition program is an IBM PC compatible computer with a 64 K memory, one disk drive and a free input port (serial port). In addition to the basic computer hardware the Turbo Pascal compiler is needed.

The system imposes only one condition on the incoming data: the signal must be a TTL compatible signal.

In the IBM-PC and compatible computers, the serial communication port is an RS-232 interface, in which the TTL signal from the experiment may be directed through the handshaking circuits of the interface. In our system we connect a double threshold window discriminator to pins 1–5 (above window) and 1–22 (within window) of the serial port (normally this port is intended for modem connection: pin 1 is ground, pin 5 is clear to send, and pin 22 is the ring call). The computer will identify the presence of TTL pulses as a logical one. Then, the value of the port registers will depend on the presence of pulses in each pin. Turbo Pascal gives the user direct access to the computer ports with the possibility of assigning the value of the port to a variable. In the IBM-PC and compatible computers serial port one is at address hexadecimal 3FE (Norton, 1985), the Pascal sentence `x := port[3FE]` will assign the value of serial port status register to "x". Port value will be 0 if no pulse, 17 if there is a pulse in pin 5; 64 if there is a pulse in pin 22 and 81 if there are pulses in both pins 5 and 22. Programming is straightforward: port value reading and subsequent assessment of whether there is a pulse in some pin of the interface (procedure capture data and capturefreqDouble of Appendix 1).

Accurate timing is achieved by programming the 8253 clock chip of the PC so that it ticks once each millisecond (Jourdain, 1986). Port addressing rate should be defined on the basis of the duration of incoming data. In our case the window

---

\* Apple II+ is a trademark of Apple Computers; Columbia and Columbia 1600-IV are trademarks of Columbia Data Products, Inc.; Commodore 64 is a trademark of Commodore Business Machines; IBM PC is a trademark of International Business Machines, Inc.; Lotus 1-2-3 is a trademark of Lotus Development Corp.; MS DOS is a trademark of Microsoft Corporation; Texas TI 99/4A is a trademark of Texas Instruments; Turbo Pascal is a trademark of Borland International.

discriminator signals are 1.1 ms, thus reading the port each millisecond suffices to prevent any loss of data.

The program described here allows the user to select from the start menu the desired analysis of data (frequency histogram from one source, frequency histogram from two sources, interval histogram of one source and both frequency histogram and interval histogram from one source). The user may also select the bin width, the analysis period and one of two trigger modes: the first signal in pin 5 channel or a keyboard command. The data acquisition procedure continues until it reaches the selected number of bins (maximum 300), or until the user presses the "F1" key. Pressing any other key causes a mark to appear indicating the onset of experimental manipulation. Histograms are displayed on-line. When data acquisition finishes elemental statistics of data (mean and standard deviation) and protocol details are also displayed. Finally, the raw data may be stored on disk (Lotus 1-2-3 compatible archive) for subsequent processing.

#### Results and Conclusion

In our laboratory we have been using this program for data acquisition and analysis of unitary recordings from primary afferent nerve fibers of the vestibular system of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). In this preparation we have studied the effect of excitatory amino acids on spontaneous discharge of these fibers. Fig. 1 shows the frequency and interval histogram from a typical experiment in which the spontaneous afferent discharge is initially recorded; then (mark), D-aspartic acid ( $10^{-3}$  M) is microperfused in the vicinity of the sacculi. The drug produces a clear excitatory effect on this fiber.

Although this program was developed for the Columbia PC compatible computer, it runs in the IBM PC, and its fundamentals are easily adapted to practically

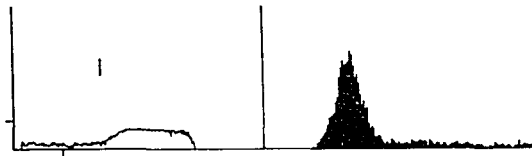


Fig. 1. Frequency and interval histogram from a primary afferent fiber of the macula sacculi of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Upper mark in frequency histogram indicates the moment of application of D-aspartic acid ( $10^{-3}$  M). Excitatory effect of D-aspartic acid is clearly appreciated from the rate plot interval histogram of the whole epoch is shown at right. Bin width is of 1 ms. Vertical calibration applies to both records representing twenty spikes per second, and twenty events for bin size. Horizontal calibration applies also to both frequencies and interval histograms. It represents 1 min for frequency histogram and 60/bin ms for interval histogram.

any commercially available computer. Indeed, in our laboratory, we have been able to implement this program for counting of behavioral events on the Commodore 64, and the Texas TI 99/4A computer. However the time resolution of these home computers is not suitable for neuronal train spike analysis.

The Pascal program is easily understandable and can be adapted to many computers and experimental conditions. The experienced user can modify the acquisition procedure to include more lines of data input and output through the port. The timer chip can also be programmed to modify timing. It is worth noting that our approach will allow the computer to accept data through any of the computer ports (joystick, parallel, second serial), by only changing port address and values resulting from port reading. [When working on the revised version of this manuscript we found out that a very similar approach had been developed for the Apple II + computer by Gras and Horner (1985).]

#### Acknowledgements

The authors wish to thank Javier Birwe and Julio Glockner for critical reading of the manuscript and Gertrudis Payas for the English version. This research has been partially supported by PRONAES Grant 84010196 from the Secretaria de Educación Pública (SEP) and a 1985 grant from the Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (CECYT), Puebla, México.

#### References

- Cohen, M.S. and Pfaff, D.W. (1984) On-line data acquisition system using an Apple computer: ISI and PST histograms. *Brain Res. Bull.* 13: 205-223.
- Glaser, E.M. and Ruchkin, D.S. (1976) *Principles of Neurobiological Signal Analysis*. Academic Press, London.
- Gras, H. and Horner, M. (1985) A program for time control and measurement in electrophysiological experiments with an Apple II microcomputer. *J. Electrophysiol. Technol.* 12: 197-208.
- Jourdain, R. (1986) *Programmer's Problem Solver for the IBM PC, XT, & AT*. Brady Communications Company, U.S.A.
- Moore, G.P., Perkel, D.H. and Segundo, J.P. (1966) Statistical analysis and functional interpretation of neuronal spike data. *Annu. Rev. Physiol.* 28: 491-523.
- Norton, P. (1985) *Programmer's guide to the IBM PC*. Microsoft Press, U.S.A.

APPENDIX 1.  
PROGRAM tt.g INTERVAL ( July, 1986 )

```

TYPE datarray=ARRAY[0..300] OF Integer;
   namedstring[12];
VAR
  time_tick:Integer; ABSOLUTE $0040:$006C; {points to tick count of BIOS timer}
  nBin,nEvent,experiment,bin,1, interval,n,time_init,time_end:Integer;
  data_above,data_between,his_a:=data[datarray];
  option,continue,any,trigger:Char;
  archive:Text;

```



```

PROCEDURE Menu;                                (select action and beginning parameters)
BEGIN IF any < > '1'                            (decide if change of action has been selected)
  THEN BEGIN
    REPEAT
      ClrScr; TextMode(2); GoToXY(3,6);
      WriteLn('1 : BIN RATE '); GoToXY(3,4);
      WriteLn('2 : INTERVAL HISTOGRAM '); GoToXY(3,12);
      WriteLn('3 : BIN RATE AND INTERVAL HISTOGRAM '); GoToXY(3,15);
      WriteLn('4 : Double BIN RATE ');
      GoToXY(3,18); Read(knd,option);
      UNTIL (option='1') AND (option='4');
    REPEAT
      END;
    ClrScr; GoToXY(3,10);
    WriteLn(' Experiment number ');
    Read(experiment); GoToXY(3,12);
    IF option<'2'                                (if no interval histogram)
    THEN BEGIN
      WriteLn(' bin width in sec '); Read(bin);
      GoToXY(3,14); WriteLn(' Processing time ( in bins ) ');
      Read(nbin); nEvent:=20000;
    END
    ELSE BEGIN
      WriteLn(' total number of events ? ');
      Read(nEvent); nbin:=1; nbin:=1;
    END;
    GoToXY(3,16);
    WriteLn(' trigger model keypressed - F1 External - E ');
    Read(trigger);
    UNTIL (bin/=1) AND (nbin/=1) AND (nbin<=200);
  END;
PROCEDURE AvgEd(n,locate:integer;nf:boolean);(calculates basic statistics)
VAR i,j,h:integer;
    fReal,dataFreal,average,sum,deviation,sqr_dat:fReal;
BEGIN
  sum:=0;sqr_dat:=0;deviation:=0;average:=0;i:=1;
  FOR i:=2 to 300 DO
    BEGIN
      hi=0; dataFreal:=zdata[i];
      IF h = true THEN                                ( if interval histogram )
        BEGIN
          j:=1;
          WHILE h = zdata[j] DO
            BEGIN
              fReal:=1; h:=h+1;
              sqr_dat:=sqr_dat+Sqr(fReal);
            END;
          END
        ELSE sqr_dat:=sqr_dat+Sqr(dataFreal);
          sum:=sum+dataFreal;
        END;
      gotoxy(25,3);
      if N=0 THEN write(' no data ')
      ELSE BEGIN
        deviation:=Sqrt((sqr_dat-(Sqr(sum)/n))/(n-1));
        average:=sum/N;
        gotoxy(locate,25);
        Write('Average ',Round(average));
        Write(' SD ',Round(deviation));
        Write(' N ',N);
        END;
      read(kbd.any);
    END;
  END;
PROCEDURE datafi:(which named; locate:integer); (disk store)
VAR savefChariname_archiname;
BEGIN

```

```

Port[503]=50;                                     (restores normal timing)
Port[500]=Lo(0);
Port[501]=Hi(0);
gotoxy(locate,2);
Write('Store data ',which,' ? y / n');
Readln(save);
IF (save='Y') OR (save='y') THEN
BEGIN gotoxy(locate,4);
Write('Name archive '); Readln(name_arch);
Assign(archive_name_arch); Rewrite(archive);
FOR i:=1 TO 200 DO
WriteLn(archive,2data[i]);
Close(archive);
END;
END;

PROCEDURE graph_freq(v, paint:integer);           (axis and calibration)
BEGIN
IF (1<nBin) THEN Write(' DONE ');
ELSE Readln(continue);
IF (continue='N') OR (1<nBin) THEN
BEGIN (if F1 have been pressed or processing time is complete)
nBin:=1;
FOR i:=1 TO nBin DO
BEGIN
Draw(1*9,180-data_above[i-1],1*10,180-data_above[i],paint);
Draw(31*9,1.V+180-data_between[i-1],32*9,1.V+180-data_between[i],paint);
END;
Draw(10,170,3,170,paint); ( calibration in y )
Draw(60 DIV bin,180,60 DIV bin,187,paint); ( calibration in x )
Draw(10,180,210,180,3); Draw(10,180,10,90,paint); (axis)
Draw(320,180,620,180,3); Draw(320,180,320,90,3);
IF paint=3 THEN BEGIN ( option 1 or 2 or 4 have been selected )
zdata:=data_above; (call statistics)
Avg_Ed(nBin,5,false);
datafile('above',3); (call disk store of raw data)
END;
IF V=1 THEN BEGIN ( option 4 have been selected )
zdata:=data_between;
Avg_Ed(nBin,5,false);
datafile('between',4);
END;
IF (option=12) OR (option=13) THEN
BEGIN
Draw(320,180,620,180,3); Draw(320,180,320,90,1);
zdata:=hi_4;
Avg_Ed(interval,n,5,true);
datafile('interval',4); continue:=55;
END;
END
ELSE Draw(1*10,70,1*10,90,1);
END;

PROCEDURE capture_data(paint:int,paintfreq:integer);
VAR bin_count,bin1, interval,above,data,datant,fin1:integer;
BEGIN
bin_count:=0; interval:=0; datant:=0; fin1:=bin1:=bin1000;
IF option=12 THEN BEGIN fin1:=0; 1:=nBin; END;
REPEAT 1:=1; bin_count:=0; above:=0; ( resets variables for new bin )
WHILE (bin_count<bin1) AND (above<nEvent) DO
BEGIN
time_init:=time_tick; ( read ROM-BIOS timer tick count )
data:=Port[50FE]; ( read serial port status register )
interval:=interval+1; ( increment counter one )
IF interval>299 THEN interval:=300; ( maximum value for interval )
IF (Abs(data-datant)>10) AND (data<60) THEN
BEGIN (have port changed and is bigger than 60 then spike in pin 5 )

```

```

above:=above+1;
his_a[interval]:=his_a[interval]+1; {array for interval histogram}
Plot(1:=220,180-his_a[interval],pointint);
interval:=0; { resets interval count }
END;
bin_count:=bin_count+bin; { increment counter two, for bin }
datant:=data; { stores port value for comparison }
REPEAT time_end:=time_tick; { time delay }
UNTIL time_end:=time_init; { end of while }
interval:=interval+above; { total number of events counted }
data_above[1]:=above; { bin rate array }
Plot(1:=10,180-above,pointfreq); { graph bin rate }
UNTIL keyPressed OR (i=>Bin);
graph_freq(0,pointfreq);
END; { end of procedure }

PROCEDURE capture_freqDouble;
VAR bin1,bin_count,data,datant,absdat,above,between:Integer;
BEGIN
bin_count:=0;bin1:=bin-1000; datant:=0;
REPEAT
bin_count:=0;above:=0;between:=0;:=1;
WHILE bin_count<bin DO
BEGIN
time_init:=time_tick; { read ROM-BIOS timer tick count }
data:=Port[42FE]; { read serial port status register }
absdat:=Abs(data-datant); { actual value minus previous value }
IF absdat>10 THEN { has port value changed }

BEGIN
IF data > 70 THEN { is port value greater than 70 ? }
BEGIN above:=above+1; between:=between+1; END { spike in both }
ELSE BEGIN
IF data < 35 THEN { is port value greater than 35 ? }
THEN above:=above+1 { spike in bin 5 data source }
ELSE IF data > 10 THEN { is port value greater than 10 ? }
between:=between+1; { spike in pin 22 data source }
END; END;
bin_count:=bin_count+1;datant:=data; { increment counter one }
datant:=data; { store port value }
REPEAT time_end:=time_tick; { time delay, up to one millisecond }
UNTIL time_end:=time_init; { end of while }
END;
data_above[1]:=above; data_between[1]:=between;
Plot(1:=10,180-above,3);
Plot(1:=220,180-between,3);
UNTIL keyPressed OR (i=>Bin);
graph_freq(1,3);
END;

PROCEDURE Capture;
BEGIN
FOR i:=0 TO 320 DO
BEGIN
data_above[i]:=0;data_between[i]:=0;
his_a[i]:=0;
END;
HiRes;
GoToXY(3,1);Write(' exp 'emperiment);
IF option = '2' THEN Write(' events ',nEvent);
ELSE Write(' bin ',bin);
IF (trigger='E') OR (trigger='') THEN
UNTIL (i=12) AND (i=20); {waiting for signal in pin 22}
:=0;interval:=0;
REPEAT
CASE option OF
1:capture_data(0,3);
2:capture_data(3,0);
3:capture_data(3,3);
4:capture_freqDouble;
END;
UNTIL (continue='59') OR (i=>Bin);
END;

```

```
BERIN
  REPEAT
    Menu;
    Port[8d3]=54;          { write to 8253 timer chip control port }
    Port[8d0]=Ldt(1193);  { program 8253 to tick each millisecond }
    Port[8d0]=Hlt(1193);
    capture#1;
    jotemv(5,10);
    WriteLn(" continue same = 1; change = 2; finish = Esc. ");
    Read($Fd.any);
  UNTIL any=#27;
  CtrScrl;
END.
```

COMPUTER PROGRAM FOR STATISTICAL U-MANN WHITNEY  
NONPARAMETRIC ANALYSIS OF NEURONAL ACTIVITY.

Enrique Soto<sup>1</sup>, Juan Vicente Echague<sup>2</sup> and Rosario Vega.

Departamento de Ciencias Fisiológicas, ICUAP, Universidad  
Autónoma de Puebla, Apartado Postal 406, Puebla, Pue.,  
México.

1 To whom all correspondence should be addressed at:  
Departamento de Ciencias Fisiológicas, ICUAP, Universidad  
Autónoma de Puebla, Apartado Postal 406, Puebla, Pue.  
México.

2 On leave of absence from the Instituto Clemente Estable,  
Montevideo, Uruguay.

A program for neuronal activity analysis is described. The applied computational techniques are standard in the field of digital processing, but the program is particular in its field of application and way of data selection. The program is written in Turbo Pascal™ for the IBM-PC and compatibles and is capable of calculating the statistical significance (U-Mann Whitney) between two sets of graphically selected data. Although the program was developed for spike frequency histogram analysis, it easily can be adapted to perform statistical analysis of other kind of data.

Key words: IBM-PC, microcomputer, frequency hystograms, statistical analysis, W-Mann Whitney, vestibular system.

## INTRODUCTION.

Physiologists commonly deal with continuous records of significant variables (neuronal spike activity, muscle contraction, etc.) and study their modifications under the influence of certain stimulus. If spontaneous activity is present, it will tend to obscure what might be a clearly detectable response. Under this condition the effect of certain manipulation is commonly asserted on the basis of an arbitrary selected percent modification of the spontaneous activity [1, 2]. Sometimes no statistical analysis of the variable recorded is done, introducing great uncertainty regarding the significance of the effects.

We here described a software that allows off-line processing of frequency histograms of neuronal spike activity, in order to determine if statistically significant differences exist between selected segments of the spike frequency histograms.

In our laboratory we have been studying the effect of neurotransmitter related substances on the primary vestibular system afferent fibers of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) [2]. Initially we found that some drugs (GABA for example), seem to exert effects which may be appreciated qualitatively (by hearing the spikes in a loudspeaker), but

this change of activity is not fully evident in the frequency histograms and it does not fulfill the criterion of a 20% change established by us.

That particular situation led us to develop a program in order to statistically analyse the data and decide if indeed there exists an effect which is significant taking in consideration not only a global percent change, but the overall activity of a cell.

#### METHODS.

The program described have been develop in Turbo Pascal in an IBM-PC computer with 128K RAM and one disk drive.

In our experiments neuronal activity is processed on line as frequency and interval histograms [3]. These histograms are stored on diskettes in the form of arrays (up to 300 integer values lotus 123 compatible files). The program presented here reads these data and displays them on the screen. The user is prompted to select two sets of data for statistical analysis. For this to be done we designed a user friendly procedure in order to pass over the register a set of four cursor bars (figure 1). These four bars enclose two sets of data which could then be subjected to statistical analysis. In this way all the undesirable



sections of the recording and stimulus artifacts may be eliminated.

The program perform descriptive statistic (n, mean and standard deviation) of selected data and nonparametric U-Mann Whitney significance test. The use of nonparametric statistics avoids all restrictive conditions associated with parametric statistics [4]. The null hypothesis is that the spike generation process is unaffected by the stimulus, therefore for it to be true, the data before and after stimulus should not differ significantly from one another.

For the calculations a two tails U-Man Whitney test was selected according with the following equation.

$$U = n_1 n_2 + \frac{n_1 (n_1 + 1)}{2} - R_1$$

Finally the program provides a printout of the data obtained and decides if the null hypotesis may be rejected.

## SAMPLE RUN

Data for this example are taken from Soto and Vega [5]. They refer to the inhibitory effect of kynurenic acid on the activity of afferent fibers of the vestibular system.

The frequency histogram is presented graphically in order to allow the user to select the section of the recording which seems relevant (Fig 1), the data input is in the form of an array of up to 300 integer values. Then descriptive statistics and U-Mann Whitney test is performed. Results are presented on the screen and a printout of data obtained. For this particular case, the comparison of segments A and B resulted in a non significant difference, whereas segments C and D are significantly different (Fig. 1).

## CONCLUSION.

The program presented allows the user to determine if an experimental manipulation has an effect (excitatory or inhibitory) on the activity of afferent fibers. Program seems particularly useful to extract valuable information from recordings in which the basal activity and its natural variation may tend to obscure the effect of experimental

manipulations. The program may be used to analyse practically any kind of data stored in diskettes in the form of arrays.

#### HARDWARE AND SOFTWARE SPECIFICATIONS.

The program was written for an IBM-PC with 128K memory, under MS-DOS 2.00 or greater. For the program to run the Turbo Pascal compiler is also needed. Program listing, instructions and sample run are available on request from the authors.

#### ACKNOWLEDGEMENTS.

We wish to thank to Dr. Bjorn Holmgren for his comments on the manuscript. This work was supported by Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología, CECyT 1985 grant and Secretaria de Educación Pública SEP grant C86-08-0432.

## FIGURE LEGENDS

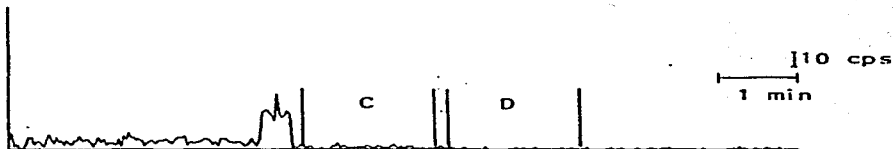
Fig. 1). Frequency histogram from a fiber of the semicircular canal of the vestibular system. In the upper graph intervals A and B represent the control and the poststimulus region. Values for mean and standard deviation for each set of data are presented below the graph. U Mann-Whitney test do not let us to reject the null hypothesis. Bottom graph shows the effect of a second application of kynurenic acid 0.1 mM. The calculated Z value shows that in this case intervals C and D are different, thus indicating an effect of the drug. Undesired region of data (arrowheads) has been eliminated from calculations.



Set A. (1-38) N=38 range (0-4) mean = 5.10  
std. dev. = 2.51

Set B. (50-88) N=38 range (2-9) mean = 5.53  
std. dev. = 1.59

Value of Z = 0.9487. Null hypothesis can not be  
rejected  $p < 0.005$



Set C. (113-158) N=46 range (0-4) mean = 1.21  
std. dev. = 0.90

Set D. (160-208) N=49 range (0-2) mean = 0.28  
std. dev. 0.53

Value of Z = 5.330. Null hypothesis may be rejected  
 $p < 0.005$

## REFERENCES.

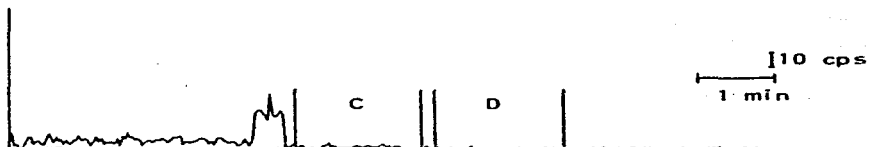
- 1).- J.M. Annoni, S.L. Cochran and W. Precht, Pharmacology of the vestibular hair cell-afferent fiber synapse in the frog., J. Neurosci. 4 (1984) 2106-2116.
- 2).- R. Vega, E. Soto, R. Budelli and M.T. González Estrada, Is GABA an afferent transmitter in the vestibular system?., Hearing Res. 29 (1987) 163-167.
- 3).- E. Soto and R. Vega, A Turbo Pascal program for on line spike data analysis using a standard serial port., J. Neurosci. Meth. 19 (1987) 61-68.
- 4).- S. Siegel, Non-parametric statistics for the behavioral sciences. (Mc. Graw Hill, New York, 1956)
- 5).- R. Vega and E. Soto, Kynurenic acid and 2-amino 5-phosphonovaleric acid block spontaneous activity of the vestibular system primary afferents., Soc. Neurosci. Abs., 13 (1987) 636.



Set A. (1-38) N=38 range (0-4) mean = 5.10  
std. dev. = 2.51

Set B. (50-88) N=38 range (2-9) mean = 5.53  
std. dev. = 1.59

Value of Z = 0.9487. Null hypothesis can not be  
rejected  $p < 0.005$



Set C. (113-158) N=46 range (0-4) mean = 1.21  
std. dev. = 0.90

Set D. (160-208) N=49 range (0-2) mean = 0.28  
std. dev. 0.53

Value of Z = 5.330. Null hypothesis may be rejected  
 $p < 0.005$