



11281
47
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

PAPEL FISIOLÓGICO Y MECANISMO DE ACCIÓN DE
NEUROPEPTIDOS EN EL OÍDO INTERNO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

MARÍA DEL ROSARIO GPE. VEGA Y SAENZ DE MIERA

TUTOR

Dr. Enrique Soto Eguibar

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

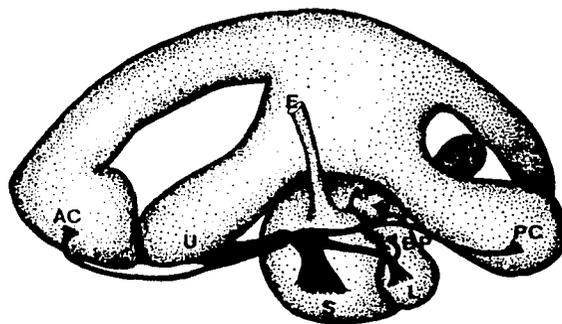
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Transducción mecanoeléctrica	3
Corrientes iónicas dependientes de voltaje en células ciliadas	5
Rectificador retardado g_{KDR}	6
Corriente transitoria de salida g_{KA} $++$	7
Corriente de K^+ dependiente de Ca^{++} $g_{K,Ca}$	8
Corriente de Ca^{++} activada por voltaje g_{Ca}	9
Corriente rectificante de entrada g_h	11
Corriente rectificante de entrada g_{K1}	11
Corriente rectificante lenta de bajo umbral $g_{K,L}$	12
Potencial receptor en la célula ciliada	13
Potencial generador en la neurona aferente	15
Transmisión sináptica en el sistema vestibular	16
Acoplamiento potencial receptor - liberación de neurotransmisor	18
Neurotransmisores	21
Sinapsis aferente	21
Sinapsis eferente	24
Generalidades de péptidos opiáceos	28
Receptores a opioides	28
Neuropéptidos en el oído interno	31
Planteamiento del problema	33
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO PRINCIPAL	34
OBJETIVOS PARTICULARES	34
MATERIAL Y MÉTODOS	35
Disección	35
Registro de la actividad aferente en el sistema vestibular aislado	37
Fijación de voltaje en células ciliadas aisladas	39
Morfometría de las células aisladas	43
Fármacos	43
Inmunohistoquímica	44
Determinación de péptidos derivados de la proencefalina por radioinmunoensayo (RIA)	46
Cromatografía de filtración en gel	47
Radioinmunoensayo (RIA)	47
RESULTADOS	49
Modulación de la descarga de neuronas aferentes vestibulares por agonistas y antagonistas de los receptores a opioides	49
Receptor δ	50
Receptor μ	52
Receptor κ	54
Sensibilización aguda	55
Interacciones con antagonistas colinérgicos	57
Experimentos de fijación de voltaje	57

Corrientes iónicas dependientes de voltaje en las células ciliadas	60
$I_{K,DR}$	60
$I_{K,A}$	61
$I_{K,Ca}$	66
$I_{K,IR}$	66
I_{Ca}	66
Acción de agonistas opioides sobre corrientes iónicas en células ciliadas	67
Inmunohistoquímica	71
β -endorfinas	71
Enkefalinas	74
Dinorfinas	75
Contenido de péptidos derivados de la proencefalina en el vestíbulo	76
DISCUSIÓN	79
Neurofarmacología	79
Órgano aislado	79
Células ciliadas aisladas	85
Inmunohistoquímica	88
Proencefalina y péptidos derivados	90
Conclusiones	92
Conclusión final	93
BIBLIOGRAFÍA	94



Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a:

Martha León Olea por su apoyo para el desarrollo de las técnicas de inmunohistoquímica.

Oswaldo Vindrola Asti por su apoyo en la determinación de la proencefalina y sus derivados en el vestíbulo del axolotl.

A Alfonso Palacios, Hortencia Chávez, Sandra Esparragosa y Angélica Almanza, quienes en diversos momentos han apoyado en el desarrollo del trabajo experimental.

Este trabajo recibió financiamiento de la UNAM por la vía de los apoyos PADEP-UNAM en el año de 1995.

RESUMEN

En este trabajo abordamos el problema de definir la existencia, el papel funcional y los mecanismos de acción de los péptidos opioides en el sistema vestibular del ajolote (*Ambystoma tigrinum*).

Se realizaron registros multiunitarios de la actividad eléctrica de las neuronas aferentes y de las corrientes iónicas activadas por voltaje en las células ciliadas aisladas de los canales semicirculares. Con técnicas inmunohistoquímicas se estudio la distribución de neuropéptidos en el sistema vestibular.

En los registros del efecto de agonistas y antagonistas de los receptores a los péptidos opioides sobre la actividad eléctrica de las neuronas aferentes, encontramos que la naloxona (10 nM a 1 mM) produjo un efecto excitador. Para el receptor μ , encontramos que el DAGO (D-Ala-N-Me-Phe-Gly-OI-Encefalina) (1 pM a 10 μ M), que es un agonista, incrementó en 190% la descarga basal de las neuronas aferentes con una CE_{50} de 1.3 nM. Por su parte, el antagonista funaltrexamina (1 nM a 100 μ M), produjo una inhibición de la descarga de las aferentes vestibulares reduciéndola hasta en un 90% (CI_{50} de 3.7 μ M). Para el receptor κ encontramos que el agonista U-50488 (trans \pm 3,4-Dicloro-N-Metil-N-(2-(1-pirrolidinil)ciclohexil)benzacetamida) (1nM a 10 μ M), produjo una potente inhibición de la descarga de las aferentes hasta del 95% con una CI_{50} de 40 nM, y el antagonista κ , Nor-binaltorfimina (10 nM a 100 μ M), incrementó hasta en un 200% la frecuencia de descarga de las fibras aferentes vestibulares con una CE_{50} de 5 μ M. La D-Pen-D-Pen encefalina (Tyr-D-Pen-Gly-Phe-Pen)-(Puente dilsulfuro 2-5) (1 nM a 10 mM) y el naltrindole (1 nM a 10 mM), agonista y antagonista del receptor δ respectivamente, no produjeron cambios sobre la descarga de las aferentes vestibulares.

Mediante la técnica de fijación de voltaje encontramos que las células ciliadas aisladas del vestíbulo del ajolote expresan corrientes similares a las descritas en las células ciliadas de la rana: una corriente lenta de salida tipo rectificador retardado, una corriente transitoria de salida tipo I_{kA} , una corriente de K^+ dependiente de Ca^{++} , una corriente rectificante de entrada, y una corriente de Ca^{++} probablemente de tipo L. Encontramos que el DAGO y la D-Pen-D-Pen encefalina carecen de efecto significativo sobre estas corrientes, en tanto que el U-50488 tiene un potente efecto inhibitorio sobre la corriente de Ca^{++} y sobre la corriente de K^+ dependiente de Ca^{++} .

En los experimentos de inmunohistoquímica, encontramos que los anticuerpos a dinorfina 1-8 marcan fibras en la base de los epitelios sensoriales. Los anticuerpos contra β -endorfina marcan fibras en la base del neuroepitelio sensorial, y a las células sensoriales en la parte basolateral. Los anticuerpos contra encefalina produjeron una marca difusa de todas las estructuras vestibulares.

La proencefalina y péptidos derivados de ella se determinaron por radioinmunoensayo usando anticuerpos específicos para sinencefalina, leu-encefalina y met-encefalina y cromatografía en gel. Para determinar la proporción entre precursores y moléculas libres de bajo peso molecular, los extractos de tejido fueron estudiados antes y después de digestión enzimática. No se encontró leu-encefalina libre en el vestíbulo, aunque sí precursores de alto peso molecular. La met-encefalina libre representó el 14% del total de las muestras ($= 6.71 \pm 0.30$ pmol / mg proteína). El contenido total de sinencefalina fue de 0.31 ± 0.01 pmol / mg proteína.

Estos resultados nos permiten concluir que péptidos opioides como dinorfina 1-8 y β -endorfina se encuentran presentes en las fibras que inervan los epitelios vestibulares y que estos péptidos tienen un importante papel en la determinación de la descarga de las aferentes vestibulares. Nuestros resultados indican que los receptores de tipo κ se localizan en las células ciliadas, donde ejercen un efecto inhibitorio sobre la corriente de Ca^{++} , modulando consecuentemente la liberación del neurotransmisor, en tanto que los receptores de tipo μ se localizan probablemente sobre las neuronas aferentes, donde ejercen un efecto excitador.

INTRODUCCIÓN

Generalidades.

Las células sensoriales del oído interno se encuentran formando parte de un neuroepitelio complejo compuesto por varias capas de células. Las células sensoriales, a las que en la *nomina anatomica* se les denomina *cellulas sensoriales pilosas*, en este trabajo las denominamos "células ciliadas" siguiendo lo que es el uso más frecuente en el idioma español. Estas células presentan en su región basolateral una rica inervación compuesta por fibras nerviosas que llevan (aférentes) y traen (eferentes) información al y del sistema nervioso central (Figura 1). En su porción apical estas células se caracterizan por presentar múltiples vellosidades en forma de cilios, los cuales, les confieren sus propiedades como mecanorreceptores (Ades y Engström, 1974; Mountcastle, 1981).

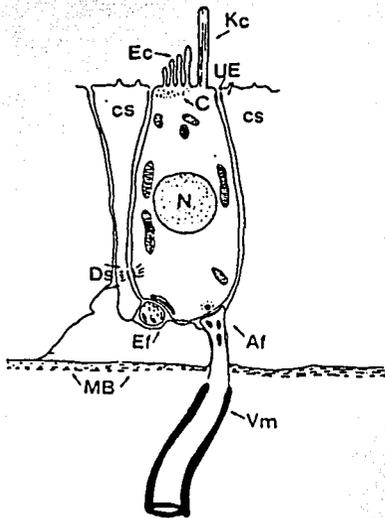


Figura 1. Esquema de la estructura e inervación de las células ciliadas. Las células ciliadas forman, junto con las células de soporte (cs), un neuroepitelio. Las células ciliadas (C) se caracterizan por presentar una serie de prolongaciones citoplasmáticas conocidas como estereocilios (Ec), de las cuales una, el kinocilio (Kc), es un cilio verdadero. Reciben una importante inervación por fibras aférentes (Af) y eferentes (Ef), las cuales hacen contacto sináptico en la porción basolateral del epitelio. UE, Unión estrecha; Ds, desmosoma; MB, membrana basal; N, núcleo y Vm, vaina de mielina (tomado de Popper y Coombs, 1980).

Las aceleraciones angulares, luego de un complejo proceso de acoplamiento mecánico producen un deflexión del haz de cilios en las células sensoriales, con la subsecuente alteración del potencial eléctrico de la célula. El desplazamiento del haz de cilios de una célula determina que se dispare una cascada de eventos que, finalmente, en función del estado previo del sistema y de la actividad del conjunto de las células sensoriales que componen una unidad funcional, determina que se active o inhiba una vía nerviosa. Las células ciliadas detectan las deflexiones del haz de cilios por un proceso conocido como transducción mecanoeléctrica convierten el

desplazamiento de sus pelos sensorios en un cambio de su potencial eléctrico. Desde el movimiento de los cilios hasta la transmisión del mensaje a la neurona aferente ocurren una serie de procesos que son: movimiento de los cilios, transducción mecanoeléctrica, generación del potencial receptorial en la célula sensorial, liberación de un transmisor químico y activación o inhibición de las neuronas aferentes (potencial generador) (Figura 2).

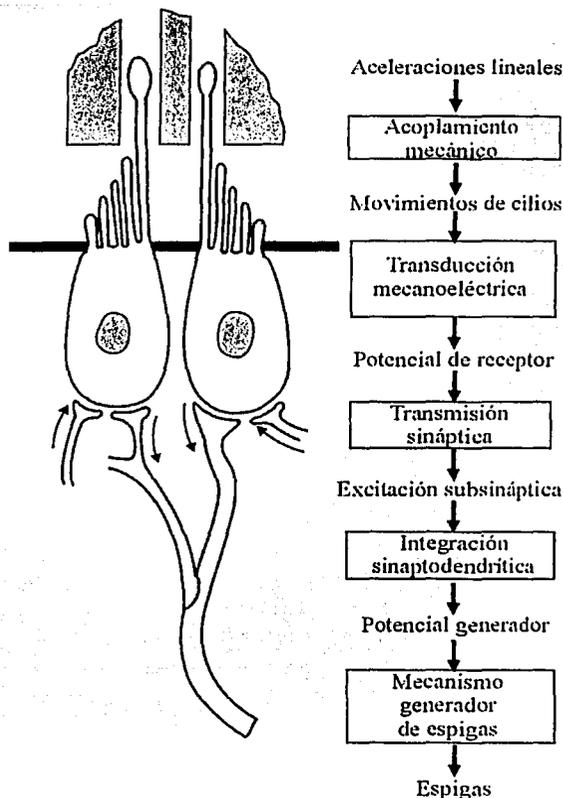


Figura 2. Esquema de la cascada de eventos que median la detección de aceleraciones en el sistema auditivo y vestibular. El proceso de acoplamiento mecánico convierte las aceleraciones en desplazamientos de los cilios, los cuales, determinan la activación del proceso de transducción mecanoeléctrica y, en interacción con canales iónicos, el potencial receptor. En función de este último se modifica la concentración de Ca^{++} intracelular, regulando la liberación de neurotransmisor y la subsecuente activación de la vía aferente.

Transducción mecanoeléctrica

El proceso de transducción en las células ciliadas ha sido objeto de un análisis intensivo en los últimos años (Hudspeth y Corey, 1977; Bracho y Budelli, 1978; Hudspeth, 1983; Ohmori, 1985, 1988 y 1989; Jorgensen y Ohmori, 1988; Assad y Corey, 1992; Pickles y Corey, 1992; Jaramillo y Hudspeth, 1993; Gillespie, 1995 y 1997; Géléoc y cols., 1997). El modelo actual de la transducción mecanoeléctrica se basa en el descubrimiento que en 1984 realizaron, Comis y

Osborne (Pickles y cols., 1984; Pickles y cols., 1989; Pickles 1991; Dunnebie y cols. 1995) Mediante el uso de microscopía electrónica de barrido, estos autores encontraron las uniones apicales (*tip links*) entre los cilios (Figura 3). Las uniones apicales son filamentos muy finos que unen el ápice de un cilio con la pared lateral del que le sigue en magnitud. Se ha encontrado que en el extremo de dichas uniones hay canales iónicos mecanosensibles –o canales mecanotransductores– que se activan por la tracción que ejerce la unión apical cuando los estereocilios se desplazan en dirección a los más grandes (Figura 4). Existen evidencias de que las uniones apicales se comportan, desde el punto de vista físico, como verdaderos resortes (Gillespie, 1995). Al desplazarse los cilios, las uniones apicales se tensan, induciendo así un rearrreglo molecular que lleva a la apertura de canales iónicos acoplados a ellas (Assad y Corey, 1992; Jaramillo, 1995).

Los canales iónicos que participan en la mecanotransducción son de tipo catiónico inespecífico. Utilizando marcadores fluorescentes del tipo del Fura-2 se ha logrado demostrar que existen canales que permiten el paso de Ca^{++} y de Mn^{++} (Ohmori, 1988). Por estimulación mecánica de células ciliadas aisladas del vestíbulo del pollo se ha podido demostrar que éstas muestran una mayor permeabilidad para cationes divalentes que para los monovalentes y que el Ca^{++} es el catión para el cual es más permeable el canal (Ohmori, 1985). Así, aunque la concentración de calcio es muy baja en la endolinfa (Sauer, Richter y Klinke, 1999), se ha

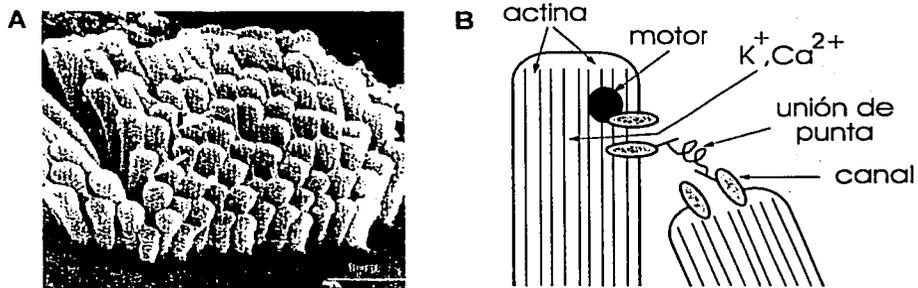


Figura 3. Uniones apicales (*tip links*) en las células ciliadas. En A, fotomicrografía electrónica de barrido de la unión apical (flechas) (Pickles y cols., 1984; Pickles y cols., 1989). En B, esquema que muestra el patrón característico de las uniones apicales de los estereocilios. La unión apical liga los canales iónicos mecanotransductores de la región apical con aquellos que se localizan en la pared lateral del siguiente cilio. Estos canales están acoplados a un motor molecular que les permite desplazarse.

demostrado que este ión acarrea del 15 al 20% de la corriente de transducción (Ricci y cols., 1998). La permeabilidad de los canales mecanotransductores a los cationes monovalentes en las células de la papila basilar de la tortuga es $P_{Na}: P_K: P_{Cs} = 1: 0.99: 0.79$ (Crawford y cols., 1991). Este canal es bloqueado por la estreptomomicina, la cual parece producir un bloqueo del canal abierto (Kroese y cols., 1989), y por la amilorida la cual produce un bloqueo dependiente de la dosis, pero independiente del voltaje (Jorgensen y Ohmori, 1988).

En el pollo, los canales que median la transducción mecanoeléctrica tienen una conductancia de alrededor de 50 pS a 30° C, y se activan con la deformación mecánica de los cilios (Ohmori, 1989). Trabajos en que se ha estudiado la corriente de transducción en células vestibulares (de sáculo y utrículo) y auditivas obtenidas de cultivos organotípicos de ratones neonatos, han permitido concluir que ambos tipos celulares tienen curvas similares de corriente contra rotación de los cilios (Géléoc y cols., 1997). Es importante destacar que en estudios en células ciliadas aisladas del oído tanto del pollo como de la tortuga, se ha encontrado que ante estimulación mecánica, la corriente de transducción tiene un decaimiento temporal (Figura 4) (Crawford y cols., 1989; Ricci y Fettiplace, 1998). Este proceso de adaptación se presenta con una constante de tiempo de 3-5 ms y es fuertemente dependiente de voltaje (Crawford y cols., 1989). La adaptación disminuye al cargar las células con 10 mM de BAPTA, que es un quelante de Ca^{++} , lo cual sugiere que el proceso de adaptación es dependiente de la entrada de Ca^{++} por los canales mecanosensibles que participan en la transducción (Ricci y cols., 1998).

Corrientes iónicas dependientes de voltaje descritas hasta ahora en células ciliadas.

Las células ciliadas del sistema vestibular presentan en su parte basolateral múltiples conductancias iónicas dependientes de voltaje, entre las cuales dominan las de K^+ y Ca^{++} (Figura 5). Hudspeth y Lewis fueron los primeros en reportar las corrientes iónicas en células ciliadas aisladas mediante la técnica de fijación de voltaje (Lewis y Hudspeth, 1983). Posteriormente, Ohmori (1984, 1985 y 1989) y los mismos Hudspeth y Lewis (1988a, b) ampliaron y difundieron las técnicas para el registro de corrientes iónicas en células ciliadas.

Anteriormente se había encontrado en estudios con microelectrodos, que los canales que determinan la transducción en las células ciliadas se ubican en la región apical de las células ciliadas, y que las curvas corriente-voltaje eran de tipo no lineal (Hudspeth y Corey, 1977). Actualmente, se sabe que las células ciliadas presentan una corriente lenta de Ca^{++} , una corriente

de K^+ dependiente de Ca^{++} y una corriente transitoria de K^+ (Hille, 1984).

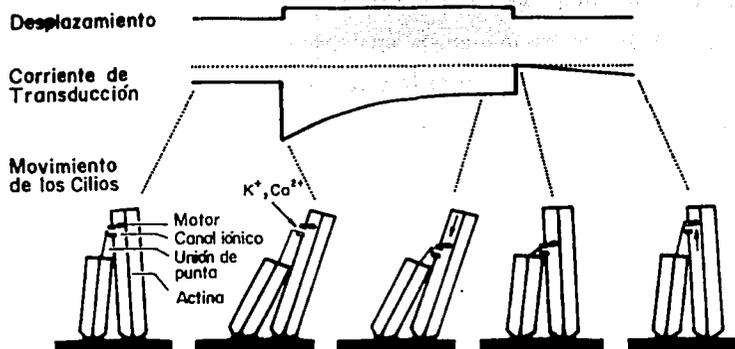


Figura 4. Adaptación del sistema de transducción. Los canales mecanotransductores están acoplados a un motor molecular cuya activación es dependiente de Ca^{++} . Dicho motor molecular puede descender por la pared del cilio cuando aumenta el Ca^{++} intracelular. Cuando la concentración de Ca^{++} intracelular decrece, el motor tiende a desplazarse a la parte superior del cilio debido a un sistema de tensión generado por un conjunto de proteínas que lo mantienen unido al citoesqueleto celular. En el esquema se muestra cómo un desplazamiento produce la apertura de los canales mecanotransductores, lo cual aparece como un aumento en la corriente de transducción. Posteriormente, esta corriente decae debido a que el motor molecular se desplaza hacia abajo en el cilio gracias a la entrada de Ca^{++} . Cuando los cilios vuelven a su posición, el motor molecular asciende nuevamente en el cilio porque existe un elemento elástico que lo tira hacia arriba. (Modificado de Gillespie, 1997).

Rectificador retardado g_{KDR} : el rectificador retardado fué descrito en las células del sáculo de la rana por Lewis y Hudspeth en 1983. Esta corriente se encuentra presente prácticamente en todos los tipos de células ciliadas hasta ahora estudiadas (Lewis y Hudspeth, 1983). La activación de g_{KDR} tiene una forma sigmoidea relativamente lenta, cerca de 50-60 ms a 20°C en el sáculo de la *Rana esculenta* (Russo y cols., 1996). Esta corriente, que clásicamente se ha descrito como no inactivante, presenta un componente con una lenta inactivación para pulsos largos de alrededor de 15 s o mayores. La inactivación puede ajustarse por dos exponenciales, una con $\tau = 291.3$ ms y la otra con $\tau = 2622$ ms (Russo y cols., 1996). El estudio de la inactivación de estado estable de la corriente demostró que se ajusta a una ecuación de Boltzman con una $V_{1/2} = -86$ mV y $S = 7.4$. Todos estos resultados indican un proceso de inactivación lento de tipo C. La idea es, entonces, que existe una parte de g_{KDR} que se inactiva muy lentamente y otra que no se inactiva.

En el utrículo del ratón se ha descrito una diferencia en la cinética de la g_{KDR} entre las células ciliadas tipo I y las tipo II, por lo que se distinguen como $g_{KDR,I}$ y $g_{KDR,II}$. Aparentemente, la $g_{KDR,II}$ es más rápida, con una τ de activación de 17.1 ± 6.9 ms, en tanto $g_{KDR,I}$ tiene una τ de 44.2 ± 8.3 ms; ambas para pulsos que van de -64 a -44 mV (Rüsch y cols., 1998). Estos mismos autores reportan que la $g_{KDR,II}$ es más sensible a la 4-amino piridina (4-AP) con una K_D de $80 \mu M$, en tanto $g_{KDR,I}$ tiene una K_D de $1 mM$ ¹. Igualmente, en el sáculo de la rana, se ha encontrado que el rectificador lento es sensible a la 4-AP $1 mM$ (Armstrong y Roberts, 1998) (ver tabla I).

Corriente transitoria de salida g_{KA} : se trata de una corriente análoga a la corriente tipo A descrita por Connors y Stevens en las neuronas de molusco (Connors y Stevens, 1971 a, b). En las células del sáculo de la *Rana catesbiana* esta corriente se activa por pulsos de voltaje que llevan el potencial a valores positivos mayores de -50 mV a partir de potenciales de retención de -70 mV (Hudspeth y Lewis, 1988a). Desde el punto de vista farmacológico, es más sensible a la 4-AP que al tetratilamonio (TEA). g_{KA} es muy prominente en algunas células ciliadas en las cuales domina completamente la corriente total. Su bloqueo farmacológico no parece influir sobre la resonancia eléctrica de las células aisladas (Hudspeth y Lewis, 1988b). Se ha encontrado en las células ciliadas de peces, anfibios, aves y mamíferos (Steinacker y cols., 1997; Lewis y Hudspeth, 1983; Norris y cols., 1992; Masetto y cols., 2000; Rennie y Ashmore, 1991). Su activación tiene una cinética bastante rápida; se ha propuesto un modelo de dos estados



Norris y cols (1992) han descrito dos tipos de I_{KA} en las células de los canales semicirculares de la rana, una que se inactiva en forma rápida con $\tau = 4.4$ ms y otra lenta con $\tau = 36.4$ ms, ambas con $V_{1/2} = -2$ mV, pero con inactivación de estado estable completamente diferente: $V_{1/2} -59 \pm 1$ mV y $S = 7.8$ para las rápidas y $V_{1/2} -95 \pm 0.5$ mV y $S = 13.4$ para las lentas. Sin embargo, en su trabajo no aislan la corriente I_A de otras corrientes. Por ejemplo, no mencionan la I_{KCa} ni la I_{Ca} y únicamente sustituyeron Mg^{++} por Ca^{++} para bloquearlas, razón por la cual, aunque muestran corrientes con una cinética y propiedades farmacológicas semejantes a la I_A , quedan dudas acerca de la presencia de otras corrientes (ver tabla I).

¹ En relación a los valores de la K_D para la 4-AP en las corrientes $g_{KDR,I}$ y $g_{KDR,II}$ los autores reportan unidades erróneas en la tabla I, donde valores micromolares fueron sustituidos por valores milimolares (Rüsch y cols., 1998).

En los canales semicirculares de la rana, las células que se ubican en la periferia de la cresta muestran una mayor proporción de corriente tipo A que las de la parte central, ambas tienen proporciones semejantes de $g_{K,Ca}$ y en las células centrales predomina la $g_{K,DR}$ (Masetto y cols., 1994).

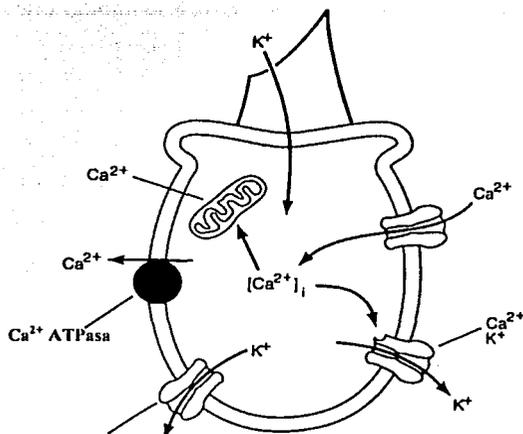
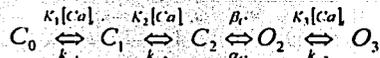


Figura 5. Corrientes iónicas en células ciliadas. Este tipo de células están dominadas por corrientes de K^+ que son las de mayor magnitud. En su polo basal presentan también una corriente de Ca^{2+} así como transportadores de Ca^{2+} (Tomado de Hudspeth, 1983).

Corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} $g_{K,Ca}$: esta corriente ($I_{K,Ca}$) se activa a potenciales más positivos que -60 o -50 mV. Muestra una importante dependencia del voltaje incrementando e veces por cada 3 mV de cambio de voltaje entre los -50 y -40 mV; tiene una conductancia de entre 140 a 200 pS y en células ciliadas del vestibulo del pollo es bloqueada por la quinina (Ohmori, 1984). Su activación es sumamente rápida con un pico inicial y una inactivación parcial a un nivel estacionario tanto en anfibios como en mamíferos (Masetto y cols., 1994; Armstrong y Roberts, 1998; Rennie y cols., 1996). Originalmente Hudspeth y Lewis, trabajando en el sáculo de la rana (1988a), propusieron para los canales que median esta corriente un modelo con 5 estados, tres cerrados y dos abiertos:



Las primeras dos transiciones, así como la cuarta, son dependientes de Ca^{2+} . Se ha encontrado que la corriente $I_{K,Ca}$ se produce por canales de tipo BK (*Big K*), que se encuentran en el sáculo de la rana acoplados con los canales de Ca^{2+} (Roberts, Jacobs y Hudspeth, 1990; Howard y cols., 1988) y participan de manera fundamental en el proceso de sintonización eléctrica de las células

ciliadas de la coclea (Crawford y Fettiplace, 1980; Fettiplace y Fuchs, 1999). La subunidad α de estos canales es codificada por genes de la familia *slo*, y parece que gracias a la ocurrencia de corte alternativo, se pueden modificar significativamente la cinética y la sensibilidad al Ca^{++} de esta corriente. Por otra parte, la presencia de diferentes tipos de subunidades β también puede modificar la cinética y la sensibilidad al Ca^{++} de la $I_{K, \text{Ca}}$. Estas diferencias cinéticas de la corriente parecen tener un importante papel funcional en la frecuencia de resonancia eléctrica de las células ciliadas. En la coclea de las aves en términos generales, se encuentra que una cinética más lenta se asocia con una mayor sensibilidad al Ca^{++} intracelular (Ramanathan y cols., 2000; Fettiplace y Fuchs, 1999).

La corriente $I_{K, \text{Ca}}$ en el sáculo de la rana, es particularmente sensible a la iberiotoxina en el rango nM y también al TEA mM y parece insensible a la 4-AP (Armstrong y Roberts, 1998).

Existen evidencias en las células ciliadas aisladas del vestíbulo de la tortuga (Tucker y Fettiplace, 1996) y en las células ciliadas saculares de la rana (Armstrong y Roberts, 1998), que sugieren la presencia de canales de K^+ activados por Ca^{++} del tipo SK (*Small K*), los cuales aparentemente no son bloqueados con Cs^+ intracelular y aparecen como una pequeña corriente saliente que recorta la corriente entrante de Ca^{++} (única evidente cuando se sustituye el K^+ intracelular por Cs^+). Cuando el K^+ se sustituye por otro catión de mayor tamaño como la N-metil-D-glucamina (NMDG), el pico inicial de la corriente desaparece, indicando que es acarreado por el Cs^+ que fluye por los canales de K^+ tipo SK (Tucker y Fettiplace, 1996; Armstrong y Roberts, 1998) (ver tabla I).

Corriente de Ca^{++} activada por voltaje g_{Ca} : esta corriente de Ca^{++} en células ciliadas fué originalmente registrada en el sáculo de la rana por Hudspeth y Lewis (1988a, b), quienes encontraron que se activa a potenciales mayores a -50 mV, alcanzando su máximo a -10 mV. Aunque en experimentos en células aisladas de la coclea del pollo muestra una tendencia a disminuir en amplitud a lo largo de los experimentos (Ohmori, 1984 y 1985) no sufre inactivación. La corriente tiene una cinética de tercer orden:

$$I_{\text{Ca}} = g_{\text{Ca}} m^3 (V_{\text{mem}} - E_{\text{Ca}})$$

en donde g_{Ca} es la máxima conductancia al Ca^{++} y m es el parámetro de activación dependiente de tiempo (Hudspeth y Lewis, 1988a, b).

Estudios posteriores, demostraron que los canales de Ca^{++} en las células ciliadas de la papila basilar del pollo son del tipo L, que se bloquean con nifedipina $10 \mu\text{M}$ y que la corriente aumenta hasta 6 veces a -30 mV en presencia de $5 \mu\text{M}$ de BayK 8644 (Fuchs y cols., 1990). Estos canales tienen una cinética extraordinariamente rápida, dependiente de voltaje, que a -10 mV tiene una $\tau = 0.346 \pm 0.123 \text{ ms}$. Su activación media ocurre alrededor de los -10 mV . Existen evidencias funcionales de que los canales tipo L son los directamente acoplados a la liberación de neurotransmisor (Bobbin y cols., 1990; Fuchs, 1996; Soto, 1995; Perin, 2000). En la *Rana pipiens* se ha demostrado mediante técnicas de patch clamp y de microscopía confocal que, al menos en las células que presentan resonancia eléctrica, los canales de K^+ dependientes de Ca^{++} y las regiones donde se localiza el cuerpo sináptico se encuentran físicamente acoplados formando una unidad (Issa y Hudspeth, 1994). En las células ciliadas del sáculo de la rana se ha calculado que estos grupos funcionales están formados por alrededor de 40 canales de K^+ dependientes de Ca^{++} y 90 canales de Ca^{++} (Roberts, 1993). En la papila basilar del pollo se encuentra una clara correlación entre la magnitud de la corriente de Ca^{++} tipo L y la densidad en la inervación aferente en las células ciliadas (Martínez Dunst y cols., 1997). Estudios inmunohistoquímicos en los canales semicirculares de la chinchilla han demostrado que, de los 8 genes que codifican para la subunidad $\alpha 1$ del canal de Ca^{++} , los que corresponden a las subunidades tipo $\alpha 1\text{B}$ (tipo N), $\alpha 1\text{C}$ y $\alpha 1\text{D}$ (tipo L) se localizan en las células ciliadas, y los tipo $\alpha 1\text{B}$ y $\alpha 1\text{C}$ se encuentran también en las neuronas en el ganglio de Scarpa (López y cols., 1999). Estos datos sugieren que las células ciliadas, al igual que las neuronas aferentes, tienen canales de Ca^{++} activados por voltaje de los tipos L y N principalmente. Recientemente, Armstrong y Roberts (1998) han descrito una cinética más rápida y una activación a voltajes más negativos para los canales de Ca^{++} en el sáculo de la rana.

En condiciones de registro de canal único, en las células del sáculo de la rana se ha descrito la existencia de dos tipos de canales de Ca^{++} , unos con una conductancia de 26 pS , sensibles a dihidropiridinas, que se activan con alto umbral (probablemente de tipo L), y otro grupo de canales de 20 pS , que se activan a valores de potencial más negativos (-40 mV) y son insensibles a dihidropiridinas, por lo que los autores sugieren que se trata de canales de tipo N (Su y cols., 1995). Se ha encontrado también que existe una corriente de Ca^{++} sensible a ω -conotoxina en las células ciliadas de la papila auditiva y del vestíbulo de la rana (Perin y cols., 1998). En la actualidad no se conoce con precisión el papel funcional de esta corriente no L; sin embargo,

estudios en los canales semicirculares de la rana demuestran que las conotoxinas sólo son capaces de disminuir la actividad aferente en un 10%, por lo que es probable que su papel sea muy limitado (Soto, 1995; Perin, 2000) (ver tabla I).

Corriente rectificante de entrada g_h : esta corriente tiene una importante permeabilidad a los iones de Na^+ , lo cual se refleja en su potencial de inversión de alrededor de -43.5 ± 1.8 mV; la relación de permeabilidad P_{Na}/P_K es de 0.14, calculada a partir del potencial de inversión. Tiene una $V_{1/2}$ de -101 ± 5 mV con una pendiente S de 7.8 ± 1.2 y una G_{max} de 1.3 ± 1 nS y fue descrita por primera vez células ciliadas aisladas del utrículo del ratón (Rüsch, Lysakowski y Eatock, 1998). Se ha encontrado que su activación y desactivación son de tipo sigmoide. Con base en el potencial de equilibrio reportado (sáculo de rana) por Holt y Eatock (1995) para la g_h (≈ -45 mV) y con base en la ecuación de Goldman se obtiene que $P_{Na}/P_K \approx 0.16$ cuando las concentraciones son como las reportadas por Rüsch y Eatock (1996a) en el ratón (5.8 mM de K^+ externo). La g_h se bloquea con Cd^{++} 2 mM en tanto que el Cd^{++} no parece afectar a g_{K1} ; el Cs^+ extracelular también la bloquea eficazmente (Holt y Eatock, 1995). En la rata, la activación de g_h fue ajustada con una ecuación de Boltzman con $V_{1/2} = -90$ mV, $s = 9.6$, $G_{Max} = 7.3$ nS y $G_{Min} = 1.0$ nS (ver tabla I).

Corriente rectificante de entrada g_{K1} : es una corriente altamente selectiva al K^+ . Tiene una activación de tipo monoexponencial cuya τ depende de voltaje (entre 1 y 6 ms) y una desactivación monoexponencial para voltajes inferiores al de inversión y biexponencial para voltajes mayores. La activación de esta corriente ajusta con una ecuación de Boltzman con

$$G(V) = \frac{G_{Max} - G_{Min}}{1 + e^{(V - V_{1/2})/s}} + G_{Min}$$

los siguientes parámetros $V_{1/2} = -86$ mV, $S = 5.2$, $G_{max} = 25.9$ nS y $G_{min} = 5.7$ nS válidos para $[K]$ extracelular de 5 mM. La $V_{1/2}$ de esta corriente se desplaza a valores más positivos con el aumento de la concentración extracelular de K^+ . La g_{K1} se bloquea en forma dependiente de voltaje con Cs^+ extracelular (5 mM producen un bloqueo prácticamente total de la corriente). También con Ba^{++} 500 μ M a 1 mM se bloquea casi en su totalidad; el uso de Cd^{++} o de Ba^{++} permite ver selectivamente g_{K1} o g_h . Ambas corrientes son bloqueadas por Cs^+ (Rüsch, Lysakowski y Eatock, 1998) (ver tabla I).

Corriente rectificadora lenta de bajo umbral $g_{K,L}$: se ha encontrado exclusivamente en células ciliadas tipo I. Fue descrita originalmente en las células ciliadas de los canales semicirculares del pichón como una corriente parecida a la tipo M (Correia y Lang, 1990) y posteriormente se reportó en los canales semicirculares del cobayo (Rennie y Ashmore, 1991). Se ha caracterizado de forma muy precisa en las células ciliadas tipo I del utrículo de ratón (Rüsch y Eatock, 1996b). La $g_{K,L}$ no se encuentra en las células ciliadas de los canales semicirculares del ajolote (células ciliadas tipo II). Tiene un potencial de inversión de -57 mV y es altamente selectiva al K^+ con una relación de permeabilidades $P_{Na^+}/P_{K^+} = 0.006$ y $P_{Cs^+}/P_{K^+} = 0.31$ (Rüsch y Eatock, 1996b). Es eficazmente bloqueada por la 4-AP con una K_D de 43 ± 6 μ M. Rennie y Correia (1994) encuentran que, en el jerbillo, 5 mM de 4-AP bloquean la corriente. También fue bloqueada por el Ba^{++} con una $K_D = 2 \pm 0.3$ mM y por Ni^{++} 5 mM. Tanto el 4-AP como el TEA también bloquean la g_{KDR} que, para potenciales mayores de -55 mV, se entrecruza con $g_{K,L}$.

La $V_{1/2}$ de $g_{K,L}$ presenta un desplazamiento a la derecha en la curva I/V cuando se hace registro de corriente en condiciones de fijación de voltaje de célula completa, hecho que sugiere que un factor soluble del citoplasma modula de alguna forma estos canales (Hurley y Eatock, 1999).

En las células cocleares externas se ha descrito una corriente análoga a $g_{K,L}$, la cual es dominante en las células de la región basal y se activa a potenciales entre -90 y -50 mV (Nakagawa y cols., 1994). Se le ha denominado $g_{K,N}$ y tiene una influencia importante en el seguimiento de frecuencias por las células cocleares externas, ya que aunada con la disminución en tamaño de las células del ápice a la base, determinan un cambio notable de la constante de tiempo de la célula, y consecuentemente, en su capacidad para seguir altas frecuencias (Fettiplace y Fuchs, 1999) (ver tabla I).

Tanto $g_{K,L}$ como $g_{K,N}$ tienen un papel funcional destacado en la respuesta de las células ciliadas y en la generación del potencial receptor, ya que debido al hecho de que a potenciales muy negativos el 50% de la corriente está activa, entonces determinan una notable disminución en la resistencia de entrada y en la ganancia global de la célula (Soto y cols., 2001). Tabla I. Corrientes iónicas dependientes de voltaje en células ciliadas.

Tabla I

Corriente	Tipo de célula	Organo	Animal
$I_{K,L}$	I	CSC Utrículo.	Paloma ^{1,5} , jerbillo ² Ratón ³ , rata ⁴
$I_{K,DR}$	I, II	Utrículo CSC Sáculo	Ratón ^{3,6} Pollo ⁷ , rana ⁸ , paloma ^{1,9} , cobayo ¹⁰ , axolotl ¹¹ Pez dorado ¹² Rana ^{20,21}
$I_{K,l}$	I, II	Sáculo P. Amph. CSC	Rana ¹³ , pez dorado ¹² Rana ¹⁴ Pollo ⁷ , rana ^{8,15,16}
$I_{K,h}$	I, II	Sáculo P. Amph. CSC	Rana ¹³ , pez dorado ¹² Rana ¹⁴ Pollo ⁷
$I_{K,A}$	I, II	CSC P. Amph. Sáculo	Rana ^{8,17,18,22} , paloma ^{1,9} , cobayo ¹⁰ , pollo ⁷ , axolotl ¹¹ Rana ¹⁴ Rana ¹⁸
$I_{K,Ca}$	I, II	Sáculo CSC	Rana ^{18,19} , pez dorado ¹² Paloma ^{1,9} , cobayo ¹⁰
I_{Ca}	I, II	Sáculo P. Amph.	Rana ^{18,19} , pez dorado ¹² Pollo ⁷ , rana ¹⁴

¹Correia y Lang, 1990; ²Rennie y cols., 1996; ³Rüsh y cols., 1998; ⁴Eatock y Hutzler, 1992; ⁵Rennie y Correia, 1994; ⁶Holt y cols., 1999; ⁷Masetto y cols., 1998; ⁸Masetto y cols., 1994; ⁹Masetto y Correia, 1997; ¹⁰Rennie y Ashmore, 1991; ¹¹Vega, 2000; ¹²Sugihara y Furukawa, 1989; ¹³Holt y Eatock, 1995; ¹⁴Smotherman y Narins, 1999; ¹⁵Marcotti y cols., 1999; ¹⁶Masetto y cols., 1999; ¹⁷Ricci y cols., 1994; ¹⁸Hudspeth y Lewis, 1988 a,b; ¹⁹Lewis y Hudspeth, 1983; ²⁰Russo y cols., 1996; ²¹Armstrong y Roberts, 1998; ²²Norris y cols., 1992

Potencial receptor en la célula ciliada

El flujo de cationes (K^+ y Ca^{++}) a través de los canales mecanotransductores produce un cambio en el potencial de membrana de la célula ciliada. Cuando los cilios se flexionan en la dirección excitadora (es decir, en dirección a los estereocilios de mayor tamaño), aumenta la tensión de las uniones apicales y, consecuentemente, se abren los canales mecanotransductores, despolarizando a la célula. En el caso contrario, se produce una hiperpolarización, esto es, una inhibición de la célula. La capacidad de las células ciliadas para responder diferencialmente a los desplazamientos de los cilios en una u otra dirección ha dado origen al concepto de polarización

funcional de las células ciliadas, el cual tiene gran importancia en la fisiología vestibular. Ante un estímulo excitador, la entrada de iones potasio despolariza a la célula ciliada en la región apical; ello determina que, en la región basolateral de la célula, se abran canales iónicos de potasio sensibles al voltaje. Debido a que la concentración de potasio en la perilinfa es baja y no alta como en la endolinfa, el gradiente electroquímico del potasio hace que este ión tienda a salir y no a entrar al interior celular, como sucede en el caso de la mecanotransducción que se realiza del lado endolinfático. De esta forma, cuando el potasio sale por los canales iónicos de la membrana basolateral, la célula se repolariza retornando al nivel de reposo. Con un estímulo inhibitorio, en el que los cilios se dirigen en dirección contraria al de mayor tamaño, los canales mecanotransductores se cierran y la célula se hiperpolariza, disminuyendo la permeabilidad basolateral al potasio, con lo que el potencial de membrana de la célula retorna a los niveles de reposo.

El potencial de membrana de las células ciliadas puede calcularse con precisión si se conoce la composición del medio intracelular y de la endolinfa y la perilinfa, además de conocer las permeabilidades de la membrana a los diferentes iones (Hudspeth, 1983; Hudspeth y Lewis, 1988a y b; Rüsck y Eatock, 1996b; Rüsck y cols., 1998). Asumiendo que todas las permeabilidades dependientes de voltaje están en la región basolateral (perilinfática), y que la corriente de transducción ocurre en la región apical (endolinfática), y considerando que la relación entre la permeabilidad al Na^+ respecto a la del K^+ en los canales mecanotransductores es de 1.04 (Ohmori, 1985), hemos derivado una ecuación que es una modificación de la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz, que permite calcular el potencial de membrana para estas células que confrontan dos medios iónicos diferentes:

$$e^{\frac{V_f}{RT}} = \frac{P_c ([K]_c + [Na]_c / 1.04) + P_p ([K]_p + b[Na]_p) + P_{hNa} [Na]_p}{[Na]_i (P_c + b P_p) + [K]_i (1.04 \cdot P_c + P_p)}$$

donde $P_p = P_{KL} + P_{DR} + P_{hK}$, es la permeabilidad basolateral total al potasio; P_c es la permeabilidad de los canales mecanotransductores al K^+ ; P_p es la permeabilidad perilinfática al K^+ ; P_{hNa} , es la permeabilidad al Na^+ del canal rectificante de entrada I_h y, b es la relación de permeabilidades a K^+ y Na^+ en la membrana basolateral de la célula. Mediante algunas simplificaciones y consideraciones adicionales, esta ecuación nos da una relación implícita entre

el potencial de membrana (V) y la posición de los cilios en las células ciliadas. Hemos desarrollado un programa iterativo en Matlab™ que calcula esta función.

Con base en esta ecuación y usando los datos obtenidos por Géléoc y cols. (1997) y Rüsck y Eatock (1996a) en ratas neonatas, hemos construido las curvas teóricas de movimiento de los cilios *versus* potencial receptor para las células ciliadas cuando se encuentran ubicadas en el epitelio vestibular y enfrentan dos medios de diferente composición iónica, la endolinfa y la perilinf. De acuerdo con esto encontramos que las células ciliadas tipo II producen potenciales de hasta 30 mV ante desplazamientos máximos del haz de cilios. Estos cambios de voltaje son claramente suficientes para activar la liberación de neurotransmisor que, se ha demostrado, es dependiente de Ca^{++} .

Potencial generador en la neurona aferente

En su forma más general, la información que llega a la neurona aferente en forma de potenciales sinápticos, es igual a la conductancia de la sinapsis, que es una conductancia que varía con el tiempo, de donde (Yamada, Koch y Adams, 1989):

$$I_{syn} = g_{syn}(t) \cdot (V - E_{syn})$$

La variación en el tiempo de la conductancia sináptica se puede modelar por la siguiente función:

$$g_{syn}(t) = const \cdot t \cdot \exp^{-t/\tau_{pico}}$$

donde la τ_{pico} es de alrededor de 2.5 ms, tiempo al cual la conductancia sináptica alcanza su máximo valor. Esta conductancia sináptica debida a la activación de corrientes iónicas activadas por ligandos, en interacción con las corrientes iónicas dependientes de voltaje de la terminal de la neurona aferente, determina las propiedades del potencial generador. En las neuronas aferentes vestibulares del ajolote se han encontrado las siguientes conductancias: una corriente de Na^+ dependiente de voltaje (g_{Na}), una corriente saliente de K^+ de tipo transitorio ($g_{K,A}$), una corriente saliente de K^+ que no se inactiva ($g_{K,DR}$) (Soto y cols., 1998).

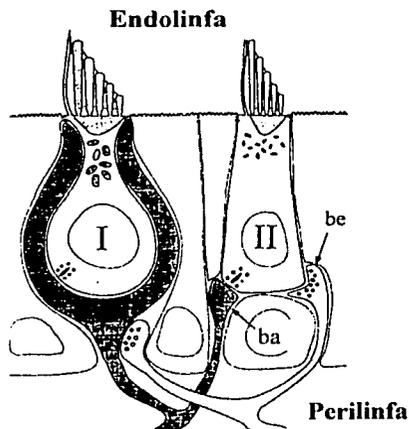


Figura 6. Células ciliadas tipos I y II. Puede observarse que las células ciliadas tipo I tienen forma de ánfora y están rodeadas completamente por el cáliz de una terminal aferente. Las células ciliadas tipo II son más cilíndricas y reciben terminales aferentes (ba) y eferentes (be) en botón. Ambos tipos de terminales aferentes presentan un cuerpo sináptico, cuya función se desconoce (tomado de Eatock y Rush, 1997).

Transmisión sináptica en el sistema vestibular

Desde el punto de vista morfológico se distinguen dos tipos de células ciliadas en el vestíbulo de los vertebrados superiores. Las diferencias fundamentales entre ellas se ubican a nivel de la sinapsis, las células ciliadas tipo II se encuentran presentes en los animales evolutivamente inferiores, las de tipo I aparecen en los vertebrados superiores, específicamente en los amniotes (Figura 6). En la actualidad se puede afirmar que la sinapsis entre las células ciliadas tipo II y las neuronas aferentes es de tipo químico, ya que existen todos los elementos morfológicos como son la existencia de un espacio sináptico de al menos 70 Å, el engrosamiento postsináptico, la presencia de un cuerpo sináptico rodeado de vesículas en la célula ciliada; aunado a estos



Figura 7. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de una sinapsis aferente en el oído interno del ajolote. Se observan dos sinapsis aferentes, caracterizadas por el cuerpo sináptico (flechas). Esta es una estructura electrodensa, rodeada de vesículas. Se observa también el engrosamiento postsináptico y una terminal eferente (E), que posiblemente hace sinapsis con una terminal aferente (flecha corta). Af, neurona aferente; m, mitocondrias; mt, microtúbulos (Foto Soto y Cols., 1994).

criterios morfológicos se ha reportado la desaparición de la descarga basal en las fibras aferentes que inervan a las células tipo II en ausencia de calcio extracelular (Wersall, 1956; Smith y Sjöstrand, 1961; Ades y Engström, 1965, 1974; Wersall y Bagger-Sjöback, 1974; Del Castillo y Katz, 1954; Furukawa y cols., 1972, 1982; Rossi y cols., 1980; Pérez y cols., 1991; Fuchs, 1996). Por otro lado, la sinapsis en la célula tipo I no corresponde a los criterios morfológicos que definen una sinapsis química. Aunque existen vesículas en la región presináptica de las células tipo I, y una barra sináptica en torno a la cual se agrupan las 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 ciliada y la terminal aferente, ya que esta última cubre prácticamente toda la superficie basolateral de la célula ciliada (Gulley y Reese, 1977; Gulley y Bagger-Sjöback, 1979; Engström y Engström, 1981). En los anfibios, y en particular en el ajolote (*Ambystoma tigrinum*), que es el animal en que realizamos nuestro trabajo de investigación, existen únicamente células de tipo II. La sinapsis aferente en estas células muestra un cuerpo presináptico rodeado por vesículas y un engrosamiento de la terminal postsináptica (Figura 7). La sinapsis eferente se caracteriza por tener múltiples vesículas en la dendrita presináptica, un claro engrosamiento y una cisterna postsináptica (Figura 8).

Las fibras, tanto aferentes como eferentes, forman la porción vestibular del VIII par craneal. Las fibras aferentes vestibulares son dendritas de las células que forman el ganglio de Scarpa y su axon se dirigen al tallo cerebral estableciendo sinapsis con los núcleos vestibulares superior, lateral, medio y descendente, distribuyéndose en ellos de manera heterogénea (los cuerpos celulares de las neuronas vestibulares bipolares se encuentran en el ganglio de Scarpa). La innervación vestibular eferente central en los anfibios tiene su origen en el núcleo reticular medial (Strutz y cols., 1982).

En los humanos, el nervio vestibular está constituido por 14,200-24,000 fibras de las cuales 88.5% tienen un grosor de 2-9 μm , 7.2% de 8-13 μm y 4.2% menos de 2 μm (Wersäll y Bagger-Sjöback, 1974). En el mono araña, el ganglio vestibular cuenta con 12,412 cuerpos neuronales cuya área se encuentran entre 200-650 μm^2 , el nervio vestibular está constituido por 12,005 fibras mielinizadas con un área de sección de 3-11 μm , y un 0.7% de las fibras amielínicas (Fermin y Igarashi, 1987). En el sapo el nervio vestibular está formado por 5815 \pm 765 fibras mielinizadas; sus diámetros se encuentran entre 1-11 μm . De estas fibras, 2059 \pm 330 inervan al utrículo, 1263

± 321 al sáculo y 2317 ± 349 a los canales semicirculares (Honrubia y cols., 1984). En el ajolote, el nervio vestibular está formado por 2392 ± 540 axones, de los cuales 943 ± 373 inervan al utrículo, 211 ± 43 inervan al canal anterior, 289 ± 19 al canal lateral, 236 ± 19 al canal posterior, 452 ± 36 a la lagena y 262 ± 51 a las papilas basilar y amfibiana (Cruz, 1994).

Las fibras eferentes se originan principalmente en la oliva superior en los mamíferos y en la formación reticular del romboencéfalo en los urodelos. Las fibras eferentes de la paloma, el ajolote, la salamandra y algunos peces, pueden inervar a los dos vestíbulos en forma ipsilateral o contralateral (Fritzsich, 1981 y 1996; Fritzsich y Crapon de Caprona, 1984). Su función puede relacionarse con el control de la actividad aferente sensorial, la cual ejercen modulando la sensibilidad de las células receptoras. Las fibras eferentes hacen sinapsis directamente con las células ciliadas tipo II así como con las aferentes que inervan a las células tipo I. El efecto producido por la activación de las vías eferentes es muy distinto en uno y otro caso, ya que en las células tipo II las vías eferentes producen un efecto presináptico, modulando la liberación del neurotransmisor de la célula ciliada. En el caso de las células tipo I, el efecto es sobre la fibra aferente, ejerciendo entonces una influencia postsináptica (Goldberg y Fernández, 1984; Soto, 1988; Anniko, 1988;).

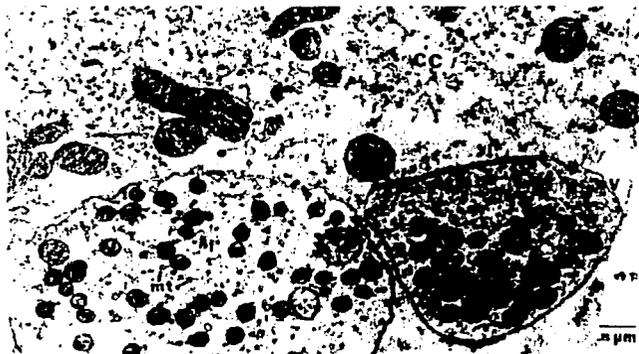


Figura 8. Micrografía de la sinapsis eferente en el oído interno del ajolote. La terminal eferente (E) presenta numerosas vesículas (V). En la célula ciliada (CC) que forma la terminal postsináptica se observa una cisterna subsináptica (flechas). En una neurona aferente (Af), se distinguen microtúbulos (Mt) y mitocondrias (m) (Foto Soto y Cols., 1994).

Acoplamiento potencial receptor - liberación de neurotransmisor

La sinapsis aferente tiene propiedades peculiares, ya que la liberación del neurotransmisor se produce de forma continua, y la estimulación de las células ciliadas aumenta o disminuye la cantidad de transmisor liberado. Las neuronas aferentes presentan entonces una descarga basal (mal llamada en muchos textos descarga espontánea). La capacidad de las células ciliadas para

liberar continuamente neurotransmisor es una función que se relaciona con el papel del cuerpo sináptico y con la ausencia de la proteína sinapsina (Scarfone y cols., 1991). Se ha propuesto que las vesículas sinápticas “maduran” en interacción con el cuerpo sináptico y, a diferencia de otras sinapsis, son liberadas sin antes pasar por un proceso de anclaje al citoesqueleto –dependiente de sinapsina– (Fuchs, 1996). Cabe destacar que no existen trabajos que hayan demostrado que la liberación de neurotransmisor en esta sinapsis se comporte de forma cuántica (Simmons, 1999), es decir, de forma semejante a la sinapsis neuromuscular. De hecho, se ha propuesto que los distintos sitios de liberación tienen diferente sensibilidad al voltaje (Furukawa y cols., 1972; Furukawa y cols., 1982). Tampoco se conocen con precisión los mecanismos de llenado de vesículas, las cuales se sabe que se reciclan a velocidades extraordinariamente rápidas, ya que mediciones del cambio de la capacitancia de la membrana sugieren que se pueden fusionar hasta 4,000 vesículas por segundo (Roberts, 1993 y 1994; Lenzi y cols, 1999).

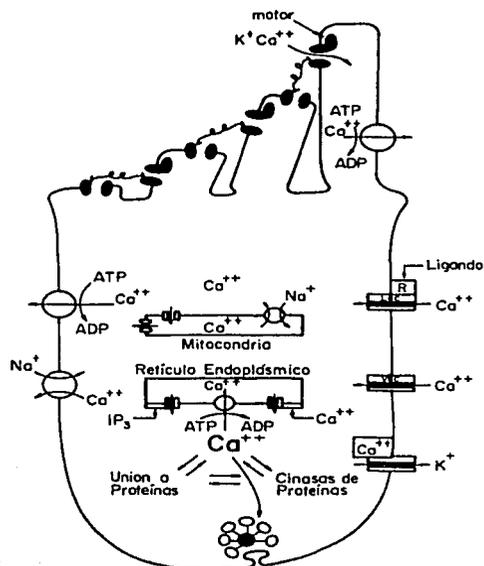
La liberación de neurotransmisor en las aferentes vestibulares es un proceso dependiente de Ca^{+2} extracelular (Roberts, Jacobs y Hudspeth, 1990; Issa y Hudspeth, 1994; Fuchs, 1996; Martínez Dunst y cols., 1997; Perin y cols., 2000). Tanto la actividad basal “espontánea” de las neuronas aferentes como la evocada mecánicamente desaparecen cuando el Ca^{+2} del medio extracelular se sustituye por Mg^{+2} (Pérez y cols., 1991).

El Ca^{+2} puede ingresar a la células ciliadas por tres vías: i) los canales mecanotransductores; ii) los receptores colinérgicos relacionados con las neuronas eferentes (ver adelante) y iii) canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje localizados en la membrana basolateral de la célula (Figura 9). Debido a la baja concentración de Ca^{+2} en la endolinfa, es muy poco probable que por los canales mecanotransductores ingrese una cantidad significativa de Ca^{+2} a la célula; más aún, el poco Ca^{+2} que pueda entrar por esta vía difícilmente alcanza la región sináptica, ya que existen evidencias de que únicamente produce cambios locales en la concentración de Ca^{+2} (Tucker y Fettiplace, 1995; Apicella y cols., 1997; Yamoah y cols., 1998; Boyer y cols, 2001). La entrada de Ca^{+2} por la activación de receptores colinérgicos seguramente es muy pobre y depende de la activación del sistema eferente. Queda entonces como única entrada significativa de Ca^{+2} los canales dependientes de voltaje de la membrana basolateral.

El Ca^{+2} intracelular tiene una gran diversidad de funciones; desde el punto de vista electrofisiológico destacan las siguientes: 1) adaptación del sistema de transducción, 2) resonancia y sintonización eléctrica, 3) inhibición eferente y 4) exocitosis del neurotransmisor.

La liberación de neurotransmisor depende de la concentración intracelular de Ca^{++} . En este sentido, cabe destacar el papel funcional que pueden jugar los diferentes organelos y proteínas intracelulares, ya sea como fuentes o como sumideros de Ca^{++} . La concentración intracelular de Ca^{++} está sujeta a una compleja regulación y depende del balance entre el Ca^{++} que entra, su liberación por organelos -mitocondrias, por ejemplo-, la unión a proteínas y la actividad de diversos sistemas de transporte (Figura 9).

Figura 9. Esquema que muestra las posibles fuentes y mecanismos de eliminación de Ca^{++} libre intracelular. Diversas evidencias indican que el Ca^{++} que alcanza a ingresar por los canales mecanotransductores es amortiguado y bombeado a nivel de los cilios. La principal fuente de Ca^{++} extracelular son los canales de Ca^{++} dependientes de voltaje. No existen estudios que hayan definido el papel de los reservorios de Ca^{++} intracelular en la respuesta de las células ciliadas. El Ca^{++} libre en el citoplasma es bombeado por una ATPasa de Ca^{++} que, se ha demostrado, se localiza en la membrana basolateral.



En las células ciliadas se ha descrito la existencia de altas concentraciones de proteínas móviles que ligan Ca^{++} , como la calbindina-D28k, con 6 a 8 sitios de unión a Ca^{++} , y la calmodulina con 4 sitios de unión a Ca^{++} (Roberts, 1993 y 1994). Estas proteínas determinan, en parte, la concentración de Ca^{++} en la vecindad de su fuente, y se ha estimado que su concentración en las células ciliadas equivale a ≈ 1 a 2 mM de BAPTA (en el extremo, se ha calculado una capacidad de amortiguar hasta 5 mM de Ca^{++}). Estudios teóricos han demostrado que la concentración de Ca^{++} cerca de un conjunto de canales en la membrana alcanza rápidamente un nivel estacionario determinado básicamente por dos propiedades de las proteínas móviles que fijan Ca^{++} : el tiempo medio (τ_c) antes de que la proteína se una a un ion de Ca^{++} y un factor de llenado (R), relacionados ambos con la movilidad difusional del amortiguador (D_{BU}), y también con la constante de asociación (K_{on}) y la concentración del buffer (Roberts, 1994).

Neurotransmisores

Sinapsis aferente

Las fibras aferentes de los órganos del sistema acústico lateral (cóclea, sistema vestibular y la línea lateral) aún en ausencia de estimulación, poseen una descarga basal; la cual es causada por la liberación espontánea de neurotransmisor. Se ha demostrado que, en el sistema vestibular y en la cóclea, la liberación de neurotransmisor es dependiente del calcio extracelular (Valli y Zucca, 1976; Siegel y Relkin, 1987; Pérez y cols., 1991; Perin y cols., 2000), además de que la presencia de cobalto y otros iones divalentes elimina la descarga basal en los receptores de la línea lateral (Sewell, 1990).

Con referencia a la naturaleza química del transmisor aferente, en la década de los 80 se realizaron diversos trabajos, algunos de ellos con resultados contradictorios (Guth y Melamed, 1982). El ácido gamma amino-butírico (GABA), las catecolaminas, el glutamato, el aspartato, la histamina e incluso un factor activador del nervio auditivo (ANAS), han sido propuestos como transmisores de las vías aferentes vestibulo-cocleares y de la línea lateral (Flock y Lam, 1974; Guth y Melamed, 1982; Bobbin y cols., 1985a, b; Meza, 1984 y 1985; Klinke, 1986; Annoni y cols., 1984; Soto y Vega, 1988; Prigioni y cols., 1990; Dechesne y cols., 1991; Puel y cols., 1995; Akoev, 1991; Cochran, 1992; López y cols., 1992; Soto, y cols., 1993).

Dos son las moléculas que han permanecido como transmisores putativos y acerca de los cuales se han realizado diversos trabajos: el GABA y el glutamato.

En relación al GABA, fue propuesto como neurotransmisor originalmente por Flock y Lam en 1974 (Flock y Lam, 1974). Diversos estudios bioquímicos y de inmunohistoquímica apoyan la hipótesis del GABA como neurotransmisor en la sinapsis vestibular (Meza, 1984). Se ha demostrado la presencia de las enzimas de degradación y síntesis en los canales semicirculares del cobayo, y que la glutamato descarboxilasa (GAD) se encuentra presente exclusivamente en las células ciliadas. Por otro lado se ha demostrado en canales semicirculares de rata la presencia de GAD durante el desarrollo, enzima que a los 15 días postnatales alcanza los niveles de la edad adulta; así mismo se ha demostrado que la GAD desaparece del oído cuando el animal es tratado con estreptomycin que destruye las células ciliadas y reaparece junto con el reflejo de nistagmo 20 días después de suspender el tratamiento (Meza, 1984; López y cols. 1992, Meza y cols 1992, Meza y cols. 1994; Usami y cols., 1989). En el vestíbulo del gato, la aplicación iontoforética de

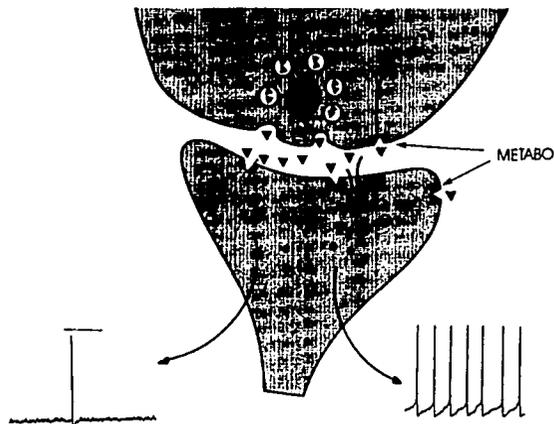


Figura 10 . Diagrama de una célula ciliada y sus relaciones sinápticas con una neurona aferente. En la dendrita aferente se localizan receptores para aminoácidos excitadores (AAE). Esta vía involucra principalmente receptores ionotrópicos tipo AMPA (ácido α -aminoisoxasole-propiónico) y NMDA (ácido N-metil-D-spártico); evidencia menos sólida sugiere también la presencia de receptores metabotrópicos. La activación de receptores NMDA genera trenes de potenciales, en tanto que la activación de receptores AMPA genera respuestas más lentas.

GABA produce un aumento significativo de la descarga aferente (Felix y Ehrenberger, 1985). Sin embargo, diversos trabajos electrofisiológicos no han permitido corroborar un efecto significativo del GABA sus agonistas y antagonistas sobre la actividad de las neuronas aferentes vestibulares (Guth y Norris, 1984; Annoni y cols., 1984; Vega y cols., 1987; Soto y Vega, 1988; Prigioni y cols., 1990). Estudios recientes han permitido demostrar que el GABA en la preparación de vestíbulo aislado de pollo provoca un incremento en la frecuencia de descarga de las fibras aferentes de los canales semicirculares, y este aumento es dependiente de la dosis. Sin embargo el efecto del GABA es mucho menor al provocado por la aplicación del glutamato y agonistas específicos de los receptores a aminoácidos excitadores (comunicación personal Amira Flores Urbina). Posiblemente las diferencias encontradas en cuanto al efecto del GABA se deban a los diferentes tipos de células ciliadas. Se ha pensado también en la posibilidad, aún no corroborada de que el glutamato sea el neurotransmisor en las sinapsis aferentes de las células ciliadas tipo II y el GABA en las tipo I (Guth y cols., 1998).

En nuestro laboratorio se han estudiado los efectos de agonistas y antagonistas del GABA y de los aminoácidos excitadores (AAE) sobre la actividad eléctrica de las aferentes vestibulares del ajolote (*Ambystoma tigrinum*). En el caso del GABA y sus análogos, hemos reportado que no producen efectos que indiquen que este pudiera ser el neurotransmisor aferente de las células ciliadas (Vega y cols., 1987). Por otra parte, las drogas relacionadas con los AAE cumplen con los criterios fisiológicos que permiten proponerlas como transmisores de la sinapsis aferente. Esto es: mimetizan la activación producida por la estimulación fisiológica; sus antagonistas

bloquean tanto la activación inducida por la estimulación fisiológica, como la inducida por los agonistas; y el efecto se ejerce a nivel postsináptico (Soto, 1988; Soto y Vega 1988; Pérez y cols., 1991; Zucca y cols., 1992; Soto y cols., 1993; Soto y cols., 1994; Flores, 1997). Actualmente existe consenso en que en los anfibios, el neurotransmisor entre las células ciliadas y las neuronas aferentes es un aminoácido excitador (AAE), probablemente glutamato, aunque pudieran liberarse otros aminoácidos como homocisteato o acetil-aspartil-glutamato. En los sistemas de células ciliadas, incluyendo la cóclea, el sistema vestibular y la línea lateral, los antagonistas de los receptores para los AAE bloquean la transmisión sináptica entre las células sensoriales y las neuronas aferentes (Soto y Vega, 1988; Zucca y cols., 1992 y 1993; Panzanelli P. y cols., 1994; Guth y cols., 1998). Las neuronas aferentes responden a los agonistas de los receptores a los AAE de los subtipos activados por N-metil-D-aspartico (NMDA), los activados por α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropiónico (AMPA) y receptores de tipo metabotrópico (Eybalin, 1993; Puel y cols., 1995; Kataoka y Ohmori, 1996; Sewell, 1996; Guth y cols., 1998). Queda pendiente, sin embargo, definir el papel exacto que tienen los diferentes tipos de receptores a los AAE en la transmisión aferente en esta vía (Figura 10).

Se ha estudiado también la presencia de receptores a AAE de tipo metabotrópico (mGluR). En el ajolote, las respuestas de las aferentes a los agonistas de los mGluR tal como el trans ACPD son muy débiles y poco repetitivas (García Andrade, 1996). Guth y colaboradores (1999) han reportado la presencia de receptores tipo mGluR en el oído interno de la rana. Ellos proponen que dichos receptores se encuentran localizados presinápticamente en las células ciliadas y que harían una retroalimentación positiva regulando la liberación del neurotransmisor aferente.

En una serie experimental excepcionalmente elegante, Kataoka y Ohmori (1996) demostraron la liberación de glutamato por las células ciliadas. Ellos hicieron fijación de voltaje en una célula ciliada aislada del oído del pollo y la colocaron en la vecindad de una célula granular del cerebelo en cultivo. Cuando se despolariza la célula ciliada, la célula granular -que se sabe tiene receptores glutamatérgicos- responde con una depolarización. Estos autores demostraron, además, que este efecto es sensible a los antagonistas de los receptores NMDA como el 2-amino-5-fosfonoaléico (Kataoka y Ohmori, 1996). Sin embargo, este experimento no descarta la liberación de otros neurotransmisores.

Por otra parte, se ha encontrado inmunorreactividad a una sustancia del tipo del glutamato en las células ciliadas del sistema vestibular de la rana (Panzanelli y cols., 1994); Harper y su grupo

hallaron por inmunohistoquímica la presencia de glutamato y aspartato en las células ciliadas vestibulares, en las fibras nerviosas y en las células ganglionares (Harper y cols. 1995). Usami y Ottersen, en 1995, encontraron que la inmunorreactividad al glutamato es mayor en las células ciliadas que en el resto del neuroepitelio y que la glutamina se encontraba en las células de sostén; ello concuerda con el ciclo glutamato-glutamina que se encuentra presente en las células glutamatérgicas cerebrales.

Sinapsis eferente

La inervación eferente vestibular en los mamíferos tiene su origen primordialmente a nivel del piso del cuarto ventrículo y alrededor de las raíces del nervio entre el núcleo abducens y el núcleo vestibular rostral. En el gato un grupo importante de neuronas eferentes se localiza en la formación reticular dorsal (Dechesne y cols., 1984). En términos generales los cuerpos de las neuronas eferentes se agupan en el tallo cerebral, próximos a los núcleos vestibulares (Goldberg y Fernández, 1980, Warr, 1975), Perachio y Kerevetter (1989) han señalado en el gerbillo dos grupos distintos de neuronas eferentes en base al tamaño de sus somas neuronales, uno de ellas de somas grandes, que se localiza en la parte lateral de la rodilla del nervio facial, y ventromedial al núcleo vestibular, y el grupo de somas pequeños se encuentra hacia la parte ventral de la rodilla del nervio facial. En el cobayo los cuerpos de las neuronas eferentes que inervan los órganos otolíticos y los canales semicirculares se agrupan alrededor de la rodilla del nervio facial, en tanto las fibras eferentes a los canales semicirculares parecen tener su origen en los núcleos vestibulares Fujino y cols., 1993). En la paloma se ha reportado que las neuronas eferentes tienen múltiples orígenes; tres grupos de neuronas se localizaron alrededor de los núcleos vestibulares ipsilaterales y dos grupos adicionales, con proyecciones bilaterales, en la formación reticular (Eden y Correia, 1982).

En los anfibios los cuerpos de las neuronas eferentes se encuentran a nivel de los núcleos de la formación reticular del bulbo ráquideo, (al menos los núcleos principales, pero no los únicos) (Fritsch, 1981), en la formación reticular existen núcleos que bien podrían ser homólogos con la oliva superior de otros vertebrados (Zittlau, 1988).

además en todos los vertebrados existe el núcleo eferente octavolateralis, localizado en la zona rombencefálica del tegmentum, con la excepción de que en los mamíferos no se concentra en un

solo núcleo (Webster y cols., 1992). Las fibras eferentes son fibras amielínicas que terminan haciendo contacto con las neuronas aferentes o directamente sobre las células ciliadas. En el caso de las eferentes que se dirigen a células ciliadas tipo I, el contacto sináptico es sobre el cáliz aferente. En cambio, en las células ciliadas tipo II, la sinapsis se realiza directamente sobre el cuerpo de las células ciliadas. El segundo caso es el que resulta relevante para este proyecto, ya que trabajamos en el ajolote (*Ambystoma tigrinum*) que, tiene únicamente células tipo II.

Desde los años 60 se describió a la acetilcolina como el neurotransmisor entre las fibras eferentes y las células ciliadas (Gisselsson, 1960; Amaro y cols., 1966); sin embargo, el descubrimiento de que el GABA se sintetiza y almacena en las fibras eferentes de la cóclea (Fex y cols. 1986; Eybalin y cols. 1988), así como la presencia de neuropéptidos activos en estas fibras, sugieren que tanto la acetilcolina como el GABA y algunos neuropéptidos actúan como neurotransmisores o neuromoduladores entre las fibras eferentes y las células ciliadas en la cóclea.

No es claro el papel que juega la activación de las fibras eferentes, se ha reportado que su estimulación produce un incremento en la frecuencia de descarga de las neuronas aferentes. En el mono araña la estimulación eferente además de aumentar la descarga basal, disminuye la evocada ante estímulos rotatorios; el aumento en la frecuencia de descarga basal fue fundamentalmente debido a un aumento de la actividad de las fibras irregulares (Goldberg y Fernández, 1980). En el gato se encontró que la estimulación de las fibras eferentes produce una inhibición de la descarga de las fibras aferentes (Dieringer y cols., 1977). En el gato la estimulación eferente produce un incremento de ruido sináptico en las neuronas aferentes (McCue y Guinan, 1994).

En vertebrados inferiores que solo tienen células ciliadas tipo II, se ha encontrado que la estimulación de las fibras eferentes del canal semicircular aislado de la rana produce tanto aumento como disminución de la frecuencia de descarga de las neuronas aferentes. Se ha propuesto que ambas respuestas se deben a la relación que guarda el potencial de membrana de la célula respecto del potencial de inversión del ion K^+ en el momento en que se aplica el estímulo eléctrico (Rossi y cols., 1977; 1980).

En la línea lateral, se ha reportado que la estimulación eferente inhibe la descarga de las neuronas aferentes del *Xenopus laevis* (Russell, 1971), el pez perro (Roberts y Russell, 1972) y del mutelo (*Lota lota*) (Flock y Russell, 1976).

Uno de los elementos que podría contribuir a entender los diferentes resultados que se han

obtenido al estimular las eferentes, es la presencia de células tipo I en los mamíferos, en las que la sinapsis eferente es sobre la fibra aferente, cosa que no ocurre en los vertebrados inferiores que solo poseen células ciliadas tipo II. Sin embargo, en los órganos otolíticos del sapo la estimulación del octavo par contralateral al vestíbulo del que se registra, produce un incremento de la descarga en el 33% de las fibras aferentes, en otro 33% la estimulación decremente su actividad y en el 33% restante no se modificó la descarga de las aferentes vestibulares (Sugai y cols., 1991).

Boyle y Highstein en 1990, estimulando las fibras eferentes en el pez sapo, registran un incremento en la frecuencia de descarga de las aferentes vestibulares, y una disminución de la respuesta provocada por estímulos rotatorios, estos resultados son similares a los reportados por Goldberg y Fernández en el mono araña (Boyle y Highstein, 1990; Goldberg y Fernández, 1980).

En conjunto estos resultados indican que las diferencias en la inervación entre células ciliadas tipo I y II no explican las diferentes respuestas que se han registrado con la estimulación eferente; queda como explicación más aceptable la que se relaciona con el potencial de inversión del ion K^+ .

Se ha encontrado que la aplicación de acetilcolina (ACh) activa una corriente de K^+ en la porción basolateral de las células ciliadas. La aplicación de ACh y ATP en células ciliadas aisladas del oído del pollo y cargadas con fura-2, ha permitido detectar un aumento intracelular de Ca^{++} . Este aumento en la concentración intracelular de Ca^{++} activa la corriente de K^+ dependiente de Ca^{++} , con lo que se produce una hiperpolarización de las células (Shigemoto y Ohmori, 1990). La muscarina y la carbamilcolina producen un efecto similar al que se observa con ACh. Cabe destacar que el hecho de que el efecto de la ACh en las células ciliadas sea mediado por canales altamente permeables a Ca^{++} representa un importante problema, ya que tradicionalmente se ha aceptado que la ACh es neurotransmisor en vías inhibitorias eferentes que llegan a las células ciliadas. Sin embargo, la activación de corrientes de Ca^{++} por estas vías llevaría a una despolarización y al consecuente aumento en la liberación de transmisor, o sea, produciría excitación. Posiblemente este dilema se resuelva con la observación de que la entrada de Ca^{++} activa de manera secundaria una corriente de K^+ , y postulando que la corriente de Ca^{++} produce un efecto despolarizante localizado y autolimitado, y que el efecto secundario principal es la hiperpolarización debida a la salida de K^+ . En células ciliadas aisladas de los canales semicirculares de la rana se ha encontrado que la Ach activa una corriente de salida que tiende a

hiperpolarizar la célula, probablemente $I_{K, Ca}$ (Housley y cols., 1990).

En las células ciliadas el receptor colinérgico tiene una farmacología diferente a la reportada tradicionalmente para los receptores nicotínicos o los muscarínicos, sin embargo al constituir un canal iónico ha sido clasificado como un nuevo tipo de receptor nicotínico. La peculiar farmacología de este receptor fue originalmente reportada en estudios en las células cocleares externas del cobayo (Eróstegui y cols., 1994). Funcionalmente son agonistas de este receptor la acetilcolina > suberildicolina > carbacol > 1,1-dimetil-4-fenil-piperacina (DMPP) pero no la nicotina, cisteína y muscarina. El efecto sobre las corrientes provocado por la aplicación de acetilcolina es bloqueado por bajas concentraciones de antagonistas que tradicionalmente no son nicotínicos (estricnina > *d*-tubocurarina > bicuculina > α -bungarotoxina > timetafan), y por altas concentraciones de antagonistas muscarínicos (atropina > 4-difenilacetoxi-N-(2-cloroetil)-piperidina-hidrocloruro (4-DAMP) > pirenzepina). En las células ciliadas vestibulares aisladas del sáculo de la rana, además de presentar la misma farmacología que las células ciliadas cocleares se ha descrito que el receptor colinérgico es antagonizado por enzimas como la papaina, y las proteasas VIII y XXIV (Holt y cols., 2001), y que la morfina es capaz de inhibir a este receptor, esta inhibición no es a través de receptores a opioides (Lioudyno y cols., 2000).

El receptor responsable, ha sido llamado $\alpha 9$, por la subunidad del receptor nicotínico $\alpha 9$ AChR. Este receptor fue clonado de células del epitelio olfatorio de la rata y se encuentra presente en las células ciliadas cocleares y vestibulares (Elgoyhen y cols., 1994; Anderson y cols., 1997). Las características de este receptor nicotínico con su inusual farmacología son similares a las descritas para los receptores homoméricos constituidos por subunidades $\alpha 9$ nAChR, que expresados en oocitos de *Xenopus laevis*, presentan una farmacología similar a la del receptor nativo de las células ciliadas. En cuanto a la corriente iónica que se produce al activar el receptor $\alpha 9$ nAChR la aplicación de acetilcolina produce una corriente menor a las provocadas en el receptor nativo, además de no presentar una desensibilización tan marcada como la registrada en las células cocleares (Elgoyhen y cols., 1994; Rothlin y cols., 1999). En células ciliadas cocleares externas *in situ* por medio de técnicas inmunohistoquímicas se han encontrado tanto la subunidad $\alpha 9$ como, recientemente, la $\alpha 10$. Al transfectar ambas subunidades en oocitos se forman heterómeros $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs, las corrientes evocadas por la aplicación de acetilcolina, en este caso, tienen una magnitud mayor que los receptores constituidos únicamente

por subunidades $\alpha 9$, el $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs presenta desensibilización, y una más rápida apertura y cierre del canal. Estas características son similares a las reportadas en células cocleares externas aisladas y el receptor heterómero $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs mantienen la peculiar farmacología descrita en las células cocleares, así que actualmente se piensa que los receptores nativos son heterómeros $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs (Elgoyhen y cols., 2000).

Generalidades de péptidos opiáceos:

Receptores a opioides

La idea de que existen receptores a opioides deriva del descubrimiento de que la naloxona tritiada desplaza a la morfina de sus sitios de unión. Estos resultados fueron corroborados cuando se demostró la presencia de receptores opiáceos en el íleon del cobayo y en el conducto deferente del ratón (Pert y Snyder, 1973; Pert y cols., 1975; Terenius, 1973; Kosterlitz y Waterfield, 1975). Estudios posteriores demostraron que el efecto de la morfina era revertido por la administración de naloxona (Akil y cols. 1976) y que la estimulación de la sustancia gris periacueductal producía analgesia, resultados que llevaron a pensar en la existencia de una sustancia endógena similar a la morfina (Mayer y Liebeskind, 1974). En experimentos con homogenados de cerebro de cerdo, se encontró una sustancia que, en el íleon de cobayo, producía efectos similares a los de la morfina; se demostró que se trataba de oligopeptidos que por encontrarse en el cerebro fueron denominados metionina-encefalina y leucina-encefalina (Hughes y cols., 1975); actualmente se conocen más de 40 péptidos neuroactivos (Darlison y Richter, 1999).

Se ha establecido que los péptidos neuroactivos son sintetizados a partir de grandes moléculas; se han identificado tres proteínas precursoras de los péptidos opioides: proopiomelanocortina (Nakanishi y cols., 1979), proencefalina A (Comb y cols., 1982; Grubler y cols., 1982; Noda y cols., 1982) y prodinorfina o proencefalina B (Goldstein y cols., 1971; Bradbury y cols. 1976; Kakidani y cols., 1982).

El desarrollo de varios tipos de ligandos y el estudio de sus propiedades llevó a la conclusión de que existen diversos tipos de receptores a opioides (Pert y Snyder, 1973; Pert y cols., 1975; Terenius, 1973; Kosterlitz y Waterfield, 1975; Paterson y cols., 1983). Se han propuesto tres tipos de receptores a los opioides: μ , para los receptores a los que se unen compuestos similares a la morfina; κ , para los receptores a los que se unen compuestos como la cetociclazocina y; γ , para los receptores a los que se unen drogas como la N'alilnormetazocina. Además de estos

receptores, Kosterlitz y colaboradores (1979) aportaron evidencias de un cuarto receptor al que denominaron δ . Estudios posteriores corroboraron que los receptores μ , δ y κ eran sitios de unión específicos y que se encontraban ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central de diferentes especies animales (Tabla II). Para los receptores μ y δ no existen evidencias tan claras de su existencia y han quedado desechados de la clasificación principal (Chang y cols., 1979; Chang y Cuatrecasas, 1979; Pert y cols., 1974; Bonner y cols., 1981; Martin, 1984; Lewis, y cols., 1982; y Ninkowic y cols., 1981).

Tabla II

	μ	δ	κ
Agonistas	Dermorfina ¹ Morfina Morficeptina ² DAGO o DAMGO endorfina	Deltorfina encefalinas D-Pen-D-Pen-encefalina	Dinorfina U50488, U69593, C1977
Antagonistas	Naloxona Flunaltrexamina CTOP	Naloxona Naltrindole (NTI) Naltriben (NTB) 7-benzylidenaloxona (BNTX) N,N-dialil-Tyr-Aib-Aib-Phe-Leu-OH (IC1174864) derivados de Dmt y Tic ³ N,N(CH₃)₂-Dmt-Tic-Ala-OH N,N(CH₃)₂-Dmt-Tic-OH	Naloxona Nor-binaltorfimina

En negritas las sustancias utilizadas en este trabajo.

¹ H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly, ² H-Tyr-Pro-Phe-Pro-NH₂, ³ Ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic)

⁴ Los derivados de Dmt y Tic forman un amplio grupo de antagonistas con alta selectividad y potencia para los receptores δ (Bryant y cols., 1998). Los dos que señalamos son los que mantienen una buena relación entre potencia y selectividad.

⁵ 2',6'-dimetil-tirosina (Dmt), DAMGO: Tyr-DAla-Gly-[NMePhe]-NH(CH₂)₂-OH mismo que [D-Ala₂,N-Me-Phe₄,Gly₅]-Enkefalina -DAGO, CTOP: DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Pen-Thr-NH₂, U50488: *trans*-(±)-3,4-dicloro-N-Methyl-N-[2(1-pyrrolidinil)-ciclohexil-benzeneacetamida, U69593: 5 α ,7 α , β -(-)-N-Metil-N-[7-(pirrolidinil)-1-oxaspiro(4,5)dec-8-y]]benzono acetamida, C1977: (5R)-(5 α ,7 α ,8 β)-N-Methyl-N(7-[1-pirrolidinil]-1-oxaspiro[4,5]dec-8-y))4-benzofuranacetamida mono hidrocloreuro

El receptor μ se define operacionalmente como el sitio de alta afinidad en que los opioides producen analgesia, aumento del tono muscular, constipación, oliguria, fuerte depresión respiratoria e intensa dependencia física. La morfina se une principalmente al receptor μ y es antagonizada por naloxona (Chang y Cuatrecasas, 1979). Se han identificado dos tipos de receptores μ : el μ_1 , de alta afinidad a la morfina y a los opioides, y que se encuentra principalmente en el sistema nervioso central; y el μ_2 , de baja afinidad a la morfina, este receptor

ha sido descrito en el sistema nervioso periférico (Pasternak y Wood, 1986).

El receptor μ , que tiene alta afinidad a las endorfinas, liga también a las encefalinas, pero con menor afinidad. Recientemente, en estudios en el cerebro de humanos y de bovinos, se ha reportado la existencia de dos péptidos endógenos de alta selectividad y afinidad para los receptores μ : la endomorfinina 1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) y la endomorfinina 2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂). Estos dos nuevos péptidos han demostrado un potente poder analgésico (Zadina y cols., 1997).

En la médula adrenal, los péptidos opioides están presentes en grandes concentraciones, y en cultivos de células cromafines adrenales se ha encontrado una modulación inhibitoria de las corrientes de calcio dependientes de voltaje y un incremento de la corriente de K⁺ dependiente de Ca⁺⁺, estos efectos se demostró que eran mediados por el receptor μ . (Twitchell y Rane, 1993). Estudios *in vitro* utilizando DAGO (D-Ala²-,N-me-Phe⁴-Gly-ol⁵-encefalina) han demostrado que los receptores μ inhiben tanto la corriente de calcio, expresada en oocitos de *Xenopus laevis*, como la corriente de calcio sensible a la ω -conotoxina en las neuronas intracardiacas de la rata (Ottolia y cols., 1998, Adams y Terquettrini, 1998).

El receptor δ tiene gran afinidad por todos los péptidos derivados de la proencefalina; a este receptor se unen principalmente las encefalinas, seguidas por el octapéptido que tiene igual afinidad por el receptor μ , y finalmente la dinorfina 1-8 (Akil y cols., 1984). Los primeros antagonistas reportados con una alta afinidad por este receptor fueron las encefalinas (Shaw y cols., 1982), y la naltrexona, derivada del natriindole, fue realmente el primer antagonista selectivo y potente del receptor δ que se ha sintetizado. La deltorfina es un péptido opioide descubierto en la piel de los anfibios que también se une al receptor δ (Espamer y Melchiorri, 1980; Richter y cols., 1990).

Con base en la potencia de los agonistas se ha sugerido la existencia de dos subtipos de receptores δ (Portoghese y cols., 1992). El receptor δ_1 , al que se une con alta afinidad la [D-pen, D-pen]encefalina (DPDPE) y el δ_2 que tiene como agonista preferencial a la [D-Ser, Leu]encefalina-trionina (DSLET) (Portoghese y cols., 1992). Los receptores δ juegan un papel importante en la depresión respiratoria (Pasternak, 1982; Lord y cols., 1977; Freye y cols., 1982) y no parecen participar en la producción de analgesia.

En las células del ganglio submandibular del hamster, los receptores δ modulan los canales de

calcio tipo L-,N-, P/Q de manera dependiente de la dosis, y este efecto es bloqueado por naloxona (Endoh y Suzuki, 1998).

Los receptores κ se han postulado para drogas del tipo de la ketazocina; su acción analgésica es pobre (Martín y cols., 1976). El primer agonista para el receptor κ fue descrito por el grupo de Kosterlitz en 1981. Ellos encontraron que cuando un péptido crece en longitud hacia el carboxilo terminal de la leu-enkefalina va perdiendo selectividad por el receptor δ e incrementándola hacia el κ . La dinorfina, la alfa y la beta-neoendorfina son agonistas de este tipo de receptor. Posteriormente se han descrito tres tipos de receptores κ : el κ_1 , al que se une el U50488 y los receptores κ_2 y κ_3 , que ligan preferencialmente el benzomorfan.

Los receptores κ participan en funciones como la diuresis, la nocicepción, la alimentación y las secreciones endócrinas (Hansen y Morgan, 1984). El U50488, que es un agonista del receptor κ , modula en forma inhibitoria a los canales de calcio tipo N de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal de la rata (King y cols., 1999) y en las células NG108-15, resultando las corrientes de K^+ dependientes de voltaje insensibles a este agonista (Carpenter y cols., 1996). En las neuronas aferentes de la raíz dorsal, la dinorfina también disminuye las corrientes de calcio tipo N y tipo P, sin afectar las de tipo L (Wiley y cols., 1997).

La clonación de los genes que codifican los péptidos opioides ha proporcionado pruebas claras de la existencia de los receptores μ , δ , y κ . La clonación del receptor δ dio como resultado la identificación de las subfamilias de genes de los diferentes receptores. Los subtipos de cDNAs de las bibliotecas de expresión celular en las células NG108-15 manifiestan tipos de unión similares a las encontrados en cerebro, pero los niveles de mRNA son 100 veces más elevados. Los cDNAs despliegan secuencias casi iguales a las encontradas en cerebro, estas secuencias del receptor δ codifican proteínas con siete dominios hidrofóbicos transmembranales similares a los encontrados en otros receptores acoplados a proteínas G (Kiefer y cols., 1992; Evans y cols., 1993).

Neuropéptidos en el oído interno

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 enkefalina en el órgano de Corti del cobayo, 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 posteriores han permitido demostrar un efecto diferencial en el grado en que se marcan las eferentes que establecen contacto con 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 en el órgano de Corti en el cobayo desaparece en animales en los que se han seccionado las fibras eferentes, indicando la asociación de estas sustancias con el sistema eferente (Altschuler y cols., 1984 a, b; Altschuler y Fex, 1986; Gil-Loyzaga y cols. 1988). La investigación realizada por Scholtz y su grupo, en 1998, muestra inmunorreactividad positiva para las encefalinas en la cóclea de humanos, pero no en los órganos vestibulares (Scholtz y cols., 1998).

También se ha encontrado inmunorreactividad asociada a péptidos derivados de la encefalina B (prodinorfina), glucagon, insulina, colecistocinina y prolactina en la cóclea de cobayos (Hoffman y cols., 1985; Nowak y cols., 1986 a, b). Marcajes triples han demostrado que, en fibras eferentes de la cóclea del cobayo y de la rata, coexisten el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la acetilcolina y las encefalinas (Safieddine y Eybalin, 1992, Wackym y cols. 1993); se ha encontrado por inmunorreactividad la coexistencia de CGRP y acetilcolina en las fibras eferentes de la línea lateral de la anguila (Roberts y Ryan 1971) y se ha reportado que el CGRP incrementa la descarga de las fibras aferentes en la línea lateral de la rana (*Xenopus Laevis*) (Adams y cols. 1987; Sewell y Starr, 1991; Bailey y Sewell, 2000a y b).

En el sistema vestibular del conejo, se ha descrito inmunorreactividad a sustancia P en las terminales aferentes que inervan a las células ciliadas tipo I del utrículo y del sáculo (Ylikoski y cols., 1984). Trabajos posteriores han encontrado inmunorreactividad a sustancia P y a colecistocinina en el cuerpo de las células ciliadas (Nowak y cols., 1986a, b). En la línea lateral de la rana, se ha encontrado que el CGRP produce un aumento de la descarga de las aferentes vestibulares (Adams y cols., 1987; Bailey y Sewell, 2000). Estudios de hibridación y marcaje con inmunorreactividad indican que en el tallo cerebral de la rata, en las células que dan origen a las eferentes vestibulares, se encuentra el RNAm para el CGRP colocalizado con inmunorreactividad a CGRP (Wackym y cols., 1993).

En este trabajo nosotros trataremos de definir que péptidos opioides se encuentran presentes

en el vestíbulo del ajolote, el papel de estos y el tipo y ubicación de los receptores opioides, ya que se sabe poco respecto del papel fisiológico de los péptidos opioides en el oído. Se ha encontrado, por ejemplo, que las encefalinas disminuyen la descarga espontánea de las fibras aferentes cocleares (Buerki y cols. 1993). En el sistema vestibular de la rana, las encefalinas, así como su análogo sintético dalargina, disminuyen la frecuencia de descarga de las fibras aferentes vestibulares, efecto que es revertido por naloxona (Andrianov y Ryzhova, 1999). Respecto de los receptores involucrados existe poca información: en la cóclea del cobayo se encuentran receptores tipo μ y δ , y la activación de éstos induce una inhibición de la adenilatociclasa reversible por naloxona (Eybalin y cols., 1987; Lamprecht y Meyer zum Gottesberge, 1988). En resumen, para la cóclea aparecen los neuropéptidos junto con la acetilcolina y el GABA como neurotransmisores asociados al sistema eferente. Las evidencias experimentales sugieren que, al menos los neuropéptidos, coexisten en algunas fibras con la acetilcolina y al parecer, que el sistema GABAérgico es independiente (Altschuler y cols., 1984 a; Abou-Madi y cols., 1987). Para el sistema vestibular y la línea lateral el cuadro es mucho más confuso, y podemos afirmar con certeza que lo único que conocemos es que los neuropéptidos se encuentran involucrados en la transmisión de información proveniente de estos mecanorreceptores, pero desconocemos si son liberados por las células sensoriales o por las fibras aferentes o eferentes, así como el tipo de receptores involucrados en la respuesta a estas sustancias (Martin, 1984; Simon y Hiller, 1989; Hruby y Gehrig, 1989).

Planteamiento del problema

Los antecedentes que hemos presentado indican que existen aún importantes interrogantes en relación con la neurotransmisión en los sistemas de células ciliadas, y que nada o poco se conoce acerca de influencias neuromoduladoras en estos sistemas. Diversos antecedentes indican que el procesamiento de la información sensorial en el sistema vestibular es complejo y que tanto a nivel de la sinapsis eferente como de la aferente existen procesos susceptibles de influencias neuromoduladoras. Se ha demostrado que en estos procesos pudieran participar receptores histaminérgicos, diversos subtipos de receptores colinérgicos, óxido nítrico y neuropéptidos del tipo del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y péptidos opioides (Guth y cols., 1998; Bailey y Sewell, 2000 a y b; Flores y cols., 2001; Soto y cols., 2001).

En relación con los péptidos opioides, se sabe que células “peptidérgicas” constituyen parte

de un sistema de control de la entrada sensorial por medio del cual el sistema nervioso central ejercería, en función de su estado, una modificación de la información proveniente de los sistemas sensoriales. Esto ha quedado ampliamente demostrado para el caso de las neuronas aferentes primarias de las vías de dolor.

En el sistema vestibular, diversas evidencias indican que los péptidos opioides ejercen influencias significativas sobre la actividad de las neuronas aferentes, sin embargo, no se conoce el tipo de receptores a péptidos opioides que expresan, su ubicación, su papel funcional y sus potenciales ligandos endógenos.

En este trabajo contribuye a determinar el papel funcional, el tipo de receptores y los posibles ligandos endógenos de los opioides en el sistema vestibular del ajolote.

HIPÓTESIS

Los neuropéptidos del tipo de las encefalinas son liberados a nivel periférico en el vestíbulo, e inducen un efecto de modulación en la generación del potencial receptor y en la liberación del neurotransmisor aferente por parte de las células ciliadas. Específicamente, proponemos que la acción de estos neuropéptidos se ejerce modificando la liberación del neurotransmisor aferente y la excitabilidad de las neuronas aferentes.

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar la presencia de péptidos opioides en el sistema vestibular, los subtipos de receptores que se expresan y su papel fisiológico en el procesamiento postransduccional de la información vestibular en el ajolote.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto farmacológico de los agonistas y antagonistas de los receptores a los péptidos opioides (μ , δ y κ) sobre la descarga de las neuronas aferentes en la preparación del oído interno aislado del ajolote.
2. Con base en las interacciones farmacológicas de los diferentes agonistas y antagonistas a los

péptidos opioides con otras sustancias como acetilcolina y antagonistas de aminoácidos excitadores, proponer un sitio de acción para los péptidos opioides.

3. Estudiar mediante técnicas inmunohistoquímicas la presencia de péptidos opioides en el vestíbulo y su distribución anatómica.
4. Definir las corrientes iónicas dependientes de voltaje presentes en las células ciliadas de los canales semicirculares del ajolote.
5. Determinar si existen grupos o subtipos de células ciliadas dentro del canal semicircular los que se puedan distinguir morfológica y funcionalmente.
6. Determinar las acciones de los agonistas de los péptidos opioides sobre las corrientes iónicas en células ciliadas aisladas.
7. Determinar si en el vestíbulo del ajolote existen precursores de péptidos opioides del tipo de la proencefalina.

MATERIAL Y MÉTODOS

El animal utilizado en los experimentos fue el ajolote (*Ambystoma tigrinum*). Se usaron animales en estado neoténico con un peso de 30 a 60 grs y una longitud de 15 a 20 cm. Se eligió el ajolote como modelo experimental debido al fácil manejo de estos animales en el laboratorio, además de que son de sangre fría, por lo que no se requieren sistemas de control de temperatura durante el experimento. Los ajolotes poseen un sistema vestibular relativamente grande que solo posee células ciliadas tipo II (que se ha demostrado establecen sinapsis químicas con las fibras que las inervan).

Disección

Tanto para el registro de la actividad de las fibras aferentes vestibulares, como para la realización de experimentos de fijación de voltaje en células aisladas, los animales se decapitaron sin anestesia, separando luego el maxilar inferior del resto de la cabeza. Posteriormente, se eliminó

la mucosa que recubre el paladar y, la región del oído interno se identificó visualmente, ya que aparece como una zona blanquecina bilateral en la parte posterior del paladar que corresponde al otolito sacular. Inmediatamente se procedió a sumergir la preparación en solución de Ringer para anfibio con la siguiente composición (en mM): NaCl 111, KCl 2.5, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, HEPES 5, glucosa 5; se utilizó NaOH para llevar la solución a pH 7.4 (Bracho y Budelli, 1978). Posteriormente, bajo microscopio estereoscópico y en el baño de Ringer se disecó la cápsula ótica hasta identificar claramente el sáculo, el utrículo, la lagena y las ámpulas de los canales semicirculares anterior y lateral. Las fibras nerviosas que se originan en todos estos órganos en conjunto forman el VIII par craneal se identificaron y disecaron cuidadosamente (procedimiento descrito anteriormente en Vega, 1987; Soto y Vega, 1988), liberándolas hasta su entrada al tallo cerebral. Posteriormente se seccionó el VIII par justo en su entrada al tallo cerebral. Se procedió entonces a aislar la cápsula ótica del cráneo, obteniendo así la preparación del vestíbulo aislado.

Registro de la actividad aferente en el sistema vestibular aislado

La preparación se montó en una cámara con la parte ventral hacia arriba. Se usaron técnicas de registro extracelular e intracelular en las fibras aferentes vestibulares. Para el registro extracelular, se diseccionaron la parte anterior y posterior del VIII par craneal. A la parte anterior se aproximó un electrodo de succión (A-M Systems), previamente lleno con solución Ringer, que permitió hacer un registro de actividad multiunitaria. Esta técnica tiene la ventaja de que permite registrar bajo perfusión constante (Valli y cols., 1984) y estimular mecánicamente la preparación. La actividad proveniente del electrodo se derivó a un amplificador convencional de AC (P-15 Grass). La señal se filtró con corte de frecuencias por arriba de 3,000 Hz y por abajo de 100 Hz. La salida del amplificador se conectó a un osciloscopio (Tektronix 2216), a un amplificador de

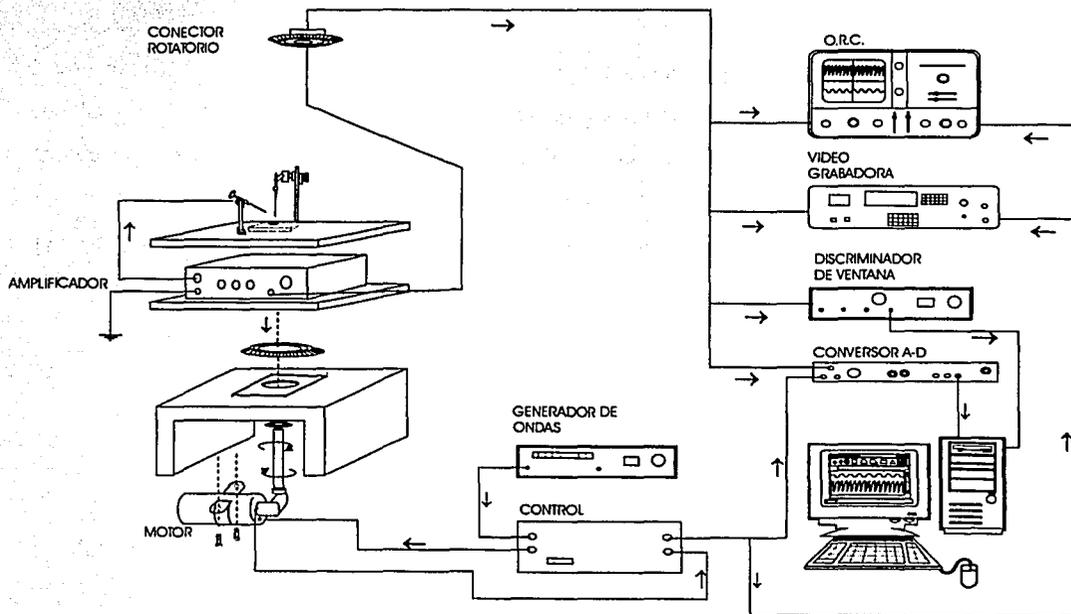


Figura 11. Montaje de la preparación del vestíbulo aislado para la estimulación mecánica en una plataforma rotatoria. La preparación se sometió a aceleraciones sinusoidales por medio de un motor con servomecanismo cuya velocidad y características de giro fueron controladas por un generador de ondas. En la plataforma se montó el amplificador, los manipuladores, el electrodo de succión y el sistema de aplicación de drogas. Una vez amplificada, la señal fue llevada por un conector rotatorio a un osciloscopio, a un discriminador de ventana y a una computadora para su análisis.

audio, a un sistema de registro en cinta magnética (Dagan Unitrade) y a un discriminador de ventana WPI modelo 121 cuya señal se envió a una microcomputadora. El análisis de la actividad neuronal generalmente se realizó en línea con el experimento mediante procedimientos desarrollados en nuestro laboratorio (Soto y Vega, 1987; Soto y cols., 1997).

En algunos experimentos se estudiaron las interacciones de las drogas de interés con la respuesta del sistema a aceleraciones angulares. Para ello se montó la preparación junto con los microelectrodos y el amplificador en una platina giratoria, la cual es comandada en su movimiento por un sistema de servomecanismos que permiten imprimir aceleraciones sinusoidales y estudiar la respuesta del sistema ante estímulos mecánicos (Figura 11). Esto permitió determinar el efecto que producen las drogas y las manipulaciones experimentales utilizadas tanto en la actividad basal como en la actividad provocada por estímulos naturales en el sistema vestibular.

La preparación se perfundió de manera constante con solución Ringer normal a razón de 2 ml/min. Para la aplicación de drogas se utilizaron jeringas Hamilton, a las cuales se acopló una manguera flexible con un microelectrodo de vidrio en la punta. La punta del electrodo se colocó aproximadamente a 0.5 mm del origen de las aferentes de las crestas de los canales anterior y lateral. Las drogas se aplicaron por presión y en cada ocasión se administraron 20 μ l. Esta técnica de microperfusión tiene la ventaja de que permite producir aumentos momentáneos de la concentración de la sustancia en la vecindad de la sinapsis (Waud, 1968). Por mediciones electroquímicas sabemos que la droga se diluye de uno a dos órdenes de magnitud en un período muy corto (Vega, 1987).

Para determinar si una droga tuvo efecto, se realizó una prueba estadística no paramétrica: la U de Mann Whitney. Para esto se desarrolló un programa de computación que permite seleccionar una región de un histograma de frecuencia (descarga basal control, por ejemplo) y compararlo con otra región del histograma de la misma célula (por ejemplo, descarga luego de aplicar la droga) (Soto y cols., 1989). 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, construyéndose de esta manera las gráficas dosis-efecto

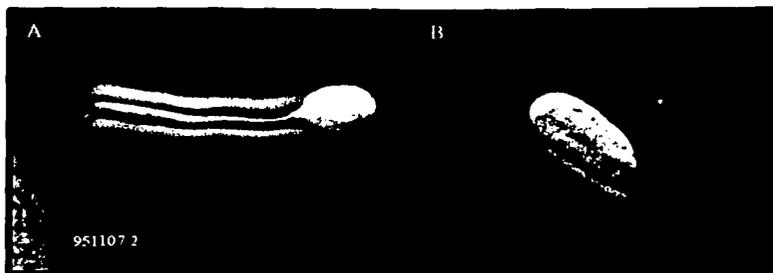


Figura 12. Células aisladas usando papaína. En A, una célula en forma de matraz. En B, célula de forma cilíndrica. En ambos casos se pueden apreciar los cilios que emergen de la parte apical de la célula (flechas).

Fijación de voltaje en células ciliadas aisladas

Para aislar las células del neuroepitelio del oído interno utilizamos enzimas que producen una digestión parcial del tejido, especialmente de las uniones intercelulares. Para ello se procedió a sacrificar al animal por decapitación; posteriormente, mediante una disección fina bajo microscopio se extrajeron las porciones sensoriales del oído interno y se identificaron las ámpulas de los canales semicirculares desechando el resto del tejido. En los primeros experimentos el tejido se cortó en segmentos, mismos que se incubaron con papaína (0.25 mg/ml), lo cual nos permitió obtener un alto número de células aisladas en buenas condiciones, a juzgar por su apariencia en el microscopio (Figura 12), además de que otros autores han reportado resultados altamente satisfactorios con ésta técnica (Ohmori, 1984, 1985, 1989; Steinacker y Rojas, 1988). Sin embargo, resultados de nuestro propio laboratorio, derivados del estudio de la respuesta de las fibras aferentes ante la aplicación de agonistas y antagonistas de aminoácidos excitadores, nos han permitido demostrar que el tratamiento de esa preparación con papaína en las mismas concentraciones que usamos para disociar las células ciliadas, hace desaparecer completamente tanto la actividad basal como la evocada por estimulación mecánica del sistema y elimina completamente la respuesta a los agonistas de los receptores a aminoácidos excitadores que, hemos demostrado, cumplen con los criterios para considerarlos como neurotransmisores (Soto y Vega, 1988; Soto y cols., 1993). Adicionalmente, en un estudio de las corrientes de las células ciliadas aisladas de los canales semicirculares de la rana, Armstrong y Roberts (1998) demostraron que esta enzima modifica la cinética de las corrientes de potasio en las células ciliadas; por lo anterior decidimos cambiar la enzima utilizada. Después de varios ensayos obtuvimos buenos resultados incubando las secciones del tejido durante 7 min con colagenasa (0.1 mg/ml) a 30°C en Ringer con la siguiente composición

en mM: NaCl 111; KCl 5; CaCl₂ 1.8; MgCl₂ 1; HEPES 5, ajustado a pH 7.4 con NaOH y una osmolaridad de 240 mOsm posteriormente pasándolos a un Ringer de anfibio libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ el cual le agregamos tripsina (1 mg/ml). Por último, se pone al tejido en Ringer normal con albúmina (1mg/ml) a 4°C durante 5 minutos. Posteriormente se trasladó el tejido a la cámara de registro la cual tiene una capacidad de 0.5 ml y está ubicada en la platina de un microscopio invertido (Nikon Diaphot). Utilizando dos microdisectores de vidrio a los cuales se les han redondeado los bordes mediante la aplicación de calor ligero, se separaron las células ciliadas del resto del epitelio mediante tracción mecánica. Esta metodología nos ha permitido aislar de forma sistemática células ciliadas en buenas condiciones (Figura 13). Una vez aisladas las células, se dejaron durante diez minutos en una solución de Ringer sin flujo a fin de que se adhirieran al vidrio de la cámara de registro.



Figura 13. Células aisladas usando la combinación de colagenasa y tripsina. El cuerpo de las células es refringente y no se ven los organelos intracelulares, señales ambas de que se trata de células en buenas condiciones, las flechas señalan los cilios.

Las células aisladas se perfundieron de manera constante con un flujo de 0.5 ml por minuto mediante el uso de una bomba peristáltica (LKB, Microperpex). La cámara de registro (construida en acrílico) tiene el fondo de vidrio óptico. De esta manera se puede observar individualmente a la célula que se elija para el registro de fijación de voltaje. A un lado del microscopio se montaron dos manipuladores; uno de ellos es un manipulador piezo-eléctrico con capacidad de desplazamiento en tres direcciones (Burleigh PCS-250); este manipulador se utiliza para aproximar el electrodo de registro a la célula. El otro manipulador, también con movimiento en los tres ejes, pero menos preciso, se usó para aproximar una pipeta que permite perfundir diferentes drogas. Para la perfusión de los fármacos utilizamos un sistema de eyección por presión del tipo de los que se utilizan en la microdialisis (BAS Bebe Bee) que permite perfundir con flujo constante; en nuestro caso, utilizamos 20 µl/min.

Para la fijación de voltaje usamos la técnica de clamp de voltaje en la configuración de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

registro de célula completa (Hamil y cols., 1981; Neher y Sakmann, 1976 y 1983). El registro de célula completa permitió definir las corrientes iónicas que determinan la respuesta de una célula excitable ante un estímulo determinado. Utilizamos micropipetas de vidrio de borosilicato de pared delgada y diámetro externo de 1.2 mm, las cuales se fabricaron usando un estirador horizontal (PC-87, Sutter Inst.). Las pipetas, una vez llenas con la solución intracelular, tuvieron una resistencia eléctrica de 3 a 5 M Ω . Éstas se llenaron con una solución que semeja al líquido intracelular (Tabla III). Con el fin de mantener sin dializar el medio intracelular, inmediatamente antes de iniciar el registro se agregó anfotericina 1 mM (Sigma) a la solución intracelular con que se llenaron las pipetas para utilizar la técnica de *patch*-perforado (Rae y cols., 1991). Esta técnica ofrece la ventaja de que se evita la diálisis de los componentes intracelulares y un conjunto importante de metabolitos intracelulares permanecen en la célula durante el registro, manteniendo con ello condiciones que semejan en mayor medida la condición fisiológica de la célula. Esto es especialmente importante sobre todo si pretendemos estudiar modulación de corrientes o efectos mediados por segundos mensajeros. La técnica tiene las desventajas de que la resistencia de acceso es mucho mayor que en la técnica con ruptura completa del parche de membrana, algunas veces resulta más difícil establecer los sellos de membrana, y debe uno esperar un tiempo algunas veces considerable –hasta 10 min– para que se abra adecuadamente la membrana. Para el registro, la pipeta de clamp se conectó a la sonda de un amplificador de fijación de voltaje (Axopatch 2A o Axopatch 200B) y de éste se derivaron los registros de la corriente y los comandos de voltaje. La información así obtenida se llevó a un osciloscopio, a un sistema de grabación y a una microcomputadora. En todos los registros la capacitancia y la resistencia en serie (al 80%) se compensaron electrónicamente. Para obtener los datos acerca de la capacitancia y de la resistencia en serie se aplicaron pequeños pulsos de voltaje desde -70 a -80 mV, para su ulterior análisis. Cuando usamos el programa pClamp 8.0, las mediciones se realizaron de forma automatizada. Todas las mediciones de capacitancia y resistencia en serie se realizaron con los filtros abiertos al máximo. Para los registros de corrientes se impuso un filtrado con corte de frecuencias por arriba de 5 KHz. El potencial de unión se midió experimentalmente en varios ensayos y dio un valor menor a 1 mV (el valor teórico esperado era de 2.5 mV). En los datos que se presentan en la sección de resultados no se restó el potencial de unión ni se realizó corrección alguna por el efecto de la resistencia en serie no compensada.

Para el estudio de la corriente de potasio dependiente de calcio $I_{K, Ca}$ se agregó al Ringer $CdCl_2$

0.5mM. En el estudio de la corriente de calcio I_{Ca} se utilizaron soluciones modificadas con la finalidad de bloquear las demás corrientes (Tabla III).

Para la generación de los pulsos de comando de voltaje y la adquisición de datos se usó un sistema computarizado basado en una computadora tipo PC con un conversor analógico digital Labmaster de 12 bits (Scientific Solutions) o una tarjeta Digidata 1200B (Axon Instruments) y el programa de computación comercial Pclamp (versión 5.0 u 8.0, de Axon Instruments). Los registros se digitalizaron a una frecuencia de muestreo variable según el protocolo experimental; en términos generales se usaron frecuencias de muestreo de alrededor de 2 KHz.

Tabla III Soluciones utilizadas

Soluciones	KCl	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	CdCl ₂	BaCl ₂	CsCl	TEACl	EGTA	Hepes
Extracelulares										
normal 1 a 286*	3,5	111	1	1,8						5
normal 287 a 312*	5	111	1	1,8						5
sin Ca**	5	111							1	5
con Cd**	5	111	1	1,8	.5					5
para estudio Ca**		63		0,9		4,5	22,5	18		0,9
Intracelulares										
Solución Intracelular	KCl	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	ATPMg	EGTA	Hepes	Anfo		
normal 1 286*	110		2	0,134		2	10	1		
normal 287 a 312*	100	10	2	0,134	2	2	10	1		
	CsCl	TEACl	ATPMg	EGTA	Hepes	GTPNa ₂	NMDG			
para estudio Ca**	49,5	27	1,8	9	9	0,09	63			

Concentraciones en mM. *Número de experimento, las soluciones extracelulares se ajustaron a pH 7.4 con NaOH y las intracelulares pH 7.2 con KOH. Osmolaridad de 240 mOsm

El análisis de los datos se realizó de forma computacional mediante el programa Clampfit versión 6.0 u 8.0 (Axon Instruments). Se usaron algunas herramientas de cómputo adicionales como los programas Origin 5.0 (Micrograph) y Sigmaplot 4.0 (Jandel Scientific). Con estas herramientas se construyeron las curvas de corriente en función de voltaje, se hicieron ajustes de curvas, se analizó la cinética de las corrientes y sus propiedades, y se estudiaron los efectos de los diferentes fármacos sobre estas corrientes.

Para definir la dependencia del voltaje, los datos se graficaron en curvas corriente-voltaje normalizadas a las cuales se ajustó una curva de tipo Boltzmann de primer orden de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$f(v) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_i - V_{1/2}}{k}\right)}$$

Morfometría de las células aisladas

Asociado al sistema para fijación de voltaje, se montó en el microscopio invertido una cámara de video de alta resolución (Nec TI-24 CCD) la cual se acopló a una tarjeta digitalizadora de video (Data Translation DT2867 LC). La adquisición y el análisis de imágenes se realizaron mediante el programa GlobalLab Image (Data Translation). Esto permitió adquirir la imagen de cada una de las células que fueron sometidas a los procedimientos de fijación de voltaje. Se estudió la forma de la célula ciliada y se midió su perímetro para calcular su superficie y capacitancia. La capacitancia así calculada se comparó con la obtenida en los registros de clamp de voltaje. Se hizo un análisis de correlación entre las formas de las células ciliadas y el tipo de corrientes que presentan. Para ello, las formas celulares se clasificaron en dos tipos principales: cilíndricas y en forma de ánfora.

Fármacos

En el registro multiunitario extracelular se estudió el efecto de agonistas y antagonistas de los péptidos opioides. Para el estudio de las corrientes evocadas por voltaje en las células ciliadas aisladas solo se estudio la modulación de estas corrientes por agonistas de los receptores a opioides. Entre los agonistas probamos la [D-Ala]-Leucina encefalina*, [D-Ala]-Metionina encefalina*, D-Pen, D-Pen-encefalina (agonistas del receptor δ), [D-Ala², N-Met-Phe⁴, Gly-Ol]-Encefalina* (DAGO agonista de los receptores tipo μ), Naloxona* (antagonista inespecífico), U50-488 (agonista receptor κ). Como antagonistas utilizamos la Flunaltrexamina (antagonista irreversible del receptor μ) y la Nor-Binaltorfina dihidrocloruro (antagonista del receptor κ). * Procedentes de Sigma Chemical Co., el resto fueron adquiridos a Research Biochemicals International. Para el uso de estos fármacos en los experimentos se prepararon soluciones madre, las cuales se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20°C.

Adicionalmente se usaron otros fármacos: CdCl₂ (bloqueador de los canales de calcio), cloruro de tetraetilamonio (TEA) y 4-aminopiridina (4-AP) (bloqueadores de los canales de K⁺), todos provenientes de Sigma Chemical Co.

Para la disociación se utilizaron las siguientes enzimas: papaína (Calbiochem-Novabiochem Corporation) o tripsina y colagenasa (ambas de Sigma Chemical Co.).

En todos los experimentos en que se aplicaron fármacos, se realizaron controles tales como estudiar el efecto de aplicar solución de Ringer, o aplicar el vehículo en que esta disuelto el

fármaco. Particular importancia le dimos al control con Ringer en todos nuestros experimentos, ya que el vestíbulo es un sistema especializado en la detección de estímulos mecánicos, por ello, la sola aplicación de la droga independientemente de cualquier efecto farmacológico puede constituir un estímulo mecánico que afecte la actividad de las neuronas aferentes. En todos nuestros experimentos tuvimos este hecho bien presente y en los casos en que el sistema respondió a la aplicación de la solución salina se busco posicionar el sistema de aplicación hasta asegurar que no había respuestas mecánicas. En los experimentos de fijación de voltaje en células aisladas se realizaron también controles microperfundiendo solución salina.

Inmunohistoquímica.

Se decidió estudiar la presencia y distribución de péptidos opioides en el oído mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas. Para estos experimentos se usaron 18 ajolotes con un peso aproximado de $40 \pm 10g$. Se trabajó con lotes de tres ajolotes. Los ajolotes se anestesiaron por inmersión en una solución al 0.1% de ácido etil-ester 3 aminobenzoico durante aproximadamente 15 minutos, comprobando que hubieran perdido el reflejo de enderezamiento como índice del nivel de anestesia. Posteriormente se les perfundió por vía intracardiaca con Ringer normal de anfibio hasta pasar 200 ml de solución. A continuación se procedió a fijar los animales, para lo que se perfundieron con una solución de paraformaldehído al 4% disuelto en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M con un pH de 7.4.

La disección se realizó en una campana de extracción, en la forma ya descrita para obtener la preparación de vestíbulo aislado, manteniendo la preparación en la solución de paraformaldehído al 4%; una vez aislado el vestíbulo se mantuvo durante 3 horas en la misma solución para su posfijación.

Posteriormente, para evitar el daño del tejido durante el proceso de congelación, se colocaron las preparaciones en soluciones con concentración creciente de sacarosa al 12%, 16% y 18% durante al menos media hora en cada una de ellas; los tejidos se separaron en dos bloques, en el primer bloque se cortó el canal semicircular posterior el sáculo y la lagena; el otro bloque estuvo formado por los canales anterior y lateral y el utrículo. Los tejidos fueron incluidos en Tisutec™ sobre el portamuestras de un micrótopo. Una vez congelada la muestra, los tejidos se cortaron usando un crióstato (Leica Frigocut 2800). La temperatura de la cámara se mantuvo a $-20^{\circ}C$; los tejidos se orientaron sobre la platina del micrótopo y se cortaron con un grosor de 15 a 20 μm .

Fueron recogidos en portaobjetos cubiertos con gelatina cromoalúmina. Los portaobjetos para el montaje de los cortes se prepararon limpiándolos primeramente con alcohol, sumergiéndolos en una solución de cromoalúmina con gelatina y limpiándoles una de sus caras. Los portaobjetos se colocaron verticalmente y al día siguiente se procedió a sumergirlos nuevamente en la misma solución y limpiando la misma cara, de esta forma el tejido se adhiere mejor a la superficie.

Los cortes fueron colocados en forma seriada en ocho portaobjetos para cada bloque, ordenando en la orilla cercana al bisel los cortes procedentes del primer ajolote, en el centro del segundo y a otro extremo los cortes del tercer ajolote: las diferentes laminillas fueron asignadas de forma aleatoria a los grupos problema y a los controles, de tal manera que quedaran distribuidos tanto en el cubreobjetos en el que se realizarían las pruebas de inmunofluorescencia como en los dos controles, en los que se colocaría el anticuerpo primario preadsorbido o sólo el segundo anticuerpo (fluoresceína conjugada con IgG de cabra anticonejo).

Para las pruebas de inmunohistoquímica se utilizaron juegos de inmunofluorescencia con las siguientes características: anticuerpos policlonales para Leu-encefalina (Kit No. IFK-8601), Dynorfina A 1-8 (Kit No. IFK-8697) y Beta-endorfinas (Kit No. IFK-8843) adquiridos en Peninsula Laboratories Inc. En todos los casos se realizaron los siguientes controles: incubación con el anticuerpo primario preadsorbido e incubación únicamente con el segundo anticuerpo.

Las reacciones inmunohistoquímicas se desarrollaron de acuerdo con el siguiente protocolo:

- a) El tejido se llevó a temperatura ambiente.
- b) Se lavó el tejido 3 veces por 10 min con buffer fosfato salino con Tritón 100 0.3%.
- c) Se secaron los cortes.
- d) Se bloquearon sitios de unión inespecíficos con 20 μ l de suero fetal de caprino con Tritón X-100 al 0.3% por 30 min. a 37° C en cámara húmeda.
- e) Nuevamente se secaron los cortes.
- f) Se aplicaron 200 μ l del antisuero primario hidratado con buffer fosfato adicionado con Tritón X-100 al 0.3% obteniendo una dilución final de 1:400. Se realizaron los controles negativos descritos, por lo que en algunos portaobjetos se omitió uno u otro anticuerpo.
- g) Los cortes fueron incubados a 4°C por 24 horas en la cámara húmeda.
- a) Los cortes se lavaron 3 veces por 10 min con buffer fosfato con Tritón X-100.
- b) Se eliminó el exceso de buffer fosfato de los cortes con papel absorbente.
- c) Se aplicaron 200 μ l del anticuerpo secundario, en una concentración de 1:100 diluido en buffer

fosfato con Tritón X-100 al 0.3% y se incubaron los cortes a temperatura ambiente por 60 min en un cuarto oscuro.

d) Los cortes fueron lavados 3 veces con buffer fosfato.

e) Se eliminó el exceso de buffer fosfato y se cubrieron los portaobjetos con resina especial para fluorescencia VectaShield (Vector Labs).

Las preparaciones se observaron usando un microscopio equipado con un sistema de epifluorescencia (Zeiss Axioplan). Debido a las características de los fluoróforos, se utilizó una lámpara de mercurio HBO de 50 Watts, con filtro de excitación de 490 nm y de emisión a 520 nm. Las preparaciones se fotografiaron usando el sistema de microfotografía del microscopio y película positiva de alta sensibilidad (Kodak Ektachrome 400). Para fines de impresión, las diapositivas se digitalizaron usando un *scanner* de alta resolución de 36 bits (Expression 836 XL, Epson). Las imágenes así adquiridas fueron convertidas a escala de grises usando el programa Adobe Photoshop 5.0. Para la impresión final de las imágenes se ajustaron el brillo y contraste y no se realizó ningún otro tipo de manipulación digital. Las imágenes fueron impresas usando una impresora con resolución de 1200 puntos por pulgada (Optra 1200B, Lexmark) en papel satinado especial para fotografía (Hewlett Packard).

Un grupo de preparaciones fueron observadas en un microscopio confocal (Nikon)², haciendo cortes ópticos de 1 μm y las imágenes respectivas fueron digitalizadas mediante el sistema de adquisición de datos Metafluor (Nikon Imaging) en forma de archivos con formato TIF, los cuales fueron posteriormente manejados en el laboratorio de la misma forma que se describió anteriormente.

Determinación de péptidos derivados de la proencefalina por radioinmunoensayo (RIA)

Estas determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Fisiología de la BUAP en colaboración con el Dr. Osvaldo Vindrola y siguiendo procedimientos previamente establecidos en su laboratorio.³

Se usaron ajolotes en estado larvario que se sacrificaron y se disecaron como previamente

² Agradecemos el apoyo de Técnica en Laboratorios SA de CV, representante en México de Nikon, quienes nos permitieron usar un microscopio de demostración para el análisis de estas muestras.

³ Cabe esta aclaración particularmente por el hecho de que tanto el director de la tesis como el estudiante tenemos ambos una formación esencialmente como electrofisiólogos, por ende la colaboración y dirección del trabajo bioquímico estuvo esencialmente a cargo del Dr. Osvaldo Vindrola quien cuenta con experiencia en este campo.

descrito. El oído interno de los ajolotes fue suspendido en 5 volúmenes de ácido acético 1 M conteniendo 50 mM de HCl. Los tejidos se hirvieron durante 15 min y se homogeneizaron por 3 min usando un *polytron*. Posteriormente, los homogenados se centrifugaron a una velocidad de 18,000 g durante 1 hr en una centrifuga preparativa Sorvall. El sobrenadante se almacenó en tubos de polipropileno a -20 °C hasta su ulterior procesamiento.

Cromatografía de filtración en gel

Se usó una columna de Sephadex G-50 equilibrada con ácido acético 1 M y 50 mM e HCl. La columna se eluyó a una velocidad de 0.2 ml/min a temperatura ambiente. Se recolectaron fracciones de 3 ml las cuales fueron monitoreadas con un detector UV. En la cromatografía se usaron los siguientes marcadores de peso molecular: hemocianina (V_0), proencefalina bovina 1 - 77 (8.5 kDa), aprotinina (6,5 kDa), amidorfina (3.0 kDa), [Tr^{63}]sinencefalina 63-70 (1.0 kDa) y encefalina (0.5 kDa).

Después de la separación de los péptidos presentes en el tejido, cada una de las fracciones fue sometida a digestión enzimática secuencial con la finalidad de romper los sitios dibásicos que delimitan a los péptidos activos y cuantificar la encefalina total (Padros et al., 1989; Saravia et al., 1993; Saravia et al., 1998). La digestión enzimática se realizó de forma secuencial con tripsina 20 $\mu\text{g/ml}$ durante 16 hrs a 37 °C al término de las cuales se inactivó la enzima por calor. Posteriormente, con el fin de remover el carboxi terminal de los péptidos, se agregó carboxipeptidasa B 0.1 mg/ml y se incubó durante 1hr a 37 °C. Finalmente la enzima se inactivó por calor.

Radioinmunoensayo (RIA)

La inmunorreactividad a met-, leu- encefalina y sinencefalina total y libre fue determinada por RIA siguiendo el procedimiento descrito previamente por Vindrola (Vindrola y cols, 1998). Los antisueros utilizados tuvieron las siguientes características: el antisuero para met-encefalina reacciona 100% con met-encefalina oxidada, 0.3% con leu-encefalina y menos del 0.01% con la dinorfina met-encefalina-Arg (1-13), α , γ y β -endorfina. La sensibilidad del ensayo fue 0.06 pmol, el IC_{50}^4 fue de 0.24 pmol y el IC_{20}^5 de 1.24 pmol (Rosete, 1999). El antisuero para

⁴ IC_{50} cantidad de antígeno marcado que desplaza el 50% de antígeno no marcado.

⁵ IC_{20} cantidad de antígeno marcado que desplaza el 20% de antígeno no marcado.

sinencefalina 63-70 [Ti^{63}] no mostró reactividad cruzada con met-enkefalina, met-enkefalina-Arg, met-enkefalina-Arg-Phe, met-enkefalina-Arg-Gly-Leu, leu-enkefalina, péptido E y F, dinorfina B, amidorfina y metorfamida. Su sensibilidad fue 0.04 pmol, el IC_{50} fue de 0.17 pmol y el IC_{20} de 0.76 pmol (Rosete, 1999). Finalmente, el antisuero para leu-enkefalina (obtenido por Vindrola en 1984) despliega una reactividad cruzada de 5.5% con met-enkefalina, menos del 0.01% con met-enkefalina oxidada y 1.4% con la dinorfina (1-13). No presentó reactividad con α , γ y β -endorfina. Su sensibilidad fue 0.09 pmol, el IC_{50} fue de 0.51 pmol y el IC_{20} de 3 pmol (Rosete, 1999).

Los resultados de las concentraciones en pg de la met-, leu-enkefalina y sinencefalina inmunorreactivas (IR-leu, IR-met y IR-sinencefalina) obtenidos de la lectura en el contador gamma, fueron calculados en pmol/fracción. Los datos fueron graficados contra el número de fracción del corrimiento cromatográfico.

RESULTADOS

Modulación de la descarga de neuronas aferentes vestibulares por agonistas y antagonistas de los receptores a opioides

Al estudiar los efectos de la naloxona en concentraciones de 10 nM a 1 mM, se encontró que produce un incremento de la frecuencia de descarga de las fibras aferentes vestibulares ($n = 54$), teniendo su máximo efecto a la concentración de 1 μ M. La descarga basal de las neuronas aumenta hasta en 130% con respecto al control (Figura 14). Como se muestra en la figura 14 el efecto excitador de la naloxona es lento, llegando a su máximo aproximadamente 30 segundos después de aplicada la droga y con una duración mayor a los 8 minutos. A concentraciones superiores de 10 μ M a 1 mM el aumento en la frecuencia de descarga basal fue menor, siendo en

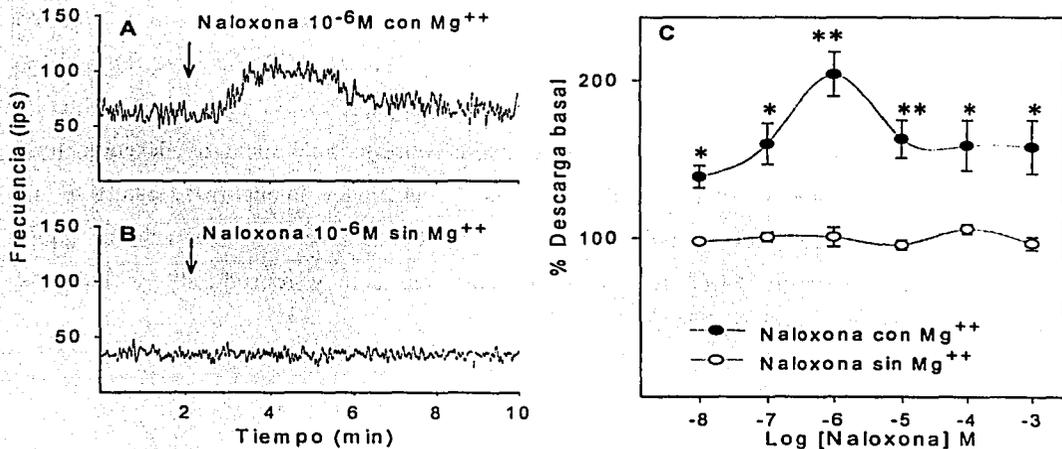


Figura 14. En estas gráficas se muestra el efecto de la naloxona sobre la frecuencia de descarga basal de las fibras aferentes vestibulares. En A y B, gráficas de frecuencia contra tiempo en las que luego de 2 min de registro control se aplicó por microperfusión 20 μ l de naloxona 1 μ M. En A, la naloxona produjo un incremento de 130% en la descarga de las aferentes. En B, se eliminó el magnesio de la solución Ringer con que se perfundió la preparación. En este caso, la naloxona no produjo ningún efecto significativo. En C, curva dosis efecto de la acción de naloxona en las aferentes vestibulares. El efecto de naloxona tiene una dependencia no sigmoidea de la dosis; esto se debe probablemente a que es una antagonista inespecífico, con afinidad por los diversos tipos de receptores opioides (cada punto representa la media \pm DS con una n mayor a 5 para cada punto). *= $p > 0.01$, **= $p > 0.001$.

este caso solo del 50%. La curva dosis efecto para naloxona no mostró un efecto dependiente de la dosis, probablemente debido a que este antagonista se une a los tres tipos de receptores a opioides con diferente afinidad.

Por razones ajenas a este trabajo, en algunos experimentos farmacológicos relacionados con el efecto de agonistas y antagonistas del glutamato, decidimos utilizar un Ringer que tenía como amortiguador fosfatos y bicarbonato y en el cual se excluyó el Mg^{++} . En esa serie experimental se estudió el efecto de naloxona observando que esta no tenía efecto. Esta observación nos llevó a estudiar la influencia de varios amortiguadores -HEPES, TRIS y fosfatos-bicarbonato- sobre la respuesta de las aferentes vestibulares. Encontramos que los diversos amortiguadores no ejercen ningún efecto significativo sobre la actividad basal y la respuesta de las aferentes vestibulares a los estímulos mecánicos. Sin embargo, el análisis de los resultados nos sugirió la posibilidad de que el Mg^{++} estuviera influyendo significativamente tanto la actividad basal como la evocada de las aferentes vestibulares. Es así como decidimos estudiar la influencia que, sobre las respuestas evocadas por aminoácidos excitadores (Vega y cols., 1990) y sobre la respuesta a la naloxona, tenía el añadir este ion al Ringer. Se probó la naloxona en Ringer sin Mg^{++} ; en la figura 14 se muestran dos histogramas de frecuencia contra tiempo en los que se probó naloxona 1 μM , con y sin Mg^{++} ; en el primer caso, se observó incremento sobre la frecuencia de descarga basal causado por la naloxona; sin embargo al eliminar el Mg^{++} del Ringer no encontramos efecto ante la aplicación de naloxona. Esta ausencia de efecto de la naloxona sobre las preparaciones, que se perfundieron en Ringer sin Mg^{++} fue un fenómeno consistente y reproducible a todas las concentraciones (Figura 14C)

Receptor δ

Se sabe que las encefalinas se unen con mayor afinidad al receptor δ ; por este motivo decidimos estudiar el efecto de la [D-ala²]-metionina-encefalina (DAME) y la [D-ala²]-leucina -encefalina (DALE), que son péptidos con una cierta selectividad por el receptor δ . Con la DALE (n = 43) en concentraciones de 0.1 nM a 10 mM se encontró un efecto bifásico muy débil: en concentraciones menores de 0.1 μM se produjo una disminución de hasta el 25% de la descarga basal; en concentraciones mayores a 0.1 μM el DALE aumentó la frecuencia de descarga en un 25%. En contraste, el DAME (n = 35) produjo el efecto contrario: a bajas dosis, menores 0.1 μM ,

incrementó la descarga de las aferentes vestibulares hasta un 50%, y a concentraciones mayores a 10 μM , disminuyó hasta 50 % la descarga basal de las fibras aferentes.

Para aclarar adecuadamente el papel funcional del receptor δ en el sistema vestibular decidimos utilizar agonistas y antagonistas más específicos de este receptor, escogimos a la D-pen D-pen-encefalina ($n = 31$) como agonista y al naltrindole ($n = 23$) como antagonista. Ambas drogas se probaron en concentraciones de 1 nM a 10 mM. Para todo el rango de concentraciones utilizadas, estas drogas no modificaron significativamente la frecuencia de descarga basal ni la evocada mecánicamente de las fibras aferentes vestibulares (Figura 15).

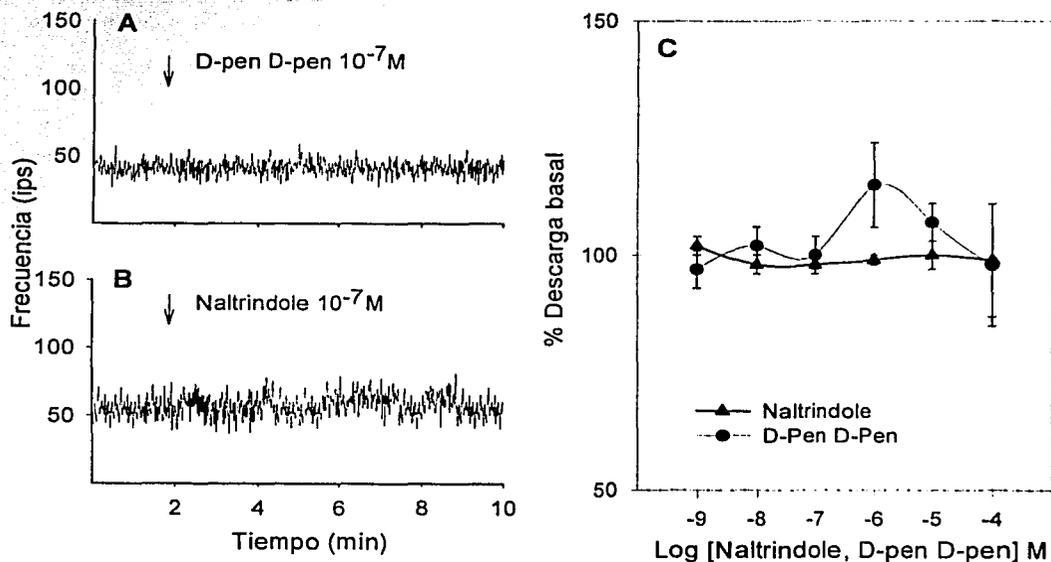


Figura 15. Efecto de D-pen D-pen-encefalina y naltrindole. En A y B, gráficas de frecuencia contra tiempo de la descarga de las fibras aferentes vestibulares. Después de dos minutos de control se probaron las drogas. En A, la aplicación de D-pen D-pen-encefalina 0.1 μM . En B, la aplicación de naltrindole 0.1 μM . En ambos casos se puede observar que no hubo un cambio significativo de la frecuencia de descarga control. En C, gráficas dosis-efecto para ambos fármacos. Se puede observar que a ninguna de las concentraciones utilizadas los agonistas y antagonistas del receptor δ producen cambios significativos sobre la descarga de las aferentes vestibulares (cada punto representa la media $\pm\text{SD}$ con una n mayor a 5 para cada punto).

Receptor μ

El [D-Ala²,N-Met-Phe⁴,Gly-Ol]-Enkefalina (DAGO, agonista del receptor μ) se estudió en un total de 42 preparaciones en concentraciones de 0.1 nM a 0.10 μ M. El DAGO incrementó la frecuencia de descarga de las aferentes vestibulares, alcanzando el máximo efecto a una concentración de 10 μ M, que produjo hasta un 190% de incremento de la frecuencia con respecto al control. El DAGO tuvo un efecto excitatorio que fue significativo desde 0.1 nM. La CE₅₀ para esta sustancia fue de 1.3 nM. El efecto excitador del DAGO alcanzó su máximo alrededor de un minuto después de su aplicación y fue de larga duración alcanzando en algunas preparaciones la hasta más de 10 minutos (Figura 16).

La funaltrexamina (funa) que es un antagonista específico no reversible del receptor μ , se probó en concentraciones de 10 nM a 10 μ M (n = 23), el efecto de este antagonista se estudio

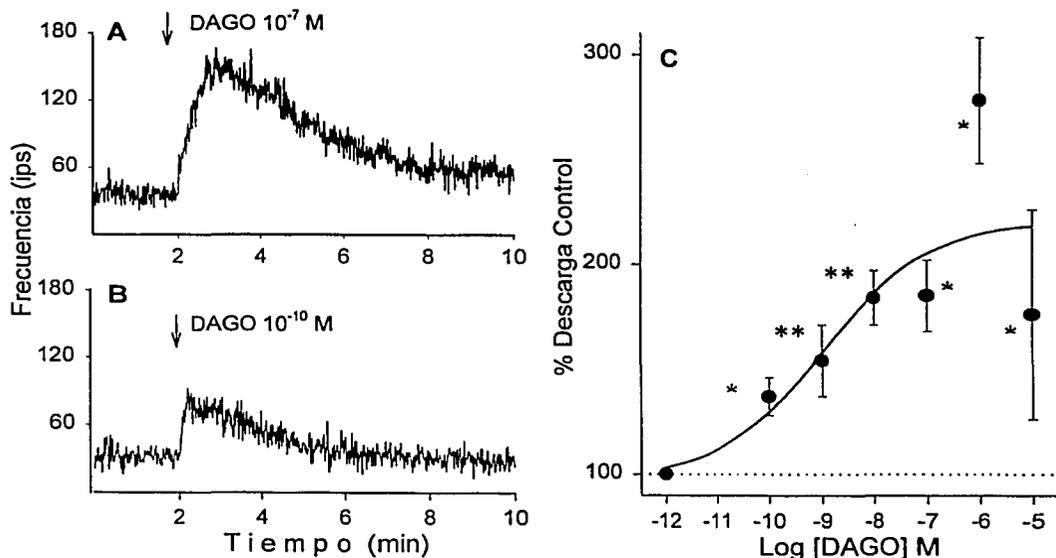


Figura 16. Acción del DAGO sobre la descarga de las aferentes vestibulares. En A y B, gráficas de frecuencia contra tiempo que muestran el efecto típico del DAGO sobre la descarga de las aferentes vestibulares. Se puede observar que el efecto excitador del DAGO alcanzó su máximo alrededor de un minuto después de su aplicación y fue de larga duración, llegando en algunas preparaciones hasta más de 10 minutos. En C, curva dosis-efecto para el DAGO, se puede observar que a partir de 0.1 nM tuvo un efecto excitador significativo, con una CE₅₀ de 1.3 nM. Para concentraciones mayores a 1 μ M el efecto excitador del DAGO decrece (cada punto representa la media \pm SD con una n mayor a 5 para cada punto). *= $p > 0.01$, **= $p > 0.001$.

tanto sobre la descarga espontánea como en su capacidad para antagonizar el efecto provocado por el DAGO.

La funaltrexamina fue capaz de disminuir hasta en un 90% la descarga espontánea de las fibras aferentes vestibulares, con una $CI_{50} = 3.7 \mu M$. Su efecto aparece después de 3 minutos de administrada la droga. Este efecto fue parcialmente reversible y aun después de una hora de lavado de la preparación con Ringer normal, la frecuencia de descarga no se recuperó completamente. En otra serie de experimentos estudiamos la interacción de DAGO (1 y $10 \mu M$) con la funaltrexamina 0.1 mM . Cuando se aplicó funaltrexamina 0.1 mM por perfusión en el baño y dos minutos después se aplicó DAGO por microperfusión, se eliminó totalmente el efecto provocado por DAGO tanto a 0.1 como a $10 \mu M$. La acción antagonista de la funaltrexamina sobre las respuestas provocadas por el DAGO fue dependiente de la concentración (Figura 17).

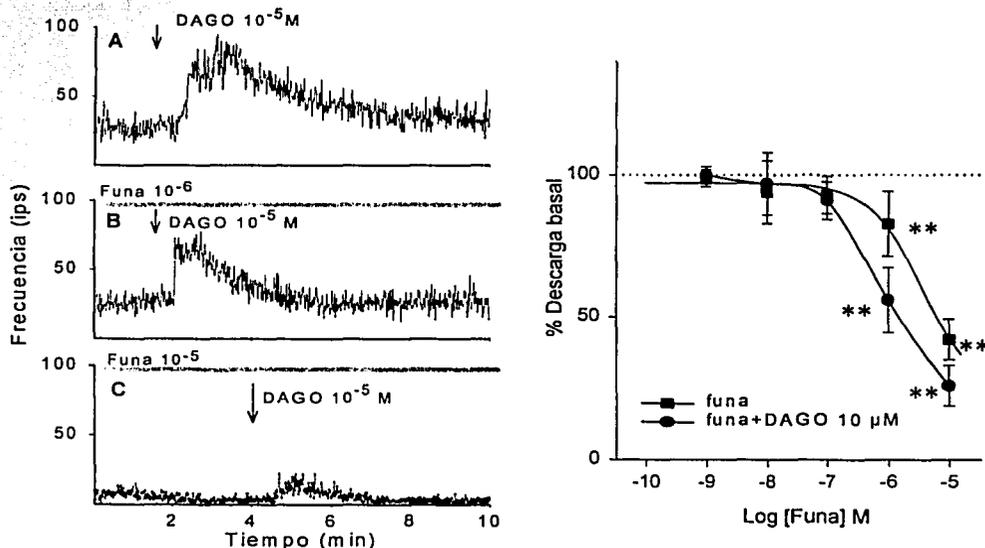


Figura 17. Acción de la funaltrexamina (funa) sobre la descarga de las aferentes vestibulares. En A, efecto producido por la aplicación de un pulso de $20 \mu l$ de DAGO $10 \mu M$. En B, se perfundió la preparación con funa $1 \mu M$, la cual produjo una ligera disminución $\approx 10\%$ de la descarga basal. Luego de dos minutos se aplicaron $20 \mu l$ de DAGO. En C, se repitió una maniobra semejante, pero en este caso se perfundió funa $10 \mu M$. En ambos casos se observa que la aplicación previa de funa en el baño disminuye claramente la respuesta inducida por el DAGO. En D, curva dosis-efecto para funa tanto sobre la descarga espontánea como sobre el efecto evocado por DAGO. Funa fue capaz de disminuir hasta en un 75% la descarga espontánea de las fibras aferentes vestibulares, con una $CI_{50} = 3.7 \mu M$, y el incremento sobre la descarga basal causado por la aplicación de DAGO $10 \mu M$

Receptor κ

Usando el U50488 (agonista del receptor κ) en concentraciones de 1 nM a 10 μ M, encontramos que produce una disminución de hasta el 95% en la frecuencia de la descarga basal de las fibras aferentes vestibulares ($n = 34$) con una CI_{50} de 40 nM. El efecto máximo de este agonista se

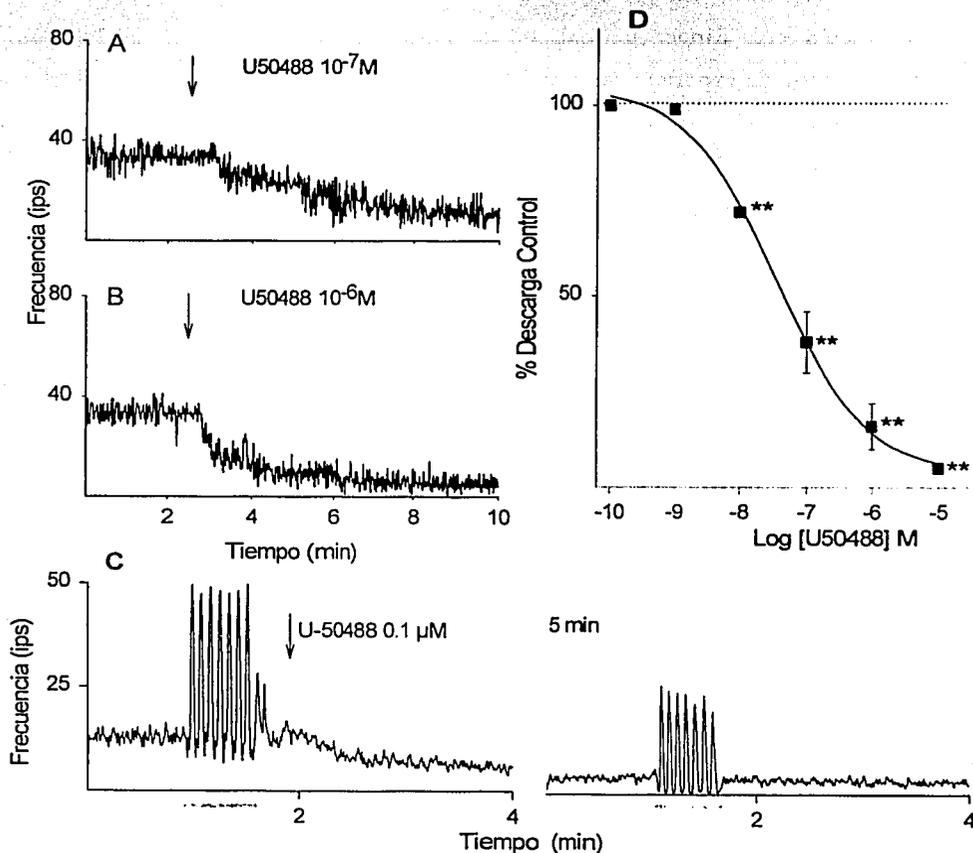


Figura 18. Acción del agonista κ U50488 sobre la actividad eléctrica de las aferentes vestibulares. En A y B, gráficas de frecuencia contra tiempo que muestran el efecto inhibitorio típico del U50488 en concentraciones de 0.1 y 1 μ M sobre la actividad basal. El efecto máximo de este agonista se alcanza después de 10 minutos y dura más de 20 minutos. En C, gráficas de frecuencia contra tiempo que muestran el efecto del U50488 en concentraciones de 0.1 μ M sobre la actividad basal y la evocada por estímulos sinusoidales (línea gris bajo la gráfica). En D, curva dosis-efecto para el U50488. Puede observarse la notable potencia inhibitoria de este fármaco que, a concentración de 10 nM, produjo ya un efecto significativo (cada punto representa la media \pm SD $n > 5$ para cada punto). ** = $p > 0.001$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

alcanzó después de 10 minutos de administrada esta droga y duró más de 20 minutos; en algunos casos no se recuperó la descarga basal aun después de una hora de lavado (Figura 18). La acción de U50488 fue estadísticamente significativa desde concentraciones de 10 nM. El U50488 no solamente inhibe la actividad basal de las aferentes vestibulares, sino que igualmente bloquea la respuesta a estímulos mecánicos (Figura 18D).

La Nor-binaltorfimina (antagonista del receptor κ) se probó en concentraciones de 10 nM a 100 μ M ($n = 32$); esta droga incrementó hasta en un 200% la frecuencia de descarga de las fibras aferentes vestibulares con respecto al control con una $CE_{50} = 5 \mu$ M. El efecto máximo se logró con una concentración de 100 μ M; el incremento en la descarga basal se alcanzó en los primeros segundos después de administrada la droga y persistió por lo menos 8 minutos (Figura 19).

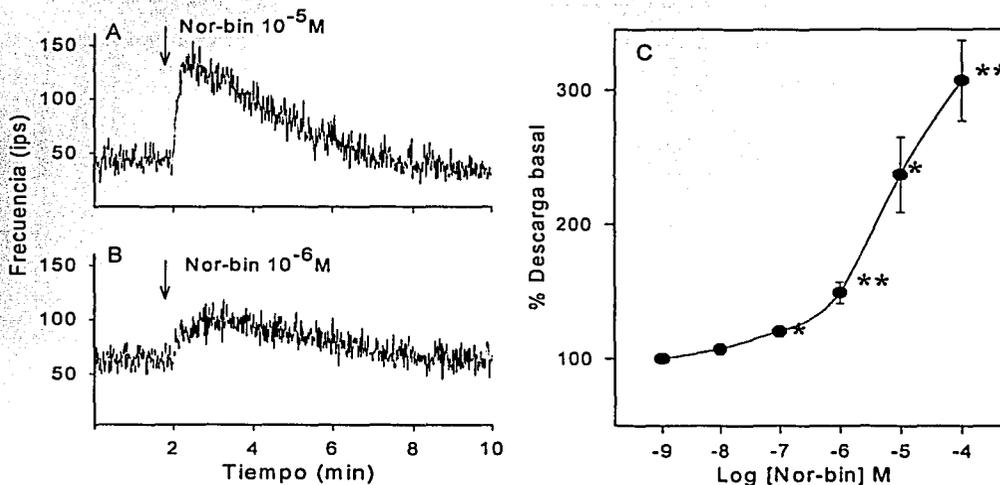


Figura 19. La acción de la Nor-binaltorfimina (Nor-bin) se probó en concentraciones de 10 nM a 100 μ M ($n=32$). Esta droga produjo un efecto excitador potente, tal como se muestra en A y B. A concentración de 10 μ M, Nor-bin produjo un incremento con respecto al control de 250% en la frecuencia de descarga de las fibras aferentes vestibulares. Su efecto alcanzó el máximo alrededor de 1 min luego de la microaplicación y tuvo una duración cercana a los 8 min. En C, curva dosis-efecto para la Nor-bin. Se encontró una relación ligeramente sigmoidea que no muestra saturación del efecto a las concentraciones máximas usadas en este trabajo (cada punto representa la media \pm SD con una n mayor a 5 para cada punto). *= $p > 0.01$, **= $p > 0.001$.

Sensibilización aguda

Con el fin de profundizar en el significado funcional de los receptores a opioides en el sistema vestibular, decidimos estudiar si es factible que la preparación del oído interno aislado fuera sensibilizada a los péptidos opioides por la administración sostenida de un antagonista durante un periodo de 30 min. Se ha demostrado que estos fenómenos de sensibilización son un indicador altamente confiable de la participación de receptores opioides en diversas preparaciones, y se piensa que el fenómeno de sensibilización constituye uno de los mecanismos que originan la dependencia física (Adams y Holtzman, 1990 a, b).

Encontramos que la aplicación en el baño de DALE a $0.1 \mu\text{M}$ por 30 minutos redujo la actividad basal en un 20% sin modificar significativamente su respuesta ante los estímulos mecánicos. Si luego de 30 minutos de perfusión con el DALE a $0.1 \mu\text{M}$ se aplica naloxona, se encuentra que la respuesta a esta última presenta un incremento del 300% sobre la respuesta control, indicando que la perfusión del agonista opioide produce una sensibilización del sistema ante el antagonista (Figura 20).

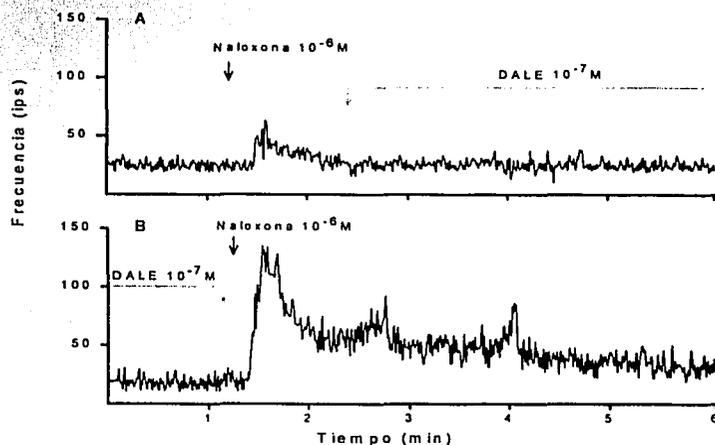


Figura 20. Estudio de la sensibilización de los receptores a opiodes. En A, la aplicación de $20 \mu\text{l}$ de naloxona $1 \mu\text{M}$ incrementó en un 75% la frecuencia de descarga basal, posteriormente se perfundió la preparación durante 30 minutos con D-ala Leu-encefalina. En B, se puede observar un decremento del 20% de la descarga basal durante la perfusión con DALE; inmediatamente después del lavado se probó nuevamente la naloxona $1 \mu\text{M}$ y se observó que el efecto sobre la frecuencia de descarga evocado por la aplicación de naloxona se incrementó 300% en amplitud y aumentó significativamente su duración.

Interacciones con antagonistas colinérgicos.

A fin de definir si los péptidos opioides actúan a nivel de las neuronas eferentes modificando la liberación del neurotransmisor, se estudió el efecto que tiene la perfusión de antagonistas colinérgicos sobre la respuesta evocada por la naloxona. Para ésto se hizo un control inicial en el que se observó el efecto de la aplicación de 20 μ l de naloxona 100 μ M; posteriormente se perfundieron la d-tubocurarina y la atropina como antagonistas colinérgicos nicotínico y muscarínico respectivamente. La aplicación de atropina en el baño en concentración de 100 μ M y de d-tubocurarina en concentración 100 μ M (n = 4) no modificó significativamente la acción excitadora de la naloxona (Figura 21). Debido a que ambas drogas anticolinérgicas no tuvieron conjuntamente efecto significativo, no se estudiaron de manera individual.

Experimentos de fijación de voltaje

Con el fin de tratar de definir el sitio de acción de los péptidos opioides, decidimos analizar sus efectos sobre las corrientes iónicas en células ciliadas aisladas. Para ello hemos realizado experimentos de fijación de voltaje en 310 células ciliadas aisladas de las crestas de los canales semicirculares del oído interno del ajolote. Para aislar las células del neuroepitelio del oído interno utilizamos enzimas que producen una digestión parcial del tejido. Las primeras 200 células se obtuvieron utilizando papaina 0.25 mg/ml, lo cual nos permitió aislar células en buenas condiciones a juzgar por su apariencia en el microscopio y por la amplitud de sus corrientes. Sin embargo, el uso de papaina para la disociación de estas células ha sido cuestionado por otros grupos de investigación, y en nuestro laboratorio hemos encontrado que la papaina hace desaparecer completamente la actividad basal y la evocada por estimulación mecánica del sistema. Por lo que decidimos cambiar la enzima por colagenasa 0.1 mg/ml y tripsina 1 mg/ml metodología que nos ha permitido aislar de forma sistemática células ciliadas en buenas condiciones.

Características electrofisiológicas y morfología de las células ciliadas

En nuestros experimentos encontramos que a pesar de existir en nuestra preparación solo células ciliadas tipo II, morfológicamente se pueden diferenciar claramente dos tipos de células ciliadas: en forma de ánfora y cilíndricas. El tamaño de estas células varió desde 757 hasta 1787 μ m², con una media de 1275 \pm 240 μ m².

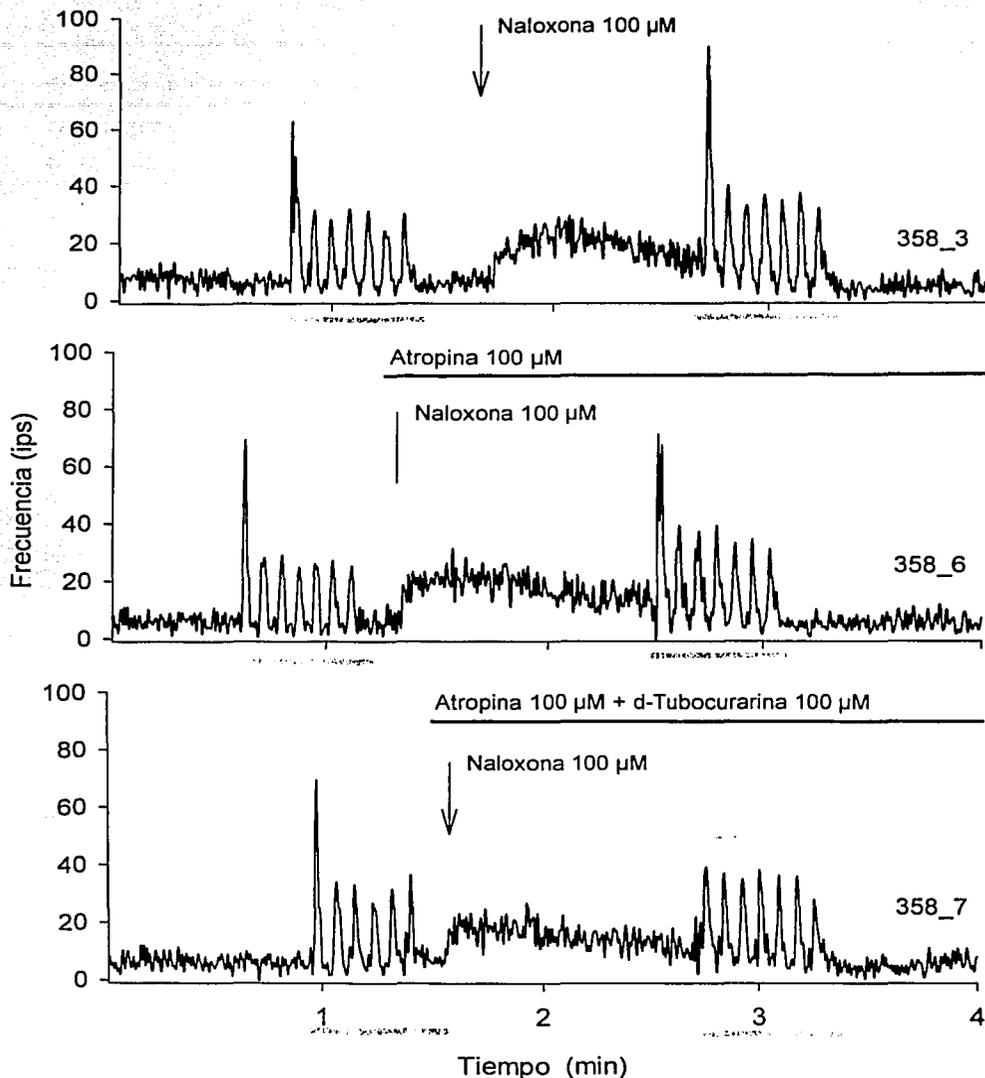


Figura 21. Estudio de las interacciones de los péptidos opioides y agonistas colinérgicos. En A, efecto de la naloxona (20 μ l) sobre la descarga basal y la provocada por estímulos mecánicos (barra negra). Luego de la aplicación de naloxona 100 μ M se observa un incremento de la frecuencia basal y un ligero aumento de la respuesta a los estímulos mecánicos. En B, luego de 10 minutos de perfusión con atropina 100 μ M en el baño (puede observarse que la atropina *per se* no produce ningún efecto significativo), se aplican nuevamente 20 μ l de naloxona 100 μ M. En C, se perfundió la preparación con atropina 100 μ M y d-tubocurarina 100 μ M y nuevamente se probó el efecto de naloxona 100 μ M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

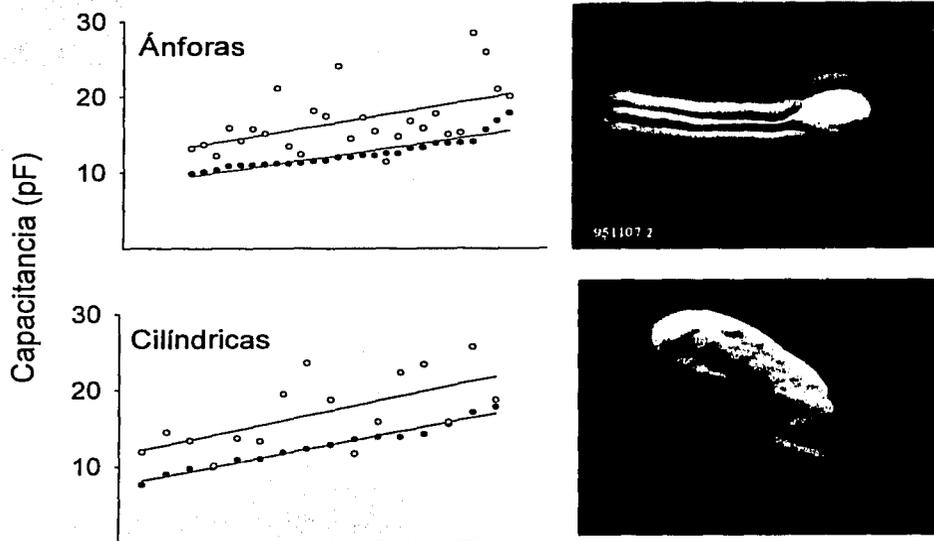


Figura 22. Valores de la capacitancia medida en 50 células. En la parte superior los resultados corresponden a células con forma de ánfora y en la inferior a las cilíndricas. En ambos casos los puntos negros corresponden al cálculo de la capacitancia con base en el área de la célula, y los puntos blancos al valor obtenido al abrir la célula y pasar a la configuración de célula completa en la fijación de voltaje. Las líneas representan un ajuste de regresión lineal a los valores. Para las gráficas los datos se ordenaron de menor a mayor usando como criterio su capacitancia morfológica.

La capacitancia de las células ciliadas medida eléctricamente varió entre 9.67 y 28.34 pF, con una media de 16.79 ± 4.32 pF ($n = 50$), resultando 30% mayor que la calculada por el área de membrana de las células (Figura 22). Es claro que por la medición morfológica estamos subestimando la capacitancia en un valor constante, pensamos que este valor corresponde a la capacitancia que contribuye el haz de cilios y que no estamos evaluando en las microfotografías.

En relación con las características de las corrientes iónicas no encontramos ninguna correlación significativa y sistemática entre el tipo de corrientes o su magnitud, y la forma de las células ciliadas. Por esta razón, las corrientes iónicas de las células ciliadas se analizaron sin hacer referencia a la forma de las células y se presentan todas agrupadas.

Corrientes iónicas dependientes de voltaje en las células ciliadas

Hemos encontrado que al igual que en otras células ciliadas, en estas dominan las corrientes salientes de potasio. Tal como se ha reportado en otros sistemas, no hemos encontrado en nuestras células ninguna evidencia que sugiera la existencia de corrientes entrantes de Na^+ . Las corrientes salientes que hemos podido identificar en nuestras células son: la corriente rectificante de salida tardía tipo $I_{K,DR}$, la corriente transitoria de salida tipo $I_{K,A}$, la corriente de K^+ dependiente de Ca^{++} , $I_{K,Ca}$.

Respecto a las corrientes, entrantes hemos encontrado una corriente de Ca^{++} tipo $I_{Ca,L}$, de alto umbral que no se inactiva una corriente de Ca^{++} de bajo umbral con inactivación (probablemente de tipo R o T, aunque no hemos realizado aún una caracterización que nos permita definirlo) y, en el 60% de las células, hemos identificado un rectificador de entrada con activación rápida $I_{K,IR}$

$I_{K,DR}$: Esta corriente se encuentra presente en todas las células registradas hasta ahora por nosotros. Para estudiar el rectificador retardado se utilizaron métodos farmacológicos y electrofisiológicos con resta de corrientes. En el primer caso, se usaron datos provenientes de preparaciones en las que se perfundió con 4-AP y Cd^{++} o Cd^{++} y TEA. En el segundo caso, las corrientes obtenidas con protocolos de fijación de voltaje con un potencial de retención de -30 mV y pulsos crecientes de 10 mV desde -100 hasta 40 mV con una duración de 400 ms, se restaron de protocolos en los que se evocaron las corrientes de la misma manera, pero con potencial de retención de -100 mV. Estos procedimientos permitieron distinguir la $I_{K,A}$ de la $I_{K,DR}$ (Figura 23). En el ajolote, la activación de la $I_{K,DR}$ es más rápida que lo descrito para la rana (Russo, Marcotti y Prigioni, 1996) y la corriente llega al máximo de amplitud de entre 3 y 7 ms con una $\tau_m = 1.03$ a 0.81 ms ($n = 50$), medida desde -40 a 50 mV, ya que la τ_m activación para $I_{K,DR}$ no mostró dependencia de voltaje. La $I_{K,DR}$ se activa entre los 50 y 60 mV y su amplitud es dependiente del voltaje. Tal como se ha descrito para la rana (Russo, Marcotti y Prigioni, 1996), en el ajolote esta corriente presenta también una inactivación muy lenta cuya cinética se ajusta a una $\tau > 250$ ms. La corriente puede ajustarse adecuadamente con una ecuación de Hodgkin y Huxley (1952 a,b), en la que

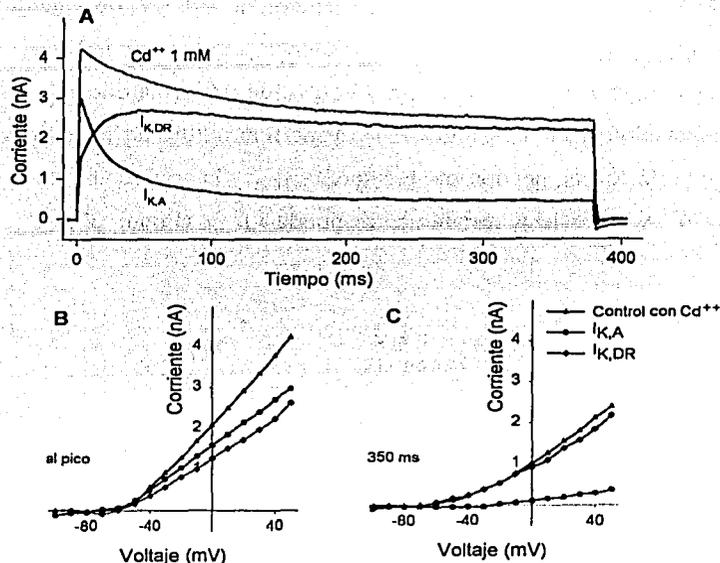


Figura 23. Corrientes salientes en células ciliadas aisladas. En A, la $I_{K,DR}$ se obtuvo como la diferencia entre la corriente control menos la corriente que permanece luego de la aplicación de TEA 1 mM en el baño. Esta corriente se activa lentamente con una $\tau = 1.03$ a 0.81 ms ($n = 50$) y no presenta inactivación o ésta es muy lenta (> 250 ms). La corriente transitoria de salida $I_{K,A}$ es la corriente que permanece ante la aplicación de TEA en presencia de Cd^{++} . Esta corriente tiene una activación rápida ($\tau = 0.91$ a 0.67 ms entre 10 y 50 mV) y su inactivación puede ser rápida o lenta ($\tau_m < 60$ ms o > 100 ms). En B y C, curva corriente-voltaje para la $I_{K,DR}$ e $I_{K,A}$ al valor máximo de la corriente y al final (350 ms) del pulso de prueba.

$I_{DR} = \bar{g}_{DR} n^4 (V - E_K)$; en el ajolote $\bar{g}_{DR} = 32.5$ nS. Similar a la conductancia descrita en células ciliadas tipo II aisladas del utrículo del ratón (Rüsch y cols. 1998). En nuestras condiciones experimentales

$$E_K = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[K]_o}{[K]_i} \right); \text{ en el ajolote } [K]_o = 3.5 \text{ mM y } [K]_i = 140 \text{ mM } E_K = -90 \text{ mV}$$

La $I_{K,DR}$ en el ajolote es altamente sensible a tetratilamonio (TEA), se bloquea completamente por TEA 1 mM.

$I_{K,A}$: Para estudiar la corriente transitoria de salida se utilizaron protocolos de fijación de voltaje con un potencial de retención de -100 mV y se dieron pulsos crecientes similares a los aplicados para el estudio de $I_{K,DR}$; a las corrientes evocadas con este protocolo se les restó en una misma

célula las corrientes obtenidas con potencial de retención de -30 mV, de acuerdo a lo descrito por Hille (1984). Para la caracterización de la corriente $I_{K,A}$ se utilizó Ringer con Cd^{++} con la finalidad de bloquear las corrientes de calcio y la $I_{K,Ca}$, de tal forma que sólo quedarán presentes las corrientes de potasio $I_{K,DR}$ e $I_{K,A}$ (Figura 23). Al perfundir $20\mu l$ de TEA 1 mM se elimina la corriente $I_{K,DR}$, de esta forma, la corriente restante es $I_{K,A}$ y la sustracción de la corriente control con Ringer con Cd^{++} y la corriente restante corresponde a $I_{K,DR}$ (Figura 23).

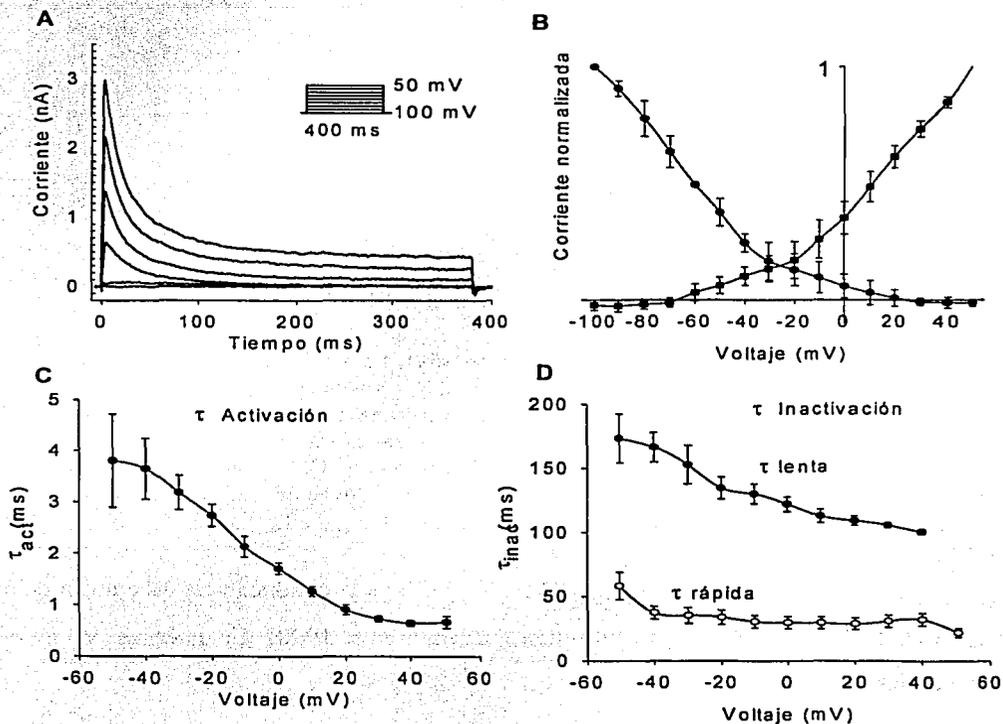


Figura 24. Corriente transitoria de salida $I_{K,A}$. Si bien esta corriente fue muy prominente en algunas células, en el 22% no se encontró. En A, registro de corriente en una célula que muestra una $I_{K,A}$ típica en una célula en que se aplicó Cd^{++} y TEA, con lo cual se obtiene $I_{K,A}$. En el recuadro se muestra la secuencia de pulsos de voltaje que evoca la corriente. En B, curvas de activación e inactivación en función del voltaje. En C, se grafica la τ de activación; $I_{K,A}$ tuvo una activación rápida con una $\tau = 0.91$ a 0.67 ms (de 20 a 50 mV). En D, se grafica la τ de inactivación, en el 80% de las células se observó una inactivación rápida con una $\tau_{promedio} = 33.5 \pm 2.8$ ms; en el 20% de las células la inactivación fue lenta con una $\tau_{promedio} = 130.9 \pm 8.1$ ms.

En nuestros experimentos encontramos que la corriente $I_{K,A}$ es muy prominente. Se encuentra presente en el 78% de las células ciliadas de una muestra con $n = 50$. Al igual que se ha descrito

para la rana (Norris y cols., 1992), distinguimos dos tipos de $I_{K,Ca}$: ambas tienen una activación rápida con una $\tau = 0.91$ a 0.67 ms (entre 10 y 50 mV). La cinética de activación de esta corriente muestra una clara dependencia de voltaje, como puede apreciarse en la figura 24 C. La diferencia entre estas corrientes es su inactivación ya que una es rápida con una $\tau_{promedio} = 33.5 \pm 2.8$ ms con

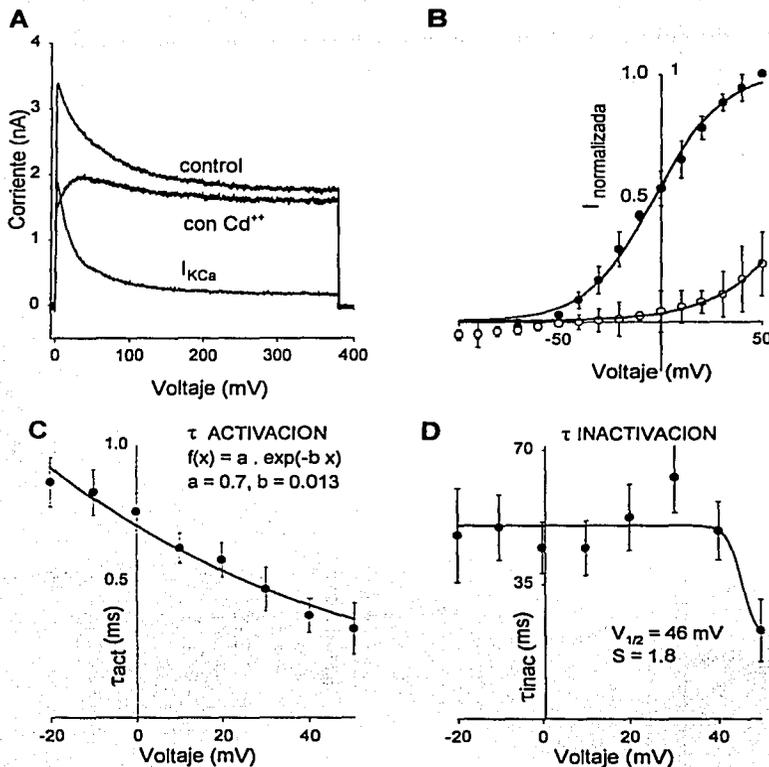


Figura 25. Corriente de potasio dependiente de calcio, $I_{K,Ca}$. Para obtener datos acerca de esta corriente se perfundió la preparación con un Ringer con $CdCl_2$ 0.5 mM. En A, se muestra la $I_{K,Ca}$ obtenida restando la corriente resistente a Cd^{++} de la corriente control. Si bien este protocolo elimina también la corriente entrante de Ca^{++} , ésta, por su magnitud y características, influye de forma casi lineal en la apariencia de $I_{K,Ca}$. En B, curva corriente-voltaje, al pico (círculos llenos) y a los 350 ms (círculos vacíos) para la $I_{K,Ca}$. En C y D, gráfica la τ de activación e inactivación de la corriente contra el voltaje para la $I_{K,Ca}$, se observa una dependencia compleja del voltaje para ambas constantes de tiempo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

un rango de 58.2 a 21.8 y una conductancia de 32 nS (medida para pulsos que van de -100 mV a +40 mV), y se encuentra en el 80% de la células que presentan $I_{K,A}$; y el otro tipo tiene una cinética de inactivación lenta con $\tau_{\text{promedio}} = 130.9 \pm 8.1$ ms y un valor de 100.6 ms para pulsos de -100 a 40 mV, se encuentra en un 20% de las células. Ambas corrientes tienen una dependencia de voltaje semejante (Figura 24 B), se activan entre -70 y -60 mV, por lo que presentan una activación a potenciales más negativos que los descritos para la $I_{K,A}$ en las neuronas de moluscos (Connor y Stevens 1971 a,b). Desde el punto de vista farmacológico, esta

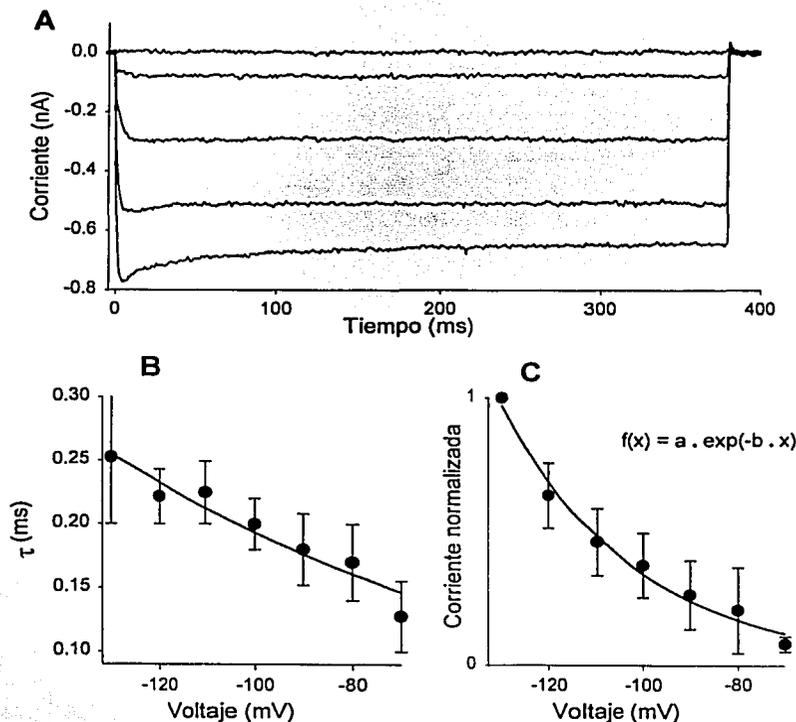


Figura 26. Corriente rectificante de entrada. En A, registro en la configuración de célula completa de una célula ciliada proveniente de los canales semicirculares del axolotl. El registro fue obtenido con un $V_h = -60$ mV y pulsos hiperpolarizantes de -130 a -70 mV. Se puede identificar claramente un componente de corriente entrante ($g_{K,IR}$) que se activa muy rápidamente y que presenta una inactivación parcial también rápida. En B, gráfica de la τ de activación de la corriente contra el voltaje. Se observa una clara dependencia del voltaje. En C, curva corriente contra voltaje para la corriente entrante ($n = 30$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

corriente es sensible a 4-amino-piridina 4-AP) en nuestro caso la corriente $I_{K,A}$ se bloqueó con 1 mM de 4AP.

La corriente $I_{K,A}$, con una cinética de inactivación rápida puede modelarse con la siguiente ecuación:

$$I_A = \bar{g}_A m h (V - E_K); \text{ en el ajolote } \bar{g}_A = 44.59 \text{ nS.}$$

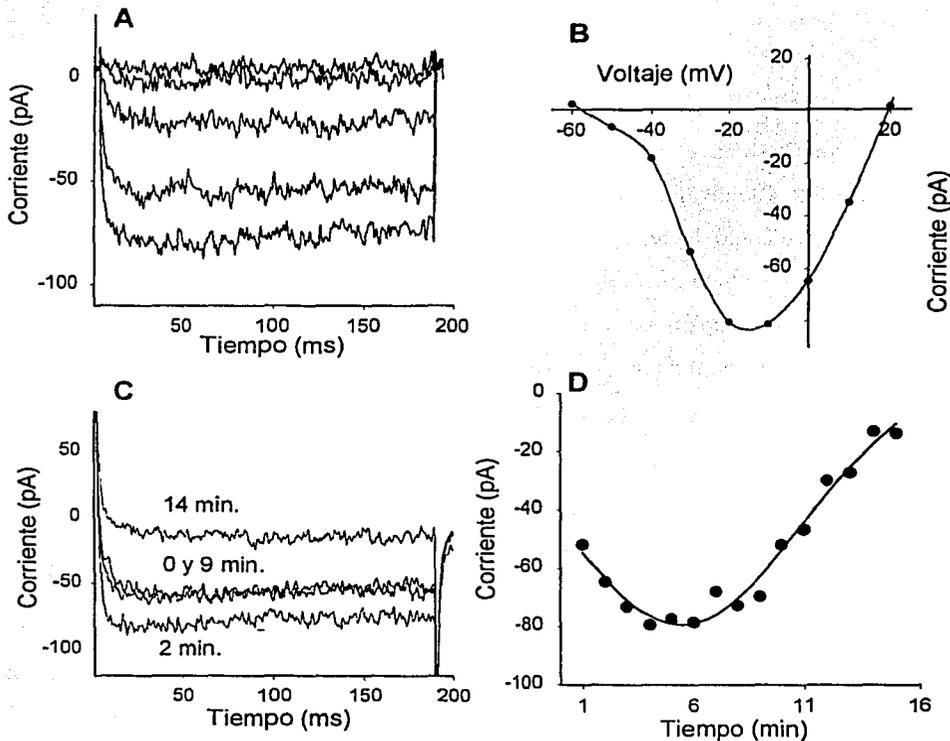


Figura 27. Corriente de Ca^{++} I_{Ca} . Para obtener datos acerca de esta corriente es necesario bloquear todas las otras corrientes presentes en las células ciliadas. En A, se muestra el registro de I_{Ca} . En B, gráfica corriente-voltaje para I_{Ca} , en nuestros experimentos encontramos que esta corriente se activa a un potencial cercano a los -40 mV llegando al máximo entre -20 y -10mV, y no presenta inactivación a lo largo del pulso de prueba. En C, registro de la corriente a diferentes tiempos ésta mostró un incremento durante los primeros minutos. después de 10 minutos de registro disminuye su tamaño hasta que desaparece. En D, gráfica de la amplitud máxima de la corriente a diferentes tiempos.

La cinética de activación es $\frac{dm}{dt} = \frac{m_{\infty} - m}{\tau_m}$; en el ajolote la constante macroscópica $\tau_m = 0.91$ a 0.67 ms (de 20 a 50 mV). La τ de la inactivación de I_A depende de voltaje (Figura 24 D); sin embargo para la corriente con inactivación rápida varió en un rango estrecho, por lo que puede muy bien considerarse independiente del voltaje. La inactivación lenta en estado estable es dependiente de voltaje, en el ajolote se ajusta con una ecuación de Boltzman (entre -100 a 50 mV) con una $V_{1/2} = -66.5$ mV. (Figura 24).

$I_{K,Ca}$: Para el estudio de esta corriente se utilizó un protocolo de pulsos que partiendo de un potencial de retención de -85 mV aplica pulsos de -100 a +50 mV con incrementos de 10 mV por pulso y con duración de 400 ms. Para distinguir la $I_{K,Ca}$ se bloqueó la corriente de Ca^{++} utilizando $CdCl_2$ 0.5mM y se efectuó la resta de la corriente control menos la corriente evocada en presencia de $CdCl_2$. El resultado de la resta corresponde a la $I_{K,Ca}$ (figura 25 A). Esta corriente se activa a potenciales más positivos que -60 mV, tiene una activación rápida con una $\tau_{promedio} = 0.67 \pm 0.06$, rango de 0.87 a 0.33 y se inactiva parcialmente a un nivel estacionario con una $\tau_{promedio} = 46.7 \pm 5.1$ ms, rango de 85.8 a 22.9 ms (Figura 25).

$I_{K,IR}$: La corriente rectificante de entrada se buscó en un total de 50 células usando un protocolo de fijación de voltaje con un potencial de retención de -60 mV y pulsos de -130 a 35 mV con incrementos de 15 mV y una duración de 380 ms; se encontró en el 60 % de este grupo de células. La corriente se activa a potenciales más negativos que el potencial de membrana, su activación es muy rápida con una $\tau_{promedio} = 0.19 \pm 0.02$ ms, con un rango de 0.25 a 0.12; en el 80 % de las células en que se registró esta corriente no presentó inactivación, y en el 20 % de las células registradas encontramos que, para pulsos de voltaje que van de -60 a -130 mV, tuvo una inactivación lenta con una $\tau_m = 59.3$ ms (Figura 26).

I_{Ca} : Para el estudio de la corriente de calcio, se bloquearon las corrientes salientes mediante la sustitución de potasio por cesio, así como el uso de TEA 18 mM y sodio 63 mM en la solución extracelular para incrementar la corriente de calcio se agregaron 4.5 mM de bario (ver tabla II). El protocolo de estimulación tuvo un potencial de retención de -60 mV, y se dieron pulsos crecientes desde -70 a 50 mV, con una duración de 200 ms. En estas condiciones encontramos

una corriente de calcio que se activa entre -50 y -45 mV, con una cinética muy rápida $\tau_m = 3.1 \pm 0.6$ ms (medida para pulsos entre -20 y -10 mV), valores a los que tiene su magnitud máxima (Figura 27 A y B). Se estudiaron los cambios en la magnitud de la I_{Ca} , ya que se ha descrito que esta corriente sufre modificaciones a lo largo del tiempo. Nuestros resultados mostraron que la I_{Ca} aumenta en los primeros minutos de registro *-run up-*, llegando casi al doble entre los 4 y 6 minutos; posteriormente empieza a decrecer desapareciendo casi totalmente después de 15 minutos *-run down-* (Figura 27 C y D).

Acción de agonistas opioides sobre corrientes iónicas en células ciliadas

En el caso de las células ciliadas aisladas sólo se probaron los agonistas de los receptores μ y δ

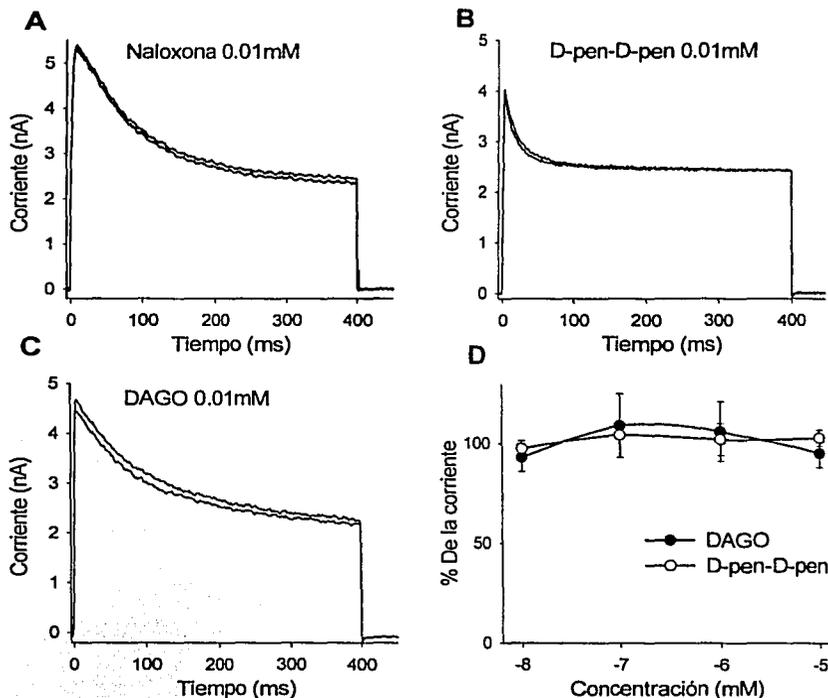


Figura 28. Registros de las corrientes evocadas en tres células diferentes, con un $V_h = -80$ mV y un pulso a 30 mV con duración de 400 ms. En A, se observa el registro de la corriente en condiciones control y ante la aplicación de naloxona 0.01 mM. En B, registro control y la aplicación de D-pen-D-pen 0.01 mM. En C, control y aplicación de DAGO 0.01 mM. En D, curva dosis efecto de las corrientes evocadas en células ciliadas para DAGO y D-pen-D-pen ($n > 3$ para cada punto), como se muestra en la figura, no obtuvimos cambios significativos en las corrientes con los agonistas de los receptores μ y δ

opioides (DAGO, U50488 y D-pen-D-pen), ya que los antagonistas por si solos no tendrían efecto, esto se confirmó al aplicar naloxona y no encontrar cambios en las corrientes de estas células (Figura 28 A), debido a que, al separar las células del epitelio pierden su inervación, y por tanto la influencia de posibles agonistas endógenos.

Probamos el efecto de a la D-pen-D-pen-enkefalina (agonista δ), sobre las corrientes totales evocadas por voltaje, en concentraciones de $10 \mu\text{M}$ a 10nM ($n = 3$, para cada punto). No se encontró ningún cambio significativo en la corriente de retención ni en las corrientes dependiente de voltaje con ninguna de las concentraciones (Figura 28 B, D).

En los experimentos realizados para probar la presencia del receptor μ en las membranas de

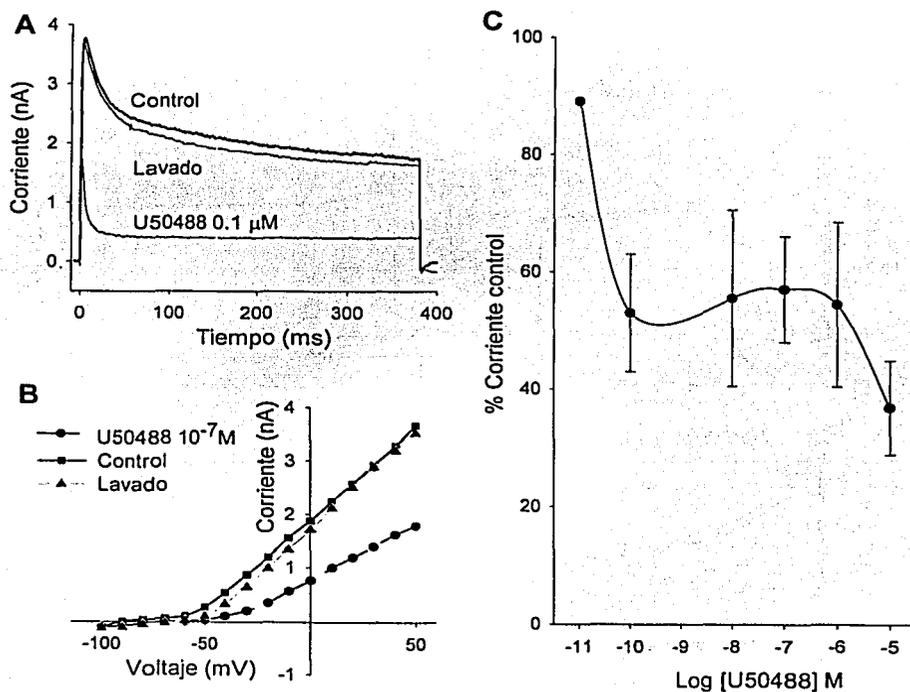


Figura 29. El U50488, agonista del receptor κ , disminuyó significativamente la magnitud de las corrientes evocadas por voltaje en las células ciliadas aisladas. En A, registro de la corriente evocada con $V_h = -80 \text{ mV}$, y un pulso hasta 30 mV durante 400 ms , en condiciones control, durante la aplicación de U50488 $0.1 \mu\text{M}$ y luego del lavado. En B, gráfica de la corriente al pico contra el voltaje en las condiciones antes mencionadas. En C, curva del efecto de la aplicación de U50488 en concentraciones de 10 pM a $10 \mu\text{M}$ ($n > 3$ excepto 10 pM , $n = 2$).

células ciliadas aisladas de los canales semicirculares, se estudió el efecto de DAGO (agonista μ) sobre la corriente de retención y sobre las corrientes totales evocadas por voltaje. El DAGO se probó en concentraciones de 10 nM a 10 μ M ($n > 3$ para cada punto). Encontramos un pequeño incremento en las corrientes totales; sin embargo este aumento no fue significativo (Figura 28 C, D).

El U50488 (agonista κ) se probó en concentraciones de 10 pM a 10 μ M ($n > 3$ para cada concentración, excepto 10 pM: $n = 2$); encontramos que produce una disminución significativa y reversible en la magnitud de las corrientes totales en concentraciones de 1 μ M a 10 nM (Figura 29). El efecto inhibitor del U50488 produjo una curva concentración-efecto con forma sigmoidal caracterizada por una disminución inicial seguida por una fase de meseta para concentraciones que van de 10 pM a 10 μ M, manteniéndose con una reducción de las corrientes cercana al 55%. Para concentraciones mayores (10 μ M) la reducción en las corrientes llegó hasta el 60%. Con el fin de discernir si este efecto se lleva a cabo a través de unión específica a receptores a opioides, realizamos experimentos en los que se agregó naloxona 10 μ M al Ringer, y se perfundió a las células durante 10 minutos con esta solución; en estas condiciones, se microperfundió el U50488 a la máxima concentración (10 μ M, $n = 4$). La naloxona bloqueó completamente la acción inhibitor del U50488. Únicamente en un caso persistió un ligero efecto inhibitor no significativo del U50488 (Figura 30).

Para definir el tipo de corriente que se bloquea con el U50488 y con la hipótesis de que se trata de una corriente de potasio activada por calcio, decidimos estudiar el efecto del U50488

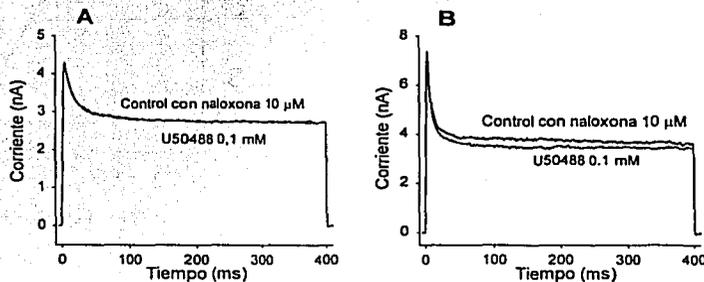


Figura 30. Se muestran registros en dos células en las que se bloquearon los receptores a opioides con naloxona 1 μ M en la perfusión, y se microperfundió el U50488 a la máxima concentración (10 μ M, $n = 4$). En A, se muestra que la naloxona bloqueó completamente la acción inhibitor del U50488. En B, único caso en que persistió un ligero efecto inhibitor no significativo del U50488.

cuando la preparación se ha profundado previamente con Ringer adicionado con 0.5 mM de Cl_2Cd . El Cd^{++} bloqueó la corriente de Ca^{++} y su efecto apareció en las corrientes salientes como una disminución de las mismas debido a que, secundariamente al bloqueo de la I_{Ca} , desaparece la $I_{\text{K,Ca}}$ (Figura 25). En estas condiciones estudiamos el efecto del U50488 10 μM ($n = 6$) y encontramos que su efecto sobre las corrientes salientes se anula totalmente a pesar de que, en

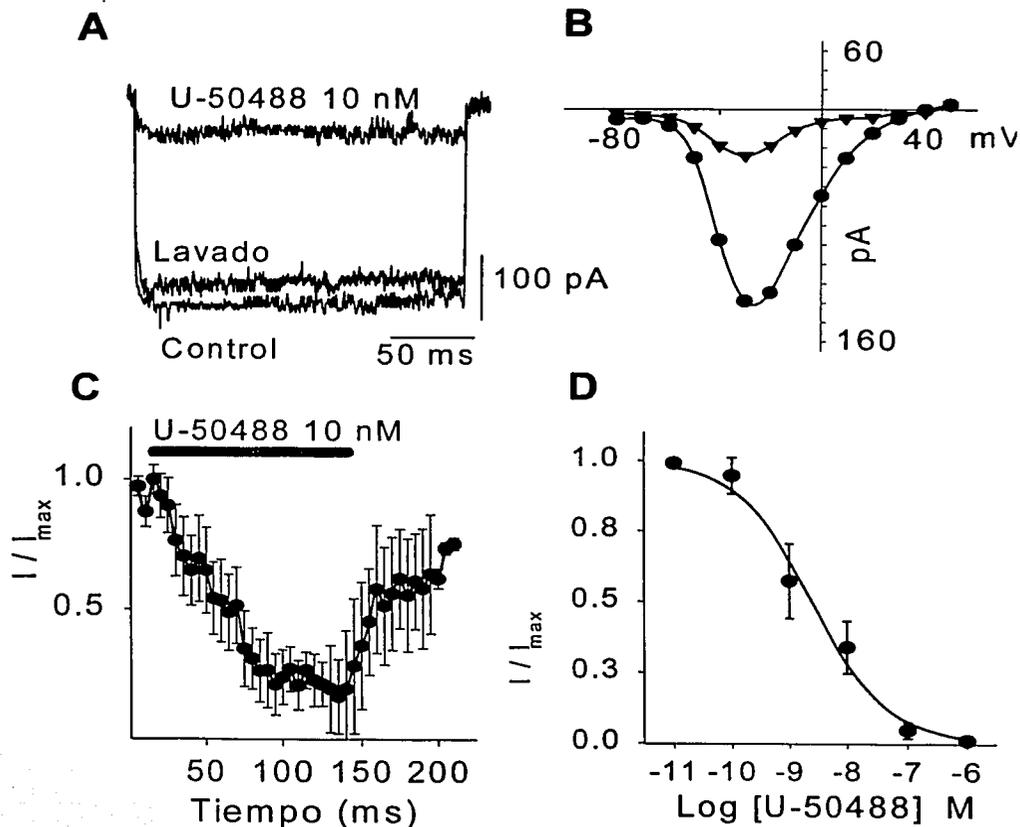


Figura 31. En A, se muestra el registro control de la I_{Ca} , y la disminución causada por la microperfusión de U50488 10 nM, y la recuperación después del lavado ($n = 4$). En B, gráfica de la corriente I_{Ca} contra el voltaje en condiciones control y en presencia del agonista κ , 1 nM. En C, curso temporal del efecto del U50488 10 nM sobre la corriente de calcio (microperfusión de U50488 indicada por la barra gris). En D, curva concentración efecto para el U50488 sobre la corriente de calcio.

estos experimentos se le usó a la máxima concentración (Figura 31, A). Para corroborar que el efecto del U50488 se debe a la inhibición de la corriente de Ca^{++} y a la disminución secundaria de la $I_{K,\text{Ca}}$, decidimos registrar la I_{Ca} y estudiar la acción del U50488 sobre ella. Para registrar la I_{Ca} se utilizó la solución con Ba^{++} y Cs^{++} , de forma que se bloquearon, teóricamente, todas las corrientes excepto la I_{Ca} . Se mantuvieron las células con potencial de retención de -80 mV y se dieron pulsos crecientes desde -70 hasta 50 mV con duración de 200 ms. En estas condiciones observamos a la corriente de calcio y agregamos por microperfusión el agonista κ . Encontramos que a concentración de 0.1 μM ($n = 3$) el U50488 bloquea completamente la I_{Ca} (Figura 31 B, C).

Inmunohistoquímica

Para estos experimentos se usaron 18 ajolotes con un peso aproximado de $40 \pm 20\text{g}$. En los primeros seis ajolotes se utilizó el anticuerpo primario diluido 1:200; ésto nos dio sin embargo, mucha fluorescencia de fondo, lo que no nos permitió interpretar los resultados. En el resto de experimentos se diluyó al anticuerpo primario 1:400; esta última concentración dio mejores resultados; con esta concentración no encontramos fluorescencia en los controles cuando se probó un solo anticuerpo (el primario o el secundario), ni cuando se utilizaron con el anticuerpo preadsorbido.

β -endorfina

Se seleccionaron la β -endorfina, la met-enkefalina y la dinorfina 1-8 debido a que estos compuestos se han propuesto como ligandos endógenos de los receptores μ , δ , κ , respectivamente. Encontramos inmunorreactividad a una sustancia del tipo de la β -endorfina en las fibras que inervan los epitelios sensoriales del sistema vestibular del ajolote. Observamos marca en cuerpos celulares con ramificaciones que parecerían ser neuronas en la cercanía de las crestas de los canales semicirculares, y en los nervios que inervan la mácula del utrículo (Figura 32). Observamos además fluorescencia en muchas de las fibras que inervan a los epitelios sensoriales, y en las células que conforman las máculas (células de sostén y sensoriales), y un marcado puntillado rodeando las células ciliadas de la región central del epitelio sensorial de las crestas de los canales semicirculares (Figura 32 B,D). Algunas células del ganglio del VIII par (ganglio de Scarpa) muestran una marca muy clara, a nivel del cuerpo celular y de la

prolongación periférica de las neuronas (Figura 33). Los controles con el anticuerpo preadsorbido o eliminando el primer anticuerpo fueron todos negativos.

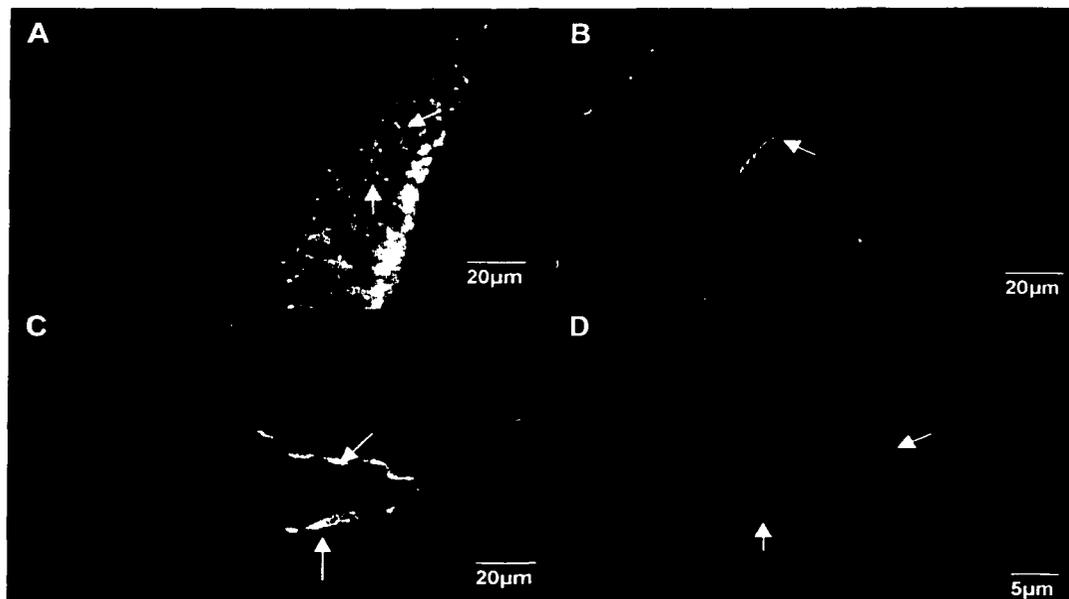


Figura 32. Fotografías de la inmunorreactividad a β -endorfina. En A, cresta de un canal semicircular en el que se observa un puntillero circundando la parte basolateral de las células ciliadas (flechas). En B, corte del nervio vestibular; cerca del canal semicircular se observa una célula y su ramificación claramente marcada (flecha). En C, corte del nervio que inerva la mácula utricular en el que se observan dos fibras marcadas (flechas). En D, marca fluorescente en cuerpos celulares (flechas) en la cercanía de las crestas de los canales semicirculares.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 33. Fotografía de microscopía confocal de células a nivel del ganglio del VIII par (ganglio de Scarpa) que muestra una clara marca a β -endorfina, tanto en el cuerpo celular como en la prolongación periférica de las neuronas. Corte de 20 μm y análisis cada 1 μm . En A a D se muestran cortes ópticos seriados que van de 11 al 14 μm . Los controles con el anticuerpo preadsorbido fueron negativos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Encefalinas

Cuando probamos el anticuerpo a encefalinas encontramos una marca difusa poco intensa tanto en los epitelios sensoriales como en las fibras nerviosas (Figura 34). La fluorescencia se observó también en el epitelio no sensorial que conforma la estructura del sistema vestibular, lo que hace difícil la interpretación de los resultados; no obstante, el control con el anticuerpo preabsorbido no dio ninguna fluorescencia (Figura 34 D), lo que no nos indicaría la unión específica del anticuerpo a una sustancia similar a las encefalinas que se encuentra en la mayoría de los tejidos que forman el sistema vestibular del ajolote. Estos resultados concuerdan con los reportados en otras especies tanto por inmunohistoquímica como por cromatografía, ya que las encefalinas se han localizado en el vestíbulo de varias especies animales (Fex y Altschuler, 1981, 1985; Hoffman y cols., 1983, 1984, 1985; Eybalin y cols., 1983, 1984, 1985a, 1985b; Hoffman, 1986).

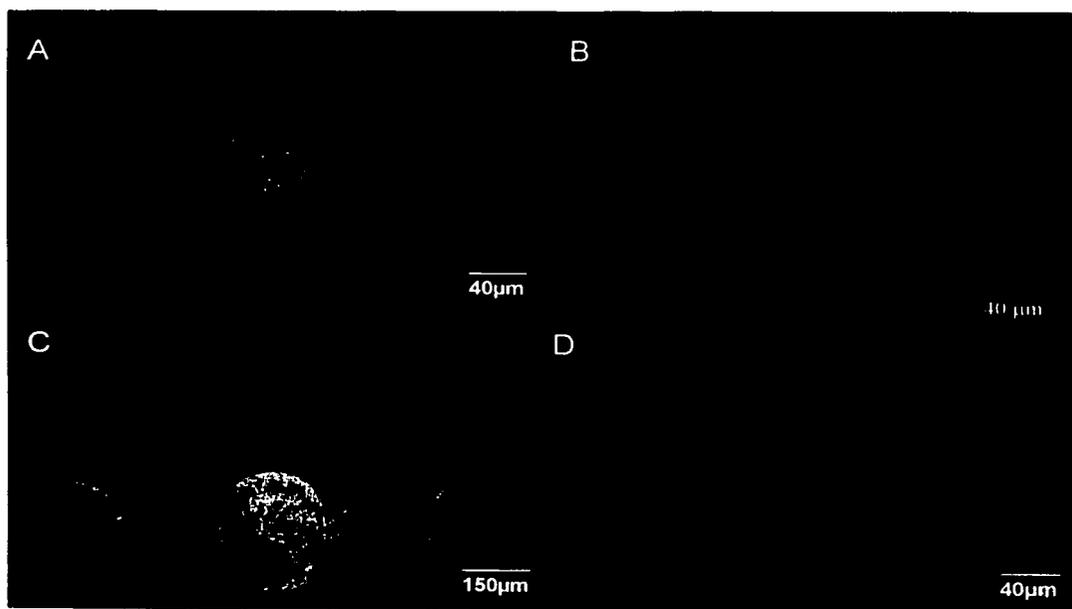


Figura 34. Inmunorreactividad a met-enkefalina. Encontramos una marca difusa tenue, tanto en los epitelios sensoriales como en las fibras nerviosas. En A, microfotografía de la cresta del canal en el que se aprecia marca tanto en las células ciliadas como en las de sostén y en las estructuras que conforman el canal. En B, corte longitudinal del canal en el que aparece marca fluorescente en la zona sensorial, el nervio que lo inerva y las células estructurales. En C, microfotografía con menor aumento en la que se observa marca en todas las estructuras que conforman el canal. En D, control con el anticuerpo preadsorbido; en este caso no hay ninguna marca.

Dinorfinas

En las pruebas realizadas con el anticuerpo contra dinorfinas encontramos inmunorreactividad a este tipo de sustancias en el sistema vestibular del ajolote. En nuestros experimentos observamos un marcado puntilleo en las crestas de los canales semicirculares, en la parte cercana al epitelio sensorial, circundando a las células ciliadas (Figura 35 A y B). Observamos también marca en algunas de las fibras que inervan las crestas de los canales semicirculares y las máculas del utrículo y del sáculo (Figura 35 C y D). Al igual que con los otros anticuerpos, en este caso los controles con el anticuerpo preadsorbido y omitiéndolo fueron negativos.

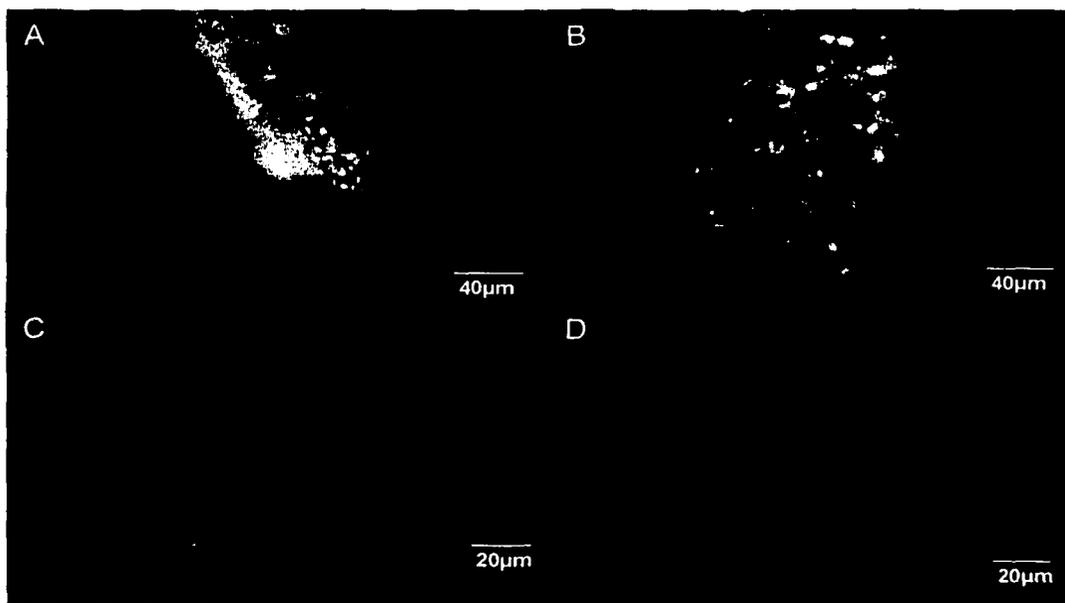


Figura 35. Microfotografías de la inmunorreactividad a dinorfina 1-8. En A y B, se observa un marcado puntilleo en las crestas de los canales semicirculares. En C, cresta de un canal en el que se observa marca fluorescente alrededor de las células sensoriales. En D, fibras que inervan la mácula utricular en la región cercana a las células ciliadas; se puede ver cómo se bifurca el nervio; al lado derecho del nervio se ve el epitelio.

Contenido de péptidos derivados de la proencefalina en el vestíbulo

Para determinar la proporción entre precursores conteniendo met- y leu-encefalina y productos de bajo peso molecular, se usaron 40 ajolotes cuyos vestíbulos se dividieron en tres lotes. Los extractos de tejido fueron estudiados antes (met y leu libres) y después de la digestión enzimática secuencial con tripsina y carboxipeptidasa B (met- y leu- totales). Adicionalmente se usó un anticuerpo contra sinencefalina para caracterizar los precursores.

No se encontraron datos de que en el oído interno del ajolote exista leu-encefalina libre. El cromatograma mostró que toda la marca para la leu-encefalina está ubicada en precursores de alto peso molecular y que no existe leu-encefalina libre (Figura 36).

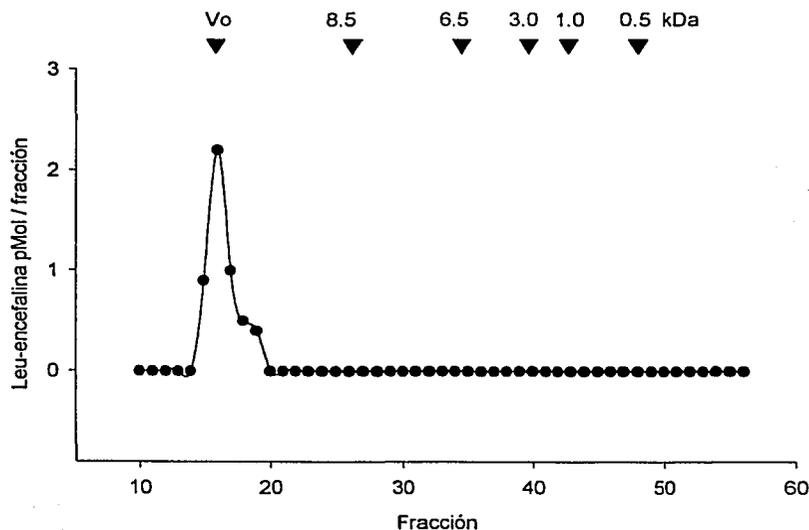


Figura 36. Perfil cromatográfico de materiales inmunorreactivos a leu-encefalina. Prácticamente toda la leu-encefalina se encuentra en forma no procesada en precursores de alto peso molecular (Vo). Las puntas de flecha indican la posición donde eluyen los marcadores de peso molecular. Los resultados se expresan en pmol / fracción.

La met-encefalina fue claramente detectable en forma libre y representó el 14% del total (6.71 ± 0.30 pmol / mg proteína) (Figure 37), indicando que los tejidos que conforman el vestíbulo del ajolote son capaces de hacer el procesamiento post-translacional de la molécula de la

proencefalina para dar origen a la met-enkefalina libre. El contenido de sinencefalina total fue de 0.31 ± 0.01 pmol / mg proteína y esta molécula no se encontró en forma libre (Tabla III).

Table III. Met-enkefalina y sinencefalina en el oído interno del ajolote. Los datos se expresan en pmol / mg de proteína

Met-enkefalina		Sinencefalina	
Total	Libre	Total	Libre
7.03	0.98	0.31	0
6.44	1.01	0.31	0
6.67	0.96	0.30	0

La inmunorreactividad a los péptidos conteniendo met- y leu-enkefalina en los tejidos del vestíbulo fue caracterizada mediante cromatografía por filtración en gel. La cromatografía seguida del estudio de la inmunorreactividad a met- y leu-enkefalina mostró como ya mencionamos, que en el caso de la leu-enkefalina se detecta inmunorreactividad únicamente en precursores de alto peso molecular. En el caso de la met-enkefalina, se encontró la presencia de precursores de alto peso molecular y de péptidos inmunorreactivos de 1.0 y 0.5 kDa (Figura 38). Los materiales que eluyen en la posición que corresponde al estándar de 0.5 kDa corresponden al peso molecular de la enkefalina, en tanto el pico a 1 kDa corresponde a algún péptido no identificado.

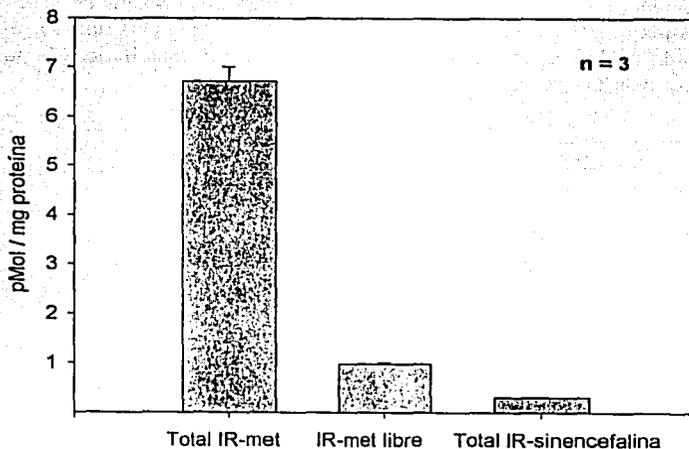


Figura 37. Péptidos conteniendo met-enkefalina en el oído del ajolote. Los homogenados fueron sometidos a tratamiento enzimático para determinar los péptidos totales y libres. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de 3 experimentos.

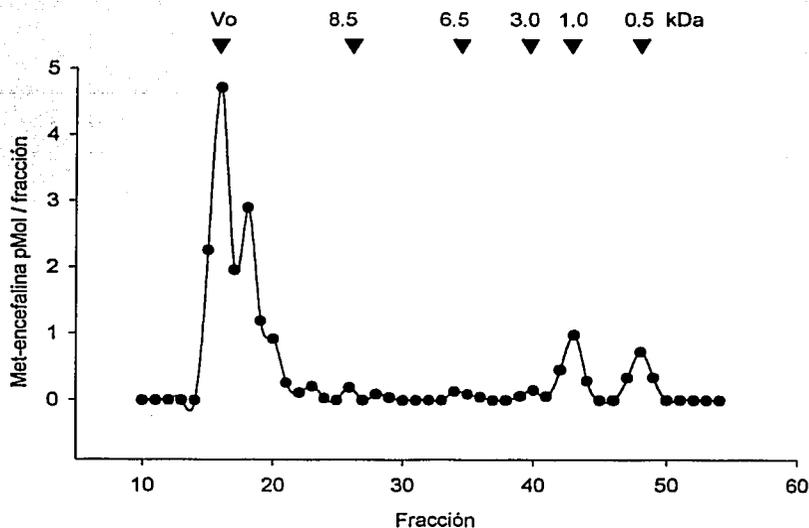


Figura 38. Perfil cromatográfico de materiales que resultaron inmunorreactivos a met-enkefalina. La mayor parte de la inmunorreactividad a met-enkefalina se encuentra en forma no procesada (V_0). Se detectan claramente dos péptidos de bajo peso molecular (1 y 0.5 kDa) que corresponden a un péptido no identificado y a la met-enkefalina libre. Las puntas de flechas indican la posición en que eluyen los marcadores de peso molecular.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran que la actividad de las fibras aferentes que inervan el sistema vestibular es regulada por receptores a opioides. Estos experimentos fueron realizados en el ajolote, el cual sólo posee células tipo II, por lo que los receptores a opioides estarían asociados, en nuestro caso, a sinapsis de tipo botón. Estos hallazgos electrofisiológicos se apoyan, además, en la evidencia aquí presentada con relación a la presencia de inmunorreactividad a péptidos opioides en el oído interno del ajolote.

Neurofarmacología

En las dos últimas décadas, los agonistas y antagonistas de los receptores a los péptidos opioides se han usado ampliamente como sondas para definir las funciones específicas de los distintos subtipos de receptores a opiáceos. En este trabajo hemos utilizado los agonistas y antagonistas que parecían más adecuados por sus características de relación potencia, selectividad, estabilidad y disponibilidad.

Cabe destacar que continuamente se están desarrollando nuevos fármacos con diversas cualidades (Bryant y cols., 1998), hecho que hace casi imposible estar al día en el tipo de fármacos que se emplean. Sin embargo pensamos que, en este sentido, más vale mantener una actitud conservadora, y usar los fármacos que son más conocidos y para los cuales existen evidencias suficientes de sus características.

Órgano aislado

El que la aplicación de naloxona tenga un efecto *per se* sobre la actividad aferente indica que, en el órgano aislado, existe un “tono encefalinérgico”. Con base en nuestros experimentos pensamos que es muy probable que receptores de tipo μ participen en la respuesta evocada por el DAGO. El hecho de que la naloxona, que es un antagonista inespecífico de los receptores opioides, tenga un efecto similar al del DAGO, agonista del receptor μ , de que el U-50488 produzca un efecto inhibitorio contrario al encontrado con las otras drogas (DAGO y naloxona), nos hacen pensar en que probablemente exista una doble modulación por receptores a opioides: una excitatoria mediada través de receptores de tipo μ y una inhibitoria mediada por receptores κ .

En los sistemas neuronales que usan neuropéptidos es común que exista esta doble modulación, en la que un grupo de receptores actúa como inhibidor y otro como excitador. Tal es el caso específico de la médula espinal, el núcleo acumbens y el hipocampo, sitios en donde los receptores μ se localizan típicamente sobre neuronas GABAérgicas y los κ sobre otros elementos neuronales ejerciendo acciones antagónicas (Pan, 1998).

Sobresale en este trabajo el que hayamos logrado producir un fenómeno de sensibilización en el oído aislado *in vitro*. La sensibilización es uno de los procesos fundamentales en la adicción a los opioides. El hecho de que se produzca en el órgano aislado es una evidencia fuerte en el sentido de que existen receptores a opioides en el oído interno del ajolote. El experimento que realizamos produce una forma de privación para el sistema, ya que la naloxona termina bruscamente con la acción del agonista. Un proceso de sensibilización similar *-in vitro-* se conoce desde hace años en la preparación de músculo longitudinal y plexo mientérico del cobayo (Martin y cols, 1982). Al igual que en nuestra preparación, cuando esta preparación se somete a perfusión continua con morfina (desde 1 hasta 24 horas), se produce un cambio significativo en la respuesta a un estímulo tetanizante. Este fenómeno pueden involucrar modificaciones en el número de receptores o en la actividad de segundos mensajeros; no existe evidencia de que el incremento en la respuesta del sistema a péptidos opioides pueda involucrar cambios en la afinidad del receptor. Como sea, este tipo de sucesos están en la base de muchos fenómenos adaptativos (Kalant, 1989).

En diversos trabajos se ha propuesto que la sensibilización de los receptores a opioides se relaciona con cambios significativos en el sistema que media la producción de AMP cíclico (Nakagawa y cols., 1999), así como en la síntesis de los receptores a opioides (Vechiola y cols., 1999). Se ha demostrado que, en células en que se han transfectado y expresan genes para el receptor κ y para proteínas G (quimeras con subunidades α_{i2} y α_q), la sensibilización se produce únicamente en aquellas células que expresan los receptores a opioides y la subunidad α_{i2} de las proteínas G (Nakagawa y cols., 1999). Estos resultados indican que el proceso de sensibilización es altamente específico.

La dependencia del efecto de la naloxona de la concentración extracelular de Mg^{++} , nos parece un hallazgo significativo, aunque fue estrictamente resultado de la serendipia. No conocemos otros trabajos de tipo electrofisiológico o farmacológico en que se haya estudiado este fenómeno y no parece haber una explicación simple para el mismo. Las bajas concentraciones de Mg^{++} en el

baño pueden interferir con un amplio espectro de reacciones enzimáticas y procesos dependientes de fosforilación, ya que este ión es un importante cofactor de varias fosforilasas (El-Beheiry y Puil, 1990). De ello resulta que una posibilidad obvia es que el mecanismo responsable de este fenómeno esté relacionado con las respuestas secundarias a la activación de los receptores a opioides, ya que éstos se encuentran acoplados a proteínas G y a cascadas de segundos mensajeros que llevan a inhibición de la adenilato ciclasa. Por ello es, particularmente relevante el hecho que la adenilato ciclasa es una enzima dependiente de la concentración de Mg^{++} (Borasio y cols., 1989).

Otras posibles explicaciones de este hallazgo pueden relacionarse con los siguientes mecanismos: i) que la baja concentración de Mg^{++} extracelular favorezca un estado de alta afinidad de los receptores a opioides; ii) que la disminución en la concentración de Mg^{++} extracelular pueda cambiar la expresión de receptores a opioides. En este sentido, se ha encontrado que la unión de fMet-Leu- $[^3H]$ Phe aumenta en función de la concentración de Mg^{++} debido a un incremento en el número total de receptores (Grierschik y cols., 1989); iii) los cambios en la concentración de Mg^{++} pueden modificar de forma significativa diversos procesos dependientes de Ca^{++} , tales como la propia corriente de Ca^{++} relacionada con la liberación de neurotransmisor.

Se ha demostrado que el Mg^{++} extracelular tiene un importante papel de regulación en la respuesta de neuronas neocorticales a la ACh y al GABA (El-Beheiry y Puil, 1990). En estos sistemas, los efectos de ACh y GABA se deprimen de forma dependiente de la concentración extracelular de Mg^{++} de manera semejante a lo que hemos encontrado que sucede con las respuestas a la naloxona en las aferentes vestibulares.

El que la naloxona presente una curva dosis efecto compleja y no sigmoidal apoya la idea de que, en la respuesta a los opioides, participan varios tipos de receptores con diferentes afinidades por este agente y cada uno con efectos característicos sobre el sistema vestibular. Nuestros resultados indican que los receptores de tipo κ ejercen un fuerte efecto inhibitor en tanto que los μ ejercen una influencia excitadora sobre el sistema. Cuando iniciamos este trabajo usamos dos agonistas relativamente inespecíficos la [D-ala²]-metionina-encefalina (DAME) y la [D-ala²]-leucina-encefalina (DALE) ambos con mayor selectividad por los receptores δ que para los otros tipos de receptores a opioides. Inicialmente los probamos a concentraciones en el rango de 0.1 nM a 10 mM (DALE n = 43 y DAME n = 35); encontramos que ambos presentan efectos

bifásicos; el DALE, inhibidor a bajas concentraciones y, excitador de mayores a 0.1 μM ; en cambio el DAME es excitador a bajas concentraciones y a concentraciones mayores de 10 μM produce una disminución de hasta 50 % de la descarga basal de las fibras aferentes. Así entonces, cuando una droga afecta mayormente a los receptores κ su efecto es inhibidor y a la inversa cuando afecta a los μ . Igualmente, la curva dosis efecto de la naloxona sugiere que a bajas dosis se liga a un receptor que normalmente produce inhibición -probablemente el receptor κ - y a altas dosis a un receptor que normalmente produce excitación. De hecho, este tipo de curvas bifásicas fue uno de los elementos que llevó a proponer la existencia de varios subtipos de receptores a opioides (Martin y cols., 1976; Martin, 1984).

Recordemos que la selectividad es siempre relativa a la concentración y que a altas concentraciones, por ejemplo la morfina, es capaz de ligarse a todos los subtipos de receptores a opioides. Pensamos que esto mismo sucede en el caso del DAGO, que tiene un claro efecto excitador desde concentraciones de 0.1 nM hasta 100 μM , en tanto que para concentraciones mayores de 1 mM, su efecto disminuye indicando que, probablemente, a estas concentraciones afecta también a los receptores tipo κ , lo que determinaría una disminución de su acción excitadora. Se ha demostrado que el receptor μ hiperpolariza a las neuronas de las láminas I y II de la médula espinal y disminuye las respuestas evocadas por glutamato en el núcleo supraóptico, pero no modifica el efecto del GABA. Por otro lado, el DAGO es capaz de disminuir la liberación de glutamato y GABA en sinaptosomas de la corteza cerebral y en el núcleo central de la amígdala, debido a la disminución de la corriente de calcio en la neurona presináptica; además, el DAGO modifica también las corrientes de calcio en el hipocampo y consecuentemente la respuesta al NMDA. Por otro lado en el asta dorsal de la médula espinal, la morfina aumenta la secreción de CCK (Light y cols., 1999; Sbrenna y cols., 1999; Przewlocki y cols., 1999; Gustafsson y cols., 1999; Pickel y Colago, 1999; Piepponen y cols., 1999), proponiéndose en este caso que el cambio en la respuesta se debe a modificaciones en segundos mensajeros que requieren de calcio intracelular.

Los resultados obtenidos usando agonistas y antagonistas de receptores δ (D-Pen D-Pen-encefalina y naltrindole), indican claramente que este tipo de receptores no se encuentra en la periferia vestibular o que, si existen, no tienen un papel relevante en la generación de la actividad basal ni en la respuesta a los estímulos mecánicos en las neuronas aferentes vestibulares. A nivel del sistema nervioso central, se ha reportado que el receptor δ incrementa la liberación en la

corteza, de colicistoquinina (CCK) previniendo la disminución de ésta después de la aplicación prolongada de morfina. En los ganglios basales los antagonistas de este receptor aumentan la liberación de glutamato y aspartato, se ha demostrado que el glutamato y las encefalinas se encuentran en las mismas terminales y se ha propuesto que sus receptores estarían interactuando. Por otro lado, en rebanadas de corteza el del receptor δ , D-pen-D-pen-encefalina disminuye la liberación de ACh. (Becker y cols., 2000; Becker y cols., 1999; Van Bockstaele y cols., 2000; You y cols., 1999; Feuerstein 1998).

Por otra parte, la acción de los agonistas y antagonistas del receptor κ (U-50488 y la Norbinaltorfimina) indican claramente que este receptor está relacionado con procesos que producen una fuerte inhibición de la descarga de las neuronas aferentes vestibulares. Los estudios de los efectos de los agonistas y antagonistas del receptor μ (DAGO y funaltrexamina) indican que este receptor está acoplado a procesos que llevan a un aumento en la excitabilidad de las neuronas aferentes vestibulares. En conjunto, estos resultados apuntan entonces a un control dual por parte de los péptidos opioides sobre la actividad de las neuronas aferentes vestibulares. En el sistema nervioso central, se ha demostrado que la activación receptor del κ por sus agonistas disminuye la corriente de calcio; en el hipotálamo la disminución de esta corriente, afecta de manera significativa la liberación de noradrenalina (NA) y dopamina (DA). Además, en sinaptosomas del estriado se ha encontrado que hay un decremento en la liberación de glutamato, y que la norbinaltorfimina antagonista del receptor κ aumenta la liberación de DA y dinorfina B en los ganglios basales (Laorden y cols., 2000; Collins y cols., 2000; Sbrenna y cols., 1999; McGinty 1999; Rawls y cols., 1999; You y cols., 1999).

Para definir el sitio y mecanismo de acción de los péptidos opioides en el vestíbulo, realizamos diversos experimentos de interacción farmacológica que nos permitieron precisar si su efecto ocurre sobre las neuronas eferentes, sobre las células ciliadas o sobre las neuronas aferentes. Para lo primero, realizamos una serie de experimentos en donde estudiamos el efecto que tiene la estimulación de las vías eferentes sobre la descarga aferente y, secundariamente, planeábamos analizar que agentes pudieran modificar estos efectos. En este trabajo se realizaron experimentos de estimulación eferente y registro en las neuronas aferentes, sin embargo estos resultados fueron confusos y no nos pareció que el diseño experimental fuera confiable como para continuar con un análisis detallado que incluyera interacciones farmacológicas. Con base en

este antecedente decidimos tomar un camino alternativo y estudiar entonces si el bloqueo de las vías eferentes por medios farmacológicos (en lugar de su activación por estimulación eléctrica),

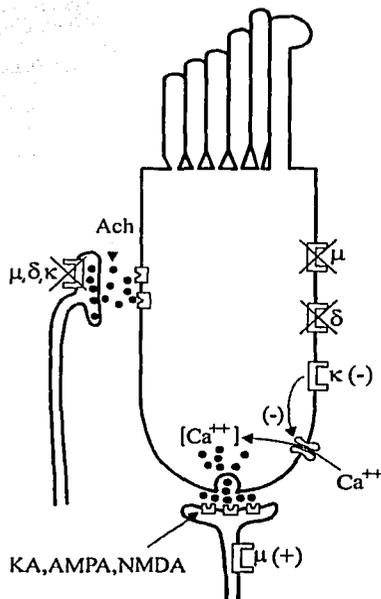


Figura 39. Esquema de una célula ciliada, sus conexiones sinápticas y la posible ubicación de los receptores a péptidos opioides que hemos explorado en este trabajo. Nuestros resultados indican que los péptidos opioides no ejercen efectos que indiquen que modifican o están relacionados con la liberación de acetilcolina por la fibra eferente. En cuanto a la célula, ciliada no encontramos evidencias que indiquen que los receptores μ y δ ejerzan efecto a este nivel. Sin embargo, parece bastante claro que los receptores tipo κ están ubicados en las células ciliadas y ejercen un efecto inhibitorio sobre la corriente de Ca²⁺. Por su parte, los efectos de los agonistas y antagonistas μ sugieren que este receptor se localiza a nivel postsináptico, donde ejerce un efecto excitador en las neuronas aferentes.

modificaba la respuesta del sistema a los péptidos opioides. Estudiamos, por tanto, la influencia que tienen los antagonistas colinérgicos (d-tubocurarina y atropina) sobre la respuesta evocada por la naloxona. En principio, si el efecto de naloxona se ejerciera a nivel de las neuronas eferentes, entonces la aplicación de los antagonistas colinérgicos eliminaría el efecto de la misma, ya que la sinapsis eferente es mediada principalmente acetilcolina (Figura 39). Nuestros resultados indican claramente que los antagonistas colinérgicos no modifican significativamente el efecto de la naloxona, hecho que sugiere que este antagonista inespecífico de los receptores a opioides no actúa modulando la liberación de acetilcolina por las vías eferentes (Figura 39).

Como complemento a estos experimentos, hemos estudiado también la acción de agonistas y antagonistas opioides sobre la respuesta del sistema a la aplicación de agonistas de los AAE. Sabemos que la entrada sináptica a las neuronas aferentes ocurre a través de receptores a los AAE (Soto y Vega, 1988; Eybalin, 1993; Soto y cols., 1994; Guth y cols., 1998). Encontramos que el U-50488 produce una disminución de la respuesta excitadora evocada por el ácido quisquialico en las neuronas aferentes vestibulares. Este resultado nos obliga a pensar en la posibilidad de que

podrían existir también receptores de tipo k ubicados a nivel de las neuronas aferentes, aunque no hemos realizado experimentos que nos permitan confirmar o descartar esta hipótesis.

Cabe destacar que en las neuronas del hipocampo se ha reportado que la unión de opioides con receptores postsinápticos modifica el efecto del glutamato, mediado por el receptor NMDA (Przewlocki y cols., 1999).

Células ciliadas aisladas

Mediante la técnica de fijación de voltaje en las células ciliadas aisladas de los canales semicirculares, pudimos demostrar que las corrientes dependientes de voltaje en estas células están dominadas por corrientes salientes de K^+ . Encontramos que en todas las células estudiadas se encuentra una corriente de tipo rectificador retardado $I_{K,DR}$, la cual es claramente la de mayor amplitud en un número importante de células. Encontramos también que en el 78% de las células estudiadas se encuentra presente una corriente de K^+ transitoria de salida del tipo de la $I_{K,A}$ (Connor y Stevens, 1971a, b). Mediante el uso de Cd^{++} como bloqueador de los canales de Ca^{++} encontramos que existe una corriente de K^+ activada por Ca^{++} , la cual es muy prominente en el 91% de las células estudiadas. Según nuestros resultados, esta corriente constituye hasta el 60% del total de la corriente saliente en algunas células, aunque más comúnmente su magnitud es cercana al 40% de la corriente saliente total. Cuando se bloquean las corrientes de K^+ sustituyendo este ión por Cs^+ y agregando TEA y 4-AP en el medio extracelular, pudimos identificar una corriente entrante de pequeña magnitud (≈ 200 pA), la cual desaparece completamente al perfundir la preparación con Cd^{++} , lo que indica que se trata de una corriente de Ca^{++} . En un número significativo de células (60%) encontramos también evidencias de la presencia de una corriente rectificante de entrada probablemente de tipo $I_{K,IR}$. La corriente de Ca^{++} en estas células es pequeña: alrededor de 200 pA con una solución extracelular con Ba^{++} 5 mM. Es notable el hecho de que esta corriente, amén del ya bien conocido fenómeno de *run-down* que se ha descrito en múltiples sistemas y que, por cierto, es bastante lento en nuestras condiciones experimentales (≈ 15 min), presenta también un fenómeno de *run-up* que determina que la corriente crezca luego de los primeros registros. No está claro el mecanismo que subyacente a este fenómeno. Cabe destacar que la pipeta lleva 2 mM de ATPMg y 0.1 mM de GTPNa; estos compuestos pudieran tener una influencia significativa sobre el estado de fosforilación de diversas proteínas. Actualmente estamos trabajando para comparar el fenómeno

de *run-up* en células registradas con fijación de voltaje con el método de célula perforada con anfotericina, con aquellas registradas con el método de ruptura del parche de membrana para definir la influencia del contenido de la pipeta en estas corrientes.

Tabla V. Propiedades pasivas de las células ciliadas tipo II de los canales semicirculares

	Resistencia	Capacitancia	Vmem	n
Norris y cols, 1992, rana	-	5.3±0.2pF	-50±2 mV	25
Rennie y cols, 1996, gerbil	860±273 MΩ	4.6±1.2 pF	-	5
Rennie y Ashmore, 1991, cuyo	-	5.3±1.6 pF	-48±11 mV	10
Vega y cols, 1998, ajolote	414±0.9 MΩ	16±0.6 pF	-49±2 mV	47
Ricci y cols, 1994, rana	386±151 MΩ	10.4±0.7 pF	-45±1 mV	154
Masetto y cols, 1994, periferia rana	1.5±0.15 GΩ	9.16±0.36 pF	-46±1.3 mV	27
Masetto y cols, 1994, central rana	1.14±0.1 GΩ	12.3±0.52 pF	-57.8±1.8 mV	18

En lo general, este conjunto de corrientes coinciden con lo reportado por otros autores para las corrientes iónicas en células ciliadas de tipo II (Ohmori, 1984; Hudspeth y Lewis, 1988a, 1988b; Correia y Lang, 1990; Norris y cols., 1992; Prigioni y cols., 1992; Ricci y cols., 1994; Masetto y cols. 1994; Holt y Eatock, 1995; Russo y cols., 1996).

Con base en las corrientes dependientes de voltaje que hemos encontrado, podemos concluir que la respuesta de las células ciliadas ante la activación de la corriente de transducción es casi lineal, esto es, el cambio de voltaje en las células ciliadas que induce el desplazamiento de los cilios es un reflejo bastante fiel de la forma de la corriente de transducción. Es sólo ante cambios significativos de voltaje en la dirección despolarizante que la célula ciliada presenta una rectificación del potencial receptor que limita el cambio de voltaje que puede producir la corriente de transducción. De hecho, algunas simulaciones que hemos realizado mediante computadora indican que la sola presencia de las corrientes $I_{K,DR}$ e $I_{K,A}$ es suficiente para reproducir la respuesta de las células ciliadas ante pulsos de corriente.

Debido a que estas células tienen un tamaño pequeño, la capacitancia de las mismas es baja (alrededor de 16 pF); resulta entonces que un factor fundamental en su capacidad de seguir altas

frecuencias de estimulación (como en una vibración o en un estímulo auditivo) es la resistencia de entrada de la célula. Por ello, la sensibilidad al voltaje y la $V_{1/2}$ de las corrientes $I_{K,DR}$ e $I_{K,A}$ es fundamental para definir el rango de respuesta a frecuencias de estas células. Por los datos obtenidos en este trabajo, que indican que nuestras células tienen en lo general una resistencia de entrada intermedia entre las células ciliadas (Ver tabla V, alrededor de $414 \text{ M}\Omega$), podemos concluir que no son capaces de seguir altas frecuencias de estímulo, ya que la τ en las células ciliadas del ajolote es igual a 3.7 ms –o sea, podrían responder sin corte a estímulos de hasta 250 Hz – y presentan una ganancia significativa con casi cero filtrado de la corriente de transducción. Por ejemplo, podemos esperar que una entrada de 250 pA con activación máxima de la corriente de transducción produzca un cambio de voltaje de alrededor de 103 mV evidentemente, antes de alcanzarse dicho voltaje, se activarán significativamente los canales de la membrana dependientes de voltaje, limitando con ello el desplazamiento de voltaje y disminuyendo la resistencia de entrada con lo que los voltajes reales esperados serán mucho menores.

Por todo lo anterior es de particular importancia el hecho de que los agonistas de los neuropéptidos que estudiamos puedan modificar significativamente la magnitud de las corrientes de K^+ , ya que ello puede alterar de forma significativa tanto la ganancia del sistema como su capacidad para seguir frecuencias.

Sobre las corrientes en células ciliadas se estudiaron los agonistas de los receptores a opioides DAGO, D-Pen-D-pen y el U50488 (μ , δ y κ respectivamente). Tanto el DAGO como el D-Pen-D-Pen no tuvieron efecto significativo sobre las corrientes iónicas dependientes de voltaje en las células aisladas. El único de los fármacos que tuvo efecto fue el U50488, mismo que disminuyó significativamente la corriente de Ca^{++} y las corrientes salientes. Los resultados obtenidos al registrar la corriente de Ca^{++} demuestran sin lugar a dudas que el U50488 ejerce un potente efecto inhibitor sobre dicha corriente; los resultados en este sentido son muy claros y no dejan lugar a dudas. Para definir el tipo de corriente saliente que modifica el U50488, y con la hipótesis de que su efecto ocurre básicamente sobre la corriente de K^+ dependiente de Ca^{++} , como una consecuencia del bloqueo de la corriente de Ca^{++} , estudiamos su acción en presencia de Cd^{++} extracelular. Antes cabe aclarar que, debido a que para estudiar las corrientes de Ca^{++} de forma aislada es necesario usar soluciones con modificaciones significativas en las concentraciones iónicas de K^+ y del propio Ca^{++} , cuando no sustituirlo por Ba^{++} , decidimos usar a la corriente de K^+ dependiente de Ca^{++} como testigo de los efectos de estas sustancias sobre la corriente de

Ca^{++} (con base en nuestros experimentos, no podemos descartar que exista un efecto directamente sobre la corriente de K^+ dependiente de Ca^{++} , aunque consideramos esto como poco probable). Encontramos que el Cd^{++} elimina un componente importante de la corriente saliente en las células ciliadas; componente que, hemos demostrado, se trata de la corriente de K^+ activada por Ca^{++} . Si antes de la aplicación del U50488 se perfunde la preparación con Cd^{++} desaparece completamente el efecto del U-50488 sobre las corrientes iónicas, indicando que esta sustancia actúa sobre la corriente de K^+ dependiente de Ca^{++} y que dicha acción es consecuencia del bloqueo de la corriente de Ca^{++} . Coincidentemente, a nivel del sistema nervioso central, se ha encontrado que la disminución en la liberación de los neurotransmisores causada por los agonistas del receptor κ se debe a la disminución de la corriente de calcio (Laorden y Milanes, 2000; Jeub y cols., 1999).

Estos resultados demuestran que los receptores κ se localizan en las células ciliadas y que producen un efecto de modulación negativa sobre las corrientes de calcio, como seguramente por la vía de segundos mensajeros. Tal acción sobre la corriente de Ca^{++} puede producir una importante influencia en la liberación del neurotransmisor aferente que se ha demostrado claramente, es dependiente de la entrada de Ca^{++} del medio extracelular. Ello permite explicar cabalmente el efecto de modulación negativa que sobre la descarga de las aferentes vestibulares tienen los agonistas κ , en tanto que los antagonistas producen un aumento en la descarga aferente. Nuestros resultados indican, además, que los receptores μ y δ no se encuentran ubicados en las células ciliadas, o que sus mecanismos de acción no modifican de forma significativa las corrientes iónicas dependientes de voltaje en estas células (Figura 39).

Este tipo de modulación de la corriente de Ca^{++} en las terminales sinápticas por los péptidos opioides parece ser uno de los mecanismos de acción más comunes de estas sustancias; es la forma en que las vías encefalínérgicas inhiben la liberación de sustancia P de las neuronas nociceptivas aferentes primarias hacia las neuronas de relevo en la médula espinal (McDonald y Nelson, 1978; Akil y cols., 1984; Carpenter y cols., 1996; Endoh y Suzuki, 1998).

Inmunohistoquímica.

Nuestros resultados indican que diversos grupos celulares producen neuropéptidos en el vestíbulo del ajolote. Por las características del marcaje que hemos obtenido, pensamos que muy probablemente la dinorfina es producida por algunos grupos de fibras eferentes que hacen

contacto sináptico en el polo basal de las células ciliadas ya que los anticuerpos contra dinorfina producen un puntilleo en la región basolateral de las células ciliadas, además de que marcan algunas fibras delgadas que se dirigen hacia el neuroepitelio. Por otra parte, los resultados obtenidos con los anticuerpos contra endorfinas sugieren que éstas son producidas por algunos grupos de neuronas ya que se marcan cuerpos neuronales en el nervio vestibular, sin que podamos saber si se trata de neuronas aferentes o células del sistema simpático. Es muy probable, entonces, que estos péptidos puedan ser liberados de forma retrógrada por las células aferentes o por células del sistema simpático, amén de que pudieran liberarse a nivel de los núcleos vestibulares. La posibilidad de que existan sinapsis retrógradas en el vestíbulo se ha discutido desde hace varios años. En las terminales sinápticas que inervan a las células ciliadas tipo I se han identificado la sinaptofisina, sinapsina I y rab3a (Dechesne y cols, 1997), las cuales son proteínas relacionadas con la liberación de neurotransmisor, y cuya presencia en las terminales aferentes sugiere que liberan algún mensajero de forma retrógrada. Se ha reportado también que las neuronas aferentes son inmunorreactivas a colin-acetil-transferasa (ChAT), a glicina y a glutamato (Bährle y cols, 1999). Se piensa que el glutamato es el neurotransmisor que liberan estas células a nivel central, pero que la glicina y la acetilcolina son liberadas de forma retrógrada sobre las células ciliadas. Midiendo la concentración de Ca^{++} intracelular mediante el uso de Fura-2 como marcador radiométrico en células ciliadas aisladas, se ha demostrado que la aplicación de glicina, al igual que la de glutamato, induce un cambio significativo en la concentración intracelular de Ca^{++} (Devau, 2000), dato que indica la presencia de autorreceptores para AAE que, se sabe, es de este tipo el transmisor aferente, así como receptores para glicina de tipo ionotrópico. En el vestíbulo del ajolote, hemos buscado este tipo de sinapsis recíprocas mediante el uso de la microscopia electrónica. Hemos encontrado evidencias que sugieren que pudieran existir contactos sinápticos entre las neuronas aferentes, de neuronas eferentes sobre neuronas aferentes y sinapsis recíprocas entre las células ciliadas y las neuronas aferentes. Lamentablemente no hemos podido obtener evidencia sólida que nos permita afirmar con un buen grado de certeza la existencia de tal tipo de conexiones sinápticas (Guevara, 1992).

Finalmente, el uso de anticuerpos contra encefalinas produjo un marcaje tenue y difuso, lo cual sugiere que este tipo de neuropéptido en el oído interno pudiera tener acciones que no están relacionadas con la transmisión sináptica aferente, tal como lo sugiere el hecho de que los

agonistas y antagonistas del receptor δ no producen ningún efecto significativo sobre la descarga de las neuronas aferentes vestibulares.

Cabe destacar que los anticuerpos disponibles en el mercado para el marcaje de encefalinas, beta-endorfina y dinorfinas, son anticuerpos contra el péptido mismo o contra una porción de él. En principio, una mejor estrategia de trabajo sería la de utilizar anticuerpos contra los receptores a los péptidos opioides. Lamentablemente, cuando iniciamos este trabajo no existían aún este tipo de anticuerpos, ni podemos asegurar que los receptores en mamíferos para los cuales están diseñados estos anticuerpos, sean iguales a los de los anfibios. No obstante, parecería deseable probar los anticuerpos contra los subtipos de receptores a opioides cuando se encuentren disponibles en el mercado. Con ello, además de especificidad, ganaríamos en el hecho de que, marcando directamente los receptores, tendríamos información relativa al sitio en que se ubican éstos y no sólo acerca de los tipos de neuronas que sintetizan uno u otro péptido.

Proencefalina y péptidos derivados

En los anfibios, principalmente en anuros, se ha demostrado la existencia de las tres principales familias de péptidos opioides y de los receptores opioides (Cone y Goldstein, 1982; Simon y cols., 1984 y 1985; Martens y cols., 1985).

El cerebro, hipófisis, retina, piel y sangre de la *Rana pipiens* poseen altas concentraciones de inmunorreactividad (IR) a met-encefalina (Jackson y cols., 1980). En tejidos de mamífero, el heptapéptido y el octapéptido se encuentran en cantidades equimolares; sin embargo, en el cerebro y células cromafines de anfibio, se ha detectado IR-heptapéptido pero no IR-octapéptido, lo que indica que el precursor de estos péptidos en anfibios, difiere en algunos aspectos con el de los mamíferos. El gen de la proencefalina en *Xenopus laevis*, codifica para 5 secuencias de met-encefalina, una del heptapéptido y en la posición correspondiente al octapéptido, muestra la siguiente secuencia: met-encefalina-Arg-Gly-Tyr, que sólo difiere del octapeptido de mamífero en el último aminoácido que es Tyr y no Leu. Las secuencias de met-encefalina, heptapéptido y met-encefalina-Arg-Gly-Tyr, en la proencefalina de *Xenopus laevis*, se encuentran en las mismas posiciones; están limitados por pares de aminoácidos básicos al igual que en los mamíferos, y su proporción es: 5 met-encefalinas, 1 heptapéptido, 1 met-encefalina-Arg-Gly-Tyr (Martens y Herbert, 1984).

En el cerebro del axolotl el precursor se procesa dando lugar en una mayor proporción a péptidos de bajo peso molecular como la met y leu-encefalina, heptapéptido y met-encefalina-Arg-Gly-Tyr, además de una baja proporción de intermediarios de alto peso molecular que contiene met-encefalina guardando una relación met-encefalina:leu-encefalina en el cerebro de 9:1 y 2:1 en la hipófisis (Asai y cols., 1988).

León-Olea y col., (1991) demostraron que las encefalinas están presentes en algunas fibras de la eminencia media, el lóbulo neural y el lóbulo anterior de la hipófisis de *Ambystoma mexicanum*. En los anfibios la existencia de leu-encefalina se ha demostrado en el cerebro de *Bufo marinus*, la retina de *Ambystoma tigrinum*, el encéfalo y la hipófisis de *Ambystoma mexicanum* así como en cerebro de *Xenopus laevis*. Sin embargo, la proencefalina en el anfibio *Xenopus laevis* no contiene leu-encefalina, por lo que se plantea que en los anfibios la leu-encefalina podría provenir de un precursor distinto a la proencefalina, probablemente la prodinorfina (Zamir y col., 1984).

Los péptidos contenidos en el sistema vestibular del ajolote fueron caracterizados cromatográficamente, la sinencefalina que es la región no opioide de la proencefalina y un marcador de la misma, se detectó en péptidos de alto peso molecular principalmente en moléculas que eluyen en Vo. La IR-met encefalina medida después de una digestión enzimática secuencial detectó la presencia de péptidos de bajo y mediano peso molecular, donde la met-encefalina se encuentra en menor proporción que las moléculas precursoras que eluyen a Vo, aunque también se observa procesamiento hacia péptidos pequeños 1.0 kDa. Al contrario de la met-encefalina, la leu-encefalina no es procesada en el oído del ajolote, conservando una elevada concentración de péptidos que contienen leu-encefalina de alto peso molecular. La presencia de met-encefalina y ausencia de leu-encefalina libre ha sido reportada en el cerebro del ajolote por el grupo del Dr. Vindrola (Rosete, 1999).

El conjunto de los resultados obtenidos en este trabajo, nos permite especular acerca de la función de los péptidos opioides en el vestíbulo, es obvio que en el oído interno del axolotl, al igual que en otras especies se encuentran presentes los péptidos opioides, y que estos juegan un papel fundamental en la codificación sensorial de este sistema, podemos también afirmar que estas sustancias actuarían a través de dos tipos de receptores, los κ y los μ . Los receptores κ , se encuentran sobre las células ciliadas y su activación disminuye la corriente de Ca^{++} , y consecuentemente la liberación del neurotransmisor aferente, esto nos permite pensar que el

sistema vestibular es capaz de modificar la cantidad de información que llega al sistema nervioso central. Probablemente ante estimulación continua o ante estímulos intensos el sistema eferente libere dinorfinas y estas al unirse al receptor κ presente en las región basal de las células ciliadas, disminuya la liberación del neurotransmisor aferente, que se sabe es un aminoácido excitador, de tal forma que la disminución de la liberación del transmisor aferente tendría un efecto neuroprotector. Existen reportes que indican que en la cóclea las encefalinas disminuyen la descarga espontánea de las fibras aferentes cocleares (Buerki y cols. 1993), la aplicación de (-) pentazocina agonista del receptor κ disminuyen la descarga de las fibras aferentes ante estímulos sonoros de intensidad elevada (Sahley y Nodar, 1994). Por otro lado, tendríamos a los receptores μ los cuales pensamos se encuentran ubicados en las fibras aferentes, ya que la aplicación de DAGO no modifica las corrientes iónicas de las células ciliadas, ni el efecto de agonistas y antagonistas colinérgicos. Los receptores μ tendrían un efecto antagónico a los receptores κ , la activación de los receptores μ aumenta la descarga de las fibras aferentes, probablemente modulando las corrientes en estas fibras, lo que aumentaría sensibilidad del sistema. Podemos especular que ante estímulos de baja intensidad, quizá sub-umbral, las fibras aferentes serían capaces de generar potenciales de acción y de tal forma informar al sistema nervioso de movimientos de muy baja amplitud. En conjunto, estos resultados apuntan entonces a un control dual por parte de los péptidos opioides sobre la actividad de las aferentes vestibulares que repercutiría sobre la forma en que el sistema nervioso codifica los movimientos a los que es sometida la cabeza.

Conclusiones

Los péptidos opioides ejercen una modulación compleja en el sistema vestibular del ajolote a través de diferentes tipos de receptores. En el vestíbulo existen los precursores de la proencefalina y los mecanismos de corte para llevarla a péptidos de bajo peso molecular como la met-enkefalina. Existe también inmunorreactividad específica a dinorfina y β -endorfina

Receptor μ :

- 1) Este receptor posiblemente se encuentra presente en las fibras aferentes vestibulares ejerciendo un efecto excitador sobre la descarga de estas fibras.

- 2) La activación del receptor μ no modifica la liberación de Ach de las fibras eferentes vestibulares, ni los agonistas del receptor μ son capaces de activar de forma directa receptores de tipo colinérgico.
- 3) Nuestros resultados sugieren que en las células ciliadas no se encuentran presentes los receptores μ .
- 4) Los anticuerpos a dinorfina 1-8 marcan fibras en la base de los epitelios sensoriales, estas fibras pueden ser fibras aferentes o fibras del sistema simpático que liberan dinorfinas que se unen al receptor μ .

Receptor κ .

- 1) Este receptor se encuentra en la superficie basolateral de las células ciliadas e inhibe la frecuencia de descarga de las fibras aferentes vestibulares; aunque, no podemos excluir que pudieran también existir receptores κ sobre las fibras aferentes ejerciendo también en ellas un efecto de tipo inhibidor.
- 2) En las células ciliadas aisladas la activación de este receptor, disminuye la corriente de calcio, y consecuentemente la liberación del neurotransmisor aferente.
- 3) Los anticuerpos contra β -endorfina marcan fibras probablemente eferentes en la base del neuroepitelio sensorial, y en la parte basolateral de las células sensoriales. Posiblemente estas endorfinas sean las responsables de la activación del receptor κ presente en las células ciliadas.

Receptor δ .

- 1) Los agonistas y antagonistas de este receptor no modifican la frecuencia de descarga de las fibras aferentes vestibulares.
- 2) El agonista de este receptor no modifica las corrientes voltaje dependientes en las células ciliadas aisladas
- 3) Los anticuerpos contra encefalina produjeron una marca difusa de todas las estructuras vestibulares, lo que nos indica que posiblemente se trate de una unión inespecífica del anticuerpo.

Conclusión final

El estudio de la neurofarmacología de los péptidos opioides en el sistema vestibular aislado, su influencia sobre las corrientes iónicas en células ciliadas y la inmunorreactividad de los órganos vestibulares a dinorfina 1-8 y a la beta-endorfina, la presencia en el radioinmunoensayo de sinencefalina y met-enkefalina nos permiten concluir que los péptidos opioides tienen un importante papel en la determinación de la descarga de las aferentes vestibulares. Nuestros resultados de inmunohistoquímica indican que, tanto la dinorfina 1-8 como la beta-endorfina se

encuentran en fibras que llegan a las zonas sensoriales del vestíbulo. Con base en los experimentos electrofisiológicos concluimos que los receptores de tipo κ se encuentran en las células ciliadas, donde ejercen un efecto inhibitor modulando la liberación del neurotransmisor aferente a través de modificaciones en la corriente de Ca^{++} , en tanto que los receptores de tipo μ se localizan probablemente sobre las neuronas aferentes donde ejercen un efecto excitador.

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, D.J. y Trequattrini C. (1998) Opioid receptor-mediated inhibition of omega-conotoxin GVIA sensible calcium channel currents in rat intracardiac neurons. *J. Neurophysiol.* **79:2**, 753-762.

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.

Adams, J.U. y Holtzman, S.G. (1990a) Naltrexone sensitizing effects of centrally administered morphine and opioid peptides. *European J. Pharmacol.* **193**, 67-73.

Adams, J.U. y Holtzman, S.G. (1990b) Pharmacologic characterization of the sensitization to the rate decreasing effects of naltrexone induced by acute opioid pretreatment in rats. *J Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 483-489.

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 Engström, H. (1974) Anatomy of the inner ear. In: *Handbook of Sensory Physiology*. Vol VI (ed.) Keidel, W.D. y Neff, W.D. Springer Verlag. Berlin. 125-158.

Akil, H., Mayer, D. y Lienbeskind, J. (1976) Antagonism of stimulation produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science* **191**, 961-962.

Akil, H., Watson, S.J., Young, E., Lewis, M. E., Khachaturian, K. y Walder, J.M. (1984) Endogenous opioids biology and function. *Ann. Rev. Neurosci.* **7**, 223-256.

Akoev, G., Andrianov, G.N., Szabo, T. y Bromm, B. (1991) Neuropharmacological analysis of synaptic transmission in the Lorentzinian ampulla of the skate *Raja clavata*. *J. Comp. Physiol. A* **168**, 639-646.

- Altschuler, R.A. y Fex, J. (1986) Efferent neurotransmitters. In: *Neurobiology of Hearing: The Cochlea*. Altschuler, R.A., Hoffman, D.W. y 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.
- Amaro, J., Guth, P.S. y Wanderlinder, L. (1966) Inhibition of auditory nerve action potentials by acetylcholine and physostigmine. *Brit. J. Pharmacol.* **28**, 207.
- Anderson, A.D., Trouanovskaya, M. y Wackym, P.A. (1997) Differential expression of alpha2-7, alpha9 and beta2-4 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA in the vestibular end-organ and Scarpa's ganglia of the rat. *Brain Res.* **19**, 409-413.
- Andrianov, G.N. y Ryzhova, I.V. (1999) Opioid peptides as possible neuromodulators of the afferent synaptic transmission in the frog semicircular canal. *Neuroscience* **93**, 802-806.
- Anniko, M. (1988) Functional morphology of the vestibular system. In: *Physiology of the ear*, (Ed) Jhan, A.F., Sacchi, S. Raven Press, New York, 457-472.
- Annoni, J., Cochran, S. y Precht, W. (1984) Pharmacology of the vestibular hair cell afferent fiber synapse in the frog. *J. Neurosci.* **4**, 2106-2116.
- Apicella, S., Chen, S., Bing, R., Penniston, J.T., Llinas, R. y Hillman, D.E. (1997) Plasmalemmal ATPase calcium pump localizes to inner and outer hair bundles. *Neuroscience* **79**, 1145-1151.
- Armstrong, C.E. y Roberts, W.M. (1998) Electrical properties of frog saccular hair cells: distortion by enzymatic dissociation. *J. Neurosci.* **18**, 2962-2973.
- Asai, M., Cano, A., Talavera, E., Zubieta, M. (1988) IR-met and IR-leu-enkephalin content in the axolotl brain (*Ambystoma mexicanum*). *Neuropeptides* **12**, 41-42.
- Assad, J. A. y Corey, D. P. (1992) An active motor model for adaptation by vertebrate hair cells. *J. Neurosci.* **12**, 3291-3309.
- Bailey, G.P. y Sewell, W.F. (2000 a) Pharmacological characterization of the CGRP receptor in the lateral line organ of *Xenopus laevis*. *JARO* **1**, 82-88.
- Bailey, G.P. y Sewell, W.F. (2000 b) Calcitonin gene-related peptide suppresses hair cell responses to mechanical stimulation in the *Xenopus* lateral line organ. *J. Neurosci.* **20**, 5163-5169

- Bäurle, J., Brüning, G., Schemann, M., Nishiike, S. y Guldin W. (1999) Co-localization of glutamate, choline acetyltransferase and glycine in the mammalian vestibular ganglion and periphery. *Neuroreport* **10**, 3517-3521.
- Becker, C., Pohl, M., Thiebot, M. H., Collin, E., Hamon, M., Cesselin, F. y Benoliel, J. J. (2000) Delta-opioid receptor-mediated increase in cortical extracellular levels of cholecystokinin-like material by subchronic morphine in rats. *Neuropharmacology* **39**(2):161-71.
- Becker, C., Hamon, M., Cesselin, F. y Benoliel, J. J. (1999) Delta(2)-opioid receptor mediation of morphine-induced CCK release in the frontal cortex of the freely moving rat. *Synapse* **34**(1):47-54
- Bixby, J.L. y Spitzer, N.C. (1983) Enkephalin reduces calcium action potentials in Rohon beard neurons in vivo. *J. Neurosci.* **3**, 1014-1018.
- 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., Jastreboff, P.J., Fallon, M. y Littman, T. (1990) Nimodipine, an L channel Ca^{2+} antagonist, reverses the negative summing potential recorded from the guinea pig cochlea. *Hearing Res.* **46**, 277-288.
- Bonner, K.A., Grotin, J., Gioamnin, T., Cortes, M. y Simon E.J. (1981) Opiate receptor heterogeneity in human brain regions. *Brain Res.* **221**, 437-440.
- Borasio, P.G., Biondi, C., Ferretti, M.E., Fabbri, E. y Pareschi, C. (1989) Supra-additive stimulation of adenylate cyclase activity by prostaglandin E_2 and d-Ala²-Met-Enkephalinamide in the Guinea-pig superior cervical ganglion: Role of Mg^{2+} ions. *Neurochem Res.* **14**, 1181-1186.
- Boyle, R. y Highstein, S. M. (1990) Efferent vestibular system in the toadfish: action upon horizontal semicircular canal afferents. *J. Neurosci.* **10**, 1570-1582.
- Boyer, C., Art, J.J., Dechesne, C.J., Lehouelleur, J., Vautrin, J. y Sans, A. (2001) Contribution of the plasmalemma to Ca^{2+} homeostasis in hair cells. *J. Neurosci.* **21**, 2640-2650
- Bracho, H. y Budelli, R. (1978) Generation of resting membrane potentials in an inner ear cell system. *J. Physiol.* **281**, 445-465.

Bradbury, A.F., Feldberg, W.F., Smyth, D.G. y Snell, C. Lipotropin C fragment: an endogenous peptide with potent analgesic activity. In: *Opiate and endogenous opioid peptides*. Kosterlitz, H.W. (ed) Elsevier, Amsterdam. 1976 pp 9-17.

Bryant, S.D., Salvadori, S., Cooper, P.S. y Lazarus, L.H. (1998) New δ -opioid antagonists as pharmacological probes. *TIPS* **19**, 42-46.

Buerki, C., Felix, D. y Ehrenberger, K. (1993) Enkephalin suppresses afferent cochlear neurotransmission. *Otorhinolaryngologia* **55**, 3-6.

Carpenter, E., Gent, J.P. y Peers, C. (1996) Opioid receptor independent inhibition of Ca^{2+} and K^{+} currents in NG108-15 cell by kappa opioid receptor agonist U50488H. *Neuroreport* **7**, 1809-1812.

Chu, X. P., Xu, N. S., Li, P. y Wang, J. Q. (1999) Endomorphin-1 and endomorphin-2, endogenous ligands for the mu-opioid receptor, inhibit electrical activity of rat rostral ventrolateral medulla neurons in vitro. *Neuroscience* **93**, 681-6.

Clark, J.A., Liu, L., Price, M., Hersh, B., Endelson, M. y Pasternak, G.W. (1989) Kappa opiate receptor multiplicity: evidence for two U50-488 sensitive K1 subtypes and novel K3 subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**, 461-468.

Cochran, S.L. (1992) Peripheral vestibular transmission. en *Sensing and Controlling Motion*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **656**, 580-593.

Collins, R. L., Zavala, A.R., Nazarian, A., y McDougall, S. A. (2000) kappa-Opioid receptors in the substantia nigra pars reticulata mediate the U-50,488-induced locomotor activity of preweanling rats. *Dev. Brain Res.* **119**, 97-103.

Comb, M., Seeburg, P.H., Adelman, J., Eiden, L. y Herbert, E. (1982) Primary structure of the human met- and leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* **295**, 663-664.

Cone, R.I. y Goldstein, A. (1982) A dynorphin-like opioid in the central nervous system of an amphibian. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **79**, 3345-3349

Connor, J.A. y Stevens, C.F. (1971a) Inward and delayed outward membrane currents in isolated neural somata under voltage clamp. *J. Physiol.* **213**, 1-19.

Connor, J.A. y Stevens, C.F. (1971b) Voltage clamp studies of a transient membrane outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol.* **213**, 21-30.

Correia, M.J. y Lang, D.G. (1990) An electrophysiological comparison of solitary type I and type II vestibular hair cells. *Neurosci. Lett.* **116**, 106-111.

- Crawford, A.C. y Fettiplace, R. (1980) The frequency selectivity of auditory nerve fibers and hair cells in the cochlea of the turtle. *J. Physiol.* **306**, 79-125.
- Crawford, A.C., Evans, M. G. y Fettiplace, R. (1991) The action of calcium in the mechano-electrical transducer current of turtle hair cells. *J. Physiol.* **434**, 369-398.
- Crawford, A.C., Evans, M.G. y Fettiplace, R. (1989) Activation and adaptation of transducer currents in turtle hair cells. *J. Physiol.* **419**, 405-434.
- Cruz, L. R. (1994) Patrón de innervación, ultraestructura y biofísica de los canales semicirculares en el *Ambystoma tigrinum*. Tesis de Licenciatura, Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Puebla.
- Chang, K.J., Cooper, B.R., Hazum, E. y Cuatrecasas, P. (1979) Multiple opiate receptor: Different regional distribution in the brain and differential binding of opiate and opioid peptides. *Mol Pharmacol.* **16**, 91-104.
- Chang, K.J. y Cuatrecasas, P. (1979) Multiple opiate receptors. *J. Biol. Chem.* **254**, 2610-2618.
- Darlison, M.G. y Richter, D. Multiple genes for neuropeptides and their receptors: co-evolution and physiology. *Trends in Neurosci.* **22**, 81-88.
- Dechesne, C.J., Hampson, D.R., Goping, G., Wheaton, K.D. y Wenthold, R.J. (1991) Identification and localization of a kainate binding protein in the frog inner ear by electron microscopy immunocytochemistry. *Brain Res.* **545**, 223-233.
- Dechesne, C.J., Kauff, C., Stettler, O. y Tavitian, B. (1997) Rab3A immunolocalization in the mammalian vestibular end-organs during development and comparison with synaptophysin expression. *Dev. Brain Res.* **99**, 103-111.
- Dechesne, C., Raymond, J. y Sans, A. (1984) The efferent vestibular system in the cat: a horseradish peroxidase and fluorescent retrograde tracers study. *Neurosci.* **11**, 893-901.
- del Castillo, J. y Katz, B. (1954) Quantal components of the end plate potential. *J. Physiol.* **124**, 560-573.
- Devau, G. (2000) Glycine induced calcium concentration changes in vestibular type I sensory cells. *Hearing Res.* **140**, 126-136.
- Dieringer, N., Blanks R. H. I. y Precht, W. (1977) Cat efferent vestibular system: weak suppression of primary afferent activity. *Neurosci. Lett.* **5**, 285-290.
- Drescher, D.G. y Drescher, M.J. (1987) Calcium dependence and magnesium dependence of spontaneous and evoked afferent neural activity in the lateral line organ of *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **87A**, 305-310.

- Dunnebier, E.A., Segenhout, J.M., Kalicharan, D., Jongbloed, W.L., Wit, H.P. y Albers, F.W.J. (1995) Low-voltage field-emission scanning electron microscopy of non-coated guinea-pig hair cell stereocilia. *Hearing Res.* **90**, 139-148.
- Eatock, R.A. and Rusch, A. (1997) Developmental changes in the physiology of hair cells. *Semin Cell Dev Biol* **8**(3), 265-275.
- Eden, A. y Correia, M. (1982) Identification of multiple groups of efferent vestibular neurons in the adult pigeon using horseradish peroxidase and DAPI. *Brain Res.* **248**, 201-208.
- El-Beheiry, H. y Puil, E. (1990) Effects of hypomagnesia on transmitter actions in neocortical slices. *British J. Pharmacol* **101**, 1006-1010.
- Elgoyhen, A.B., Vetter, D.E., Katz, E., Rothlin, C.V., Heinnemann, S. Y Bouter, J. (2000) α -10 A determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 3501-3506.
- Elgoyhen, A.B., Johnson, D.S., Boulter, J., Vetter, D.E. y Heinnemann, S. (1994) α -9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell.* **18**, 705-715.
- Endoh, T. y Suzuki, T. (1998) The regulating manner of opioid receptors on distinct types of calcium channels in hamster submandibular ganglion cells. *Arch. Oral. Biol.* **43**, 221-233.
- 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.
- ErosteGUI, C., Norris, C. H. Y Bobbin R.P. (1994) In vitro pharmacologic characterization of cholinergic receptor on outer hair cells. *Hear. Res.* **74**, 135-147.
- Espamer, V. y Melchiorri, P. (1980) Active polipeptides: from amphibian skin to gastrointestinal tract and brain of mammals. *Trends Pharmacol Sci.* **1**, 391-395.
- Evans, C. J., Keith Jr. D.E., Morrison, H., Magendzo, K. y Edwards, R.H. (1993) Cloning of delta opioid receptor by functional expression. *Science* **258**, 1952-1955.
- Eybalin, M. (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol. Rev.* **73**, 309-373.
- 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., Abou-Madi, L., Rossier, J. y Pujol, R. (1985a) Electron microscopic localization of N-terminal proenkephalin (synenkephalin) 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-enképhaline 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-arg⁶-gly⁷-leu⁸ 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. *Hearing Res.* **24**, 29-38.
- Eybalin, M., Pujol, R. y Bockaert, J. (1987) Opioid receptors inhibit the adenylate cyclase in guinea pig cochleas. *Brain Res.* **421**, 336-342.
- Felix, D. y Ehrenberger, K. (1985) The action of putative neurotransmitter substances in the mammalian labyrinth. En: *Auditory Biochemistry*. D.G. Drescher. (Ed.) CVharles C. Thomas, SP, 68-79.
- Fermin, C. e Igarashi, M. (1987) Morphometry and ultrastructure of the Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*) vestibular nerve. *Acta anat* 129-188
- Fettiplace, R. y Fuchs, P.A. (1999) Mechanisms of hair cell tuning. *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 809-834.
- 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. En: *Auditory Biochem.* (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.
- Feuerstein, T.J., Albrecht, C., Wessler, I., Zentner, J. y Jackisch, R. (1998) delta 1-Opioid receptor-mediated control of acetylcholine (ACh) release in human neocortex slices. *Int J Dev Neurosci.* **16**, 795-802.

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., Flock, B. y Murray, E. (1977) Studies on the sensory hairs of receptor cells in the inner ear. *Acta Otolaryngol.* **83**, 85-91.

Flock, A. y Russell, I. J. (1976) Inhibition by afferent nerve fibres: action on hair cells an afferent synaptic transmission in the lateral line canal organ of the burbot *Lota lota*. *J. Physiol. London.* **257**, 45-72.

Flores, A. (1997) Papel de los receptores NMDA en la entrada sináptica y la generación de no linealidades en las aferentes vestibulares del axolotl. Tesis para obtener el grado de Doctor en Fisiología. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN.

Flores, A., Soto, E. y Vega, R. (2001) Nitric oxide in the afferent synaptic transmission of the axolotl vestibular system. *Neuroscience* **103**, 457-464.

Freye, E., Hartung, E. y Sank G.K. (1982) Perfusion of the fourth cerebral ventricle with synthetic opioid peptide, FK 33-824, induces dose related bradycardia and naloxone-reversible respiratory depression in the awake dog. *Parmacology* **25**, 6-11.

Fritzsch, B. (1981) Efferent neurons to the labyrinth of *Salamandra salamandra* as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neurosci. Lett.* **26**, 192-196.

Fritzsch, B. (1996) How does the urodele ear develop?. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 763-771.

Fritzsch, B. y Crapon de Caprona, D. (1984) The origin of centrifugal inner ear fibers of gymnophions (amphibia). A horseradish peroxidase study. *Neurosci. Lett.* **46**, 131-136.

Fuchs, P.A., Evans, M.G. y Murrow, B.W. (1990) Calcium current in hair cells isolated from the cochlea of the chick. *J. Physiol.* **429**, 553-568.

Fuchs, P.A. (1996) Synaptic transmission at vertebrate hair cells. *Current Opinion in Neurobiol.* **5**, 514-519.

Fujino, K., Ito, J. y Tsuji, J. (1993) Efferent vestibular fibers to otolith organs in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* **113**, 598-600.

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.

García Andrade, J.M. (1996) Caracterización de los receptores a aminoácidos excitadores de tipo metabotrópico en el oído interno del axolotl (*Ambystoma tigrinum*). Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Fisiológicas, Instituto de Fisiología de la Universidad Autónoma de Puebla.

Géléoc, G.S.G., Lennan, G.W.T., Richardson, G.P. y Kros, J. (1997) A quantitative comparison of mechano-electrical transduction in vestibular and auditory hair cells of neonatal mice. *Proc. R. Soc. Lond. B* **264**, 611-621.

Gil-Loyzaga, P., Cupo, A. y Eybalin, M. (1988) Met-enkephalin and Met-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ immunofluorescence in the developing guinea-pig organ of Corti. *Developmental Brain Res.* **42**, 142-145.

Gillespie, P.G. (1995) Molecular machinery of auditory and vestibular transduction. *Current opinion in Neurobiol.* **5**, 449-455.

Gillespie, P.G. (1997) Multiple myosin motors and mechano-electrical transduction by hair cells. *Biol. Bull.* **192**, 186-190.

Gisselsson, L. (1960) Effect on microphonics of acetylcholine injected into the endolymphatic space. *Acta Otolaryng. (Stokh)* **51**, 636.

Goldberg, J.M. y Fernández, C. (1980) Efferent vestibular system in squirrel monkey: anatomical localization and influence on afferent activity. *J. Neurophysiol.* **43**, 986-1025.

Goldberg, J.M. y Fernández, C. (1984) The vestibular system. In: *Handbook of Physiology Vol III. The Nervous System*, Part I. (Ed) American Physiological Society 977-1022.

Goldstein, A., Loweney, I. y Palk. (1971) Stereospecific and nonspecific interactions of morphine congener, levorphanol in subcellular fraction of mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**, 1742-1747.

Grierschik, P., Steissleinger, M., Sidiropoulos, D., Herrmann, E., y Jakobs, K.H. (1989): Dual Mg⁺⁺ control of formyl-peptide-receptor-G-protein interaction in HL 60 cells. *Eur. J Biochem.* **183**, 97-105.

Gubler, U., Seeburg, P., Hoffman, B.J., Gage, L.P. y Uderfriend, S. (1982) Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. *Nature* **295**, 206-208.

Guevara, J. (1992) Análisis de los patrones de inervación en células ciliadas del sistema vestibular del axolotl (*Ambystoma tigrinum*). Tesis para obtener el título de Químico Farmacobiólogo, Universidad Autónoma de Puebla.

Gulley, R.L. y Bagger-Sjback, 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. y Reese, T.S. (1977) Freeze fracture studies on the synapses in the organ of Corti. *J. Comp. Neurol.* **171**, 517-544.

Gustafsson, H., Afrah, A., Brodin, E. y Stiller, C. O. (1999) Pharmacological characterization of morphine-induced in vivo release of cholecystokinin in rat dorsal horn: effects of ion channel blockers. *J Neurochem* **73**(3):1145-54.

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. y Norris, C.H. (1984) Pharmacology of the isolated semicircular canal: affect of GABA and picrotoxin. *Exp. Brain Res.*, **56**, 72-78.

Guth, P.S., Holtc, J.C., Perin, P., Athas, G., Garcia, M., Puri, A., Zucca, G., Botta, L. y Valli, P. (1999) The metabotropic glutamate receptors of the vestibular organs. *Hearing Res.* **125**, 154-162.

Guth, P.S., Perin, P., Norris, C.H. y Valli, P. (1998) The vestibular hair cells: post-transductional signal processing. *Prog. in Neurobiol.* **54**, 193-247.

Hackney, C.M. y Furness, D.N. (1995) Mechanotransduction in vertebrate hair cells: structure and function of the stereociliary bundle. *Am. J Physiol.* **268**, C1-C13. Hamil, O.P., Marty, A.,

Hamilton, D. (1968) The calyceal synapse of type I vestibular hair cells. *J. Ultrastructure Res.* **23**, 98-114.

Hansen, P.E. y Morgan, B.A. (1984) Structure-activity relationship in enkephalin peptides. *The peptides*. Ed. D. Meienhofer y S. Undeerfriend. Academic Press. New York **6**, 269-321.

Harper, A., Blythe, W.R., Grossman, G., Pertrusz, P., Prazma, J. y Pillsbury, H.C. (1995) Immunocytochemical localization of aspartate and glutamate in the peripheral vestibular system. *Hearing Res.* **86**, 171-182.

Hille, B. (1984) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Assoc. Inc. Sunderland, Massachusetts.

Hodking, A. L. y Huxley, A. F. (1952a). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **116**, 449-472.

Hodgkin, A.L. y Huxley, A. F. (1952b) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500-544.

- 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., Jones-King, K.L. y Altschuler R.A. (1988) Putative Neurotransmitter in the rat cochlea at several ages. *Brain Res.* **460**, 366-368.
- 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.
- Holt, J.C. Lioudyno, M., Atlas, G., Garcia, M.M., Perin, P. and Guth, P.S. (2001) The effect of proteolytic enzymes on the alpha9-nicotinic receptor-mediated response in isolated frog vestibular hair cell. *Hear. Res.* **152**, 25-42.
- Honrubia, V., Sitko, S., Lee, r., Kuruvilla, A. y Schwartz, I.R Anatomical Characteristics of anterior vestibular nerve of the bullfrog. *Laryngoscope.* **94**, 464-474.
- Housley, G.D., Norris, C.H. y Guth, P. (1990) Cholinergically-induced changes in outward currents in hair cells isolated from the semicircular canal of the frog. *Hearing Res.* **43**, 121-134.
- Holt, J.R. y Eatock, R.A. (1995) Inwardly rectifying currents of saccular hair cells from the leopard frog. *J. Neurophysiol.* **73**, 1484-1502.
- Howard, J., Roberts, W.M., Hudspeth, A.J. (1988) Mechano-electrical transduction by hair cells. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **17**, 99-124.
- Hruby, J.V. y Gehrig, C.A. (1989) Recent developments in the design of receptor specific opioid peptides. *Med. Res. Revs.* **9**, 343-401.
- Hudspeth, A.J. (1983) Mechano-electrical transduction by hair cells in the acousticolateralis sensory system. *Ann. Rev. Neurosci.* **6**, 187-215.
- Hudspeth, A.J. y Corey, D.P. (1977) Sensitivity, and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 2407-2411.
- Hudspeth, A.J. y Lewis, R.S. (1988 a) Kinetic analysis of voltage and ion dependent conductances in saccular hair cells of the bull-frog, *Rana catesbiana*. *J. Physiol.* **400**, 237-274.
- Hudspeth, A.J. y Lewis, R.S. (1988 b) A model for electrical resonance and frequency tuning in saccular hair cells of the bull-frog, *Rana catesbiana*. *J. Physiol.* **400**, 275-297.

Hughes, J., Smith, T., Kosterlitz, H., Fothergill, L., Morgan, B. y Morris, H. (1975) Identification of two related peptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **255**, 577-579.

Hurley, K.M. y Eatock, R.A. (1999) Characterization and modulation of a delayed rectifier in vestibular type I hair cells. *Assoc. Res. Otolaryngol. Abs.* **22**, 764.

Issa, N.P. y Hudspeth, A.J. (1994) Clustering of Ca^{2+} channels and Ca^{2+} activated K^{+} channels at fluorescently labeled presynaptic active zones of hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 7578-7582.

Jack, J.J.B., Noble, D. y Tsien, R. W. (1975) *Electrical current flow in excitable cells*. Clarendon Press, Oxford.

Jackson, Y., Bolafi, J. y Guillemin, R. (1980) Presence of immunoreactive beta-endorphin and enkephalin-like material in the retina and other tissues of the frog, *Rana pipiens*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **42**, 505-508.

Jaramillo, F. (1995) Signal transduction in hair cells and its regulation by calcium. *Neuron* **15**, 1227-1230.

Jaramillo, F. y Hudspeth, A.J. (1993) Displacement-clamp measurement of the forces exerted by gating springs in the hair bundle. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **90**, 1330-1334.

Jeub, M., Lie, A., Blumcke, I., Elger, C. E. y Beck, H. (1999) Loss of dynorphin-mediated inhibition of voltage-dependent Ca^{2+} currents in hippocampal granule cells isolated from epilepsy patients is associated with mossy fiber sprouting. *Neuroscience* **94**(2):465-71.

Jorgensen, F. y Ohmori, H. (1988) Amiloride blocks the mechano electrical transduction channel of hair cells of the chick. *J. Physiol.* **403**, 577-588.

Kakagawa, T., Ozawa, T., Watanabe, T., Minami, M. y Satoh, M. (1999) Sensitization of the adenylyl cyclase system in cloned kappa-opioid receptor transfected cells following sustained agonist treatment: a chimeric study using G protein $\alpha(i)/\alpha(q)$ subunits. *Jpn. J. Pharmacol.* **81**, 353-361.

Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, H., Marimato, Y., Hirose, T., Asai, M., y all. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β -neoendorphin/dynorphin precursor. *Nature* **298**, 245-249.

Kalant H (1989) The nature of addiction: An analysis of the problem. En: *Molecular and Cellular Aspects of the Drug Addictions*, Goldstein A, ed. New York, Springer-Verlag, pp. 1-28

Kataoka, Y. y Ohomori, H. (1996) Of know neurotransmitters, glutamate is the most likely to be released from chick cochlear hair cells. *J Neurophysiol.* **76**, 1870-1879.

- Kieffer, B.L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C. y Hirth, C.G. (1992) The delta-opioid receptor isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* **89**, 12048-12052.
- King A.P., Hall K.E. y Macdonald R.L. (1999) kappa- and mu-Opioid inhibition of N-type calcium currents is attenuated by 4beta-phorbol 12-myristate 13-acetate and protein kinase C in rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* **289**(1):312-20
- Klinke, R. (1986) Neurotransmission in the inner ear. *Hearing Res.* **22**, 235-243.
- Konishi, S., Tsunoo, A., y Otsuka, M. (1981) Enkephalin as a transmitter for presynaptic inhibition in sympathetic ganglia. *Nature* **294**, 80-82.
- Kosterlitz, H. W. Possible physiological significance of multiple endogenous opioid agonists. En: *Mechanisms of Pain and Analgesic Compound*. R.F. Ber, E.G. Basset (Eds). Raven Press. N.Y. 207-214. 1979.
- Kosterlitz, H. W., Paterson, S. J. y Robson, L. E. (1981) Characterization of the kappa-subtype of the opiate receptor in the guinea pig brain. *Br. J. Pharmacol.* **73**, 939-949.
- Kosterlitz, H.W. y Waterfield, A.A. (1975) *In vitro* models in the study of structure-activity relationships of narcotic analgesics. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **15**, 29-47.
- Kroese, A. B. A., Das, A. y Hudspeth, A. J. (1989) Blockage of the transduction channels of hair cells in the bullfrog's sacculus by aminoglycoside antibiotics. *Hearing Res.* **37**, 203-218.
- Lamprecht, J. y Meyer zum Gottesberge, A.M.(1988) The presence and localization of receptors for atrial natriuretic peptide in the inner ear of the guinea pig. *Arch. Otorhinolaringol.* **245**, 300-301.
- Laorden, M. L. y Milanes, M. V. (2000) Effects of U-50,488H and U-50,488H withdrawal on catecholaminergic neurons of the rat hypothalamus. *Life Sci.* **66**, 803-815.
- Lenzi, D., Runyeon, J.W., Crum, J., Ellisman, M.H. y Roberts, W.M. (1999) Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography. *J. Neurosci.* **19**, 119-132.
- León-Olea, M., Sanchez-Alvarez, M., Pina, A.L. y Bayon, A. (1991) Evidence for enkephalin- and endorphin-immunoreactive cells in the anterior pituitary of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *J Comp Neurol.* **305**, 412-420.
- Lewis, M.K., Khachaturian, H. y Watson S.J. (1982) Visualization of opiate receptors and opioid peptides in sequential brain section. *Life Sci.* **31**, 1247-1250.
- Lewis, R.S. y Hudspeth, A.J. (1983) Voltage and ion dependent conductances in solitary vertebrate hair cells. *Nature* **304**, 538-541.

- Light, A. R. y Willcockson, H. H. (1999) Spinal laminae I-II neurons in rat recorded in vivo in whole cell, tight seal configuration: properties and opioid responses. *J Neurophysiol.* **82**, 3316-26.
- Lioudyno, M.I., Verbitsky, M., Holt, J.C. Elgoyhen A.B. and Guth P.S. (2000) Morphine inhibits an alpha9-acetylcholine nicotinic receptor- mediated response by a mechanism which does not involve opioid receptors. **149**, 167-177.
- Liu, Q. S., Han, S., Jia, Y. S. y Ju, G. (1999) Selective modulation of excitatory transmission by mu-opioid receptor activation in rat supraoptic neurons. *J Neurophysiol.* **82**, 3000-3005.
- Lopez I., Ishiyama A., Jen L.C., Liu F. y Baloh R.W. (1999) Differential subcellular immunolocalization of voltage-gated calcium channel α_1 subunits in the chinchilla cristae ampullaris. *Neurosci.* **92**, 773-782.
- Lopez, I., Wu, Y. J. y Meza, G. (1992) Immunocytochemical Evidence for an afferent GABAergic neurotransmission in the guinea pig vestibular system. *Brain Res.* **589**, 341-348.
- Lord, J. A. H., Waterfield, A.A., Hughes, J. y Kosterlitz, H. (1977) Endogenous opioid peptides multiple agonists and receptors. *Nature* **267**, 495-499.
- Martens, G., Givelli, O. y Herbert, E. (1985) Nucleotide sequence of cloned cDNA for proopiomelanocortin in amphibian *Xenopus laevis*, *J. Biol. Chem.* **260**, 13685-13689.
- Martens, G. y Herbert, E. (1984) Polymorphism and absence of leu-enkephalin sequences in preoenkephalin genes in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **260**, 13685-13689.
- Martin, W. E., Eades, C.B., Thompson, J.A. Hupper, R.E. y Gibert, P.E. (1976) The effects of morphine and nalorphine like drugs in the non-dependent and morphine dependent chronic spinal dog. *J. Pharma. Exp. Ther.* **197**, 517-532.
- Martin, W.R. (1984) Pharmacology of opioids. *Pharmacol. Revs.* **35**, 283-323.
- Martin, I. Aleixandre, A. y García de Jalon, P. (1982) Sensitization by in-vitro incubation with morphine of the myenteric plexus-longitudinal muscle preparation. *J. Pharmacol.* **13**, 3-10.
- Martinez Dunst, C., Michaells, R.L. y Fuchs, P.A. (1997) Release sites and calcium channels in hair cells of the chick's cochlea. *J. Neurosci.* **17**, 9133-9144.
- Massetto, S., Russo, G. y Prigioni, I. (1994) Differential expression of potassium currents by hair cells in thin slices of frog crista ampullaris. *J. Neurophysiol.* **72**, 443-455.

- Masetto, S., Perin, P., Malusà, A., Zucca, G y Valli, P. (2000) Membrane properties of chick semicircular canal hair cells in situ during embryonic development. *J Neurophysiol.* **5**, 2740-2756.
- Mayer, D. y Liebeskind, J. (1974) Pain reduction by local electrical stimulation of the brain. An anatomical behavioral analysis. *Brain Res.* **98**, 73-93.
- McCue, M.P. y Guinan, J.J. (1994) Influence of efferent stimulation on the acoustically responsive vestibular afferents in the cat. *J. Neurosci.* **14**, 6071-6083.
- McDonald, R.L. y Nelson, P.G. (1978) Specific opiate induced depression of transmitter release from dorsal root ganglion cells in culture. *Science* **199**, 1449-1451.
- McGinty J. F. (1999) Regulation of neurotransmitter interactions in the ventral striatum. *Ann N Y Acad Sci* **877**, 129-139
- Meza, G. (1984) Some characteristics of glutamic acid decarboxylase of chick ampullary cristae. *J. 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, Solano-Flores LP, Poblano A. (1992) Recovery of vestibular function in young guinea pigs after streptomycin treatment. Glutamate decarboxylase activity and nystagmus response assessment. *Int.J. Dev. Neurosci.* **10**, 407-411.
- Meza G, Acuna D, Gutierrez A, Merchan JM, Rueda J (1994) Development of vestibular function: biochemical, morphological and electronystagmographical assessment in the rat. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **14**, 512-522.
- Mountcastle, V.P. (1981) *Medical Physiology*. C.V. Mosby, St Louis Toronto, London.
- Nakagawa, T., Kakehata, S., Yamamoto, T., Akaike, N., Komune, S. y Uemura, T. (1994) Ionic properties of $I_{K,n}$ in outer hair cells of guinea pig cochlea. *Brain Res.* **661**, 293-297.
- Nakagawa T, Ozawa T, Watanabe T, Minami M, Satoh M. (1999) Sensitization of the adenylyl cyclase system in cloned kappa-opioid receptor-transfected cells following sustained agonist treatment: A chimeric study using G protein alpha(i)2/alpha(q) subunits. *Jpn. J. Pharmacol.* **81**, 353-361.
- Nakanishi, S., Inoue, A., Kito, T., Nakamura, M., Chang, A.C., Cohen, S.U. y Numa, S. (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* **278**, 423-427.

- Neher, E. y Sakmann, B. (1976) Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* **260**, 799-802.
- Neher, E., Sakman, B. y Sigworth, F.J. (1981) Improved patch clamp technique for high resolution current recording from cell and cell free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**, 85-100.
- Neher, E y Sakmann, B. (1983) *Single channel recording*. Plenum Press.
- Ninkowic, M., Hunt, S.P., Emson, P. y Iversen, L.L. (1981) The distribution of multiple opiate receptors in bovine brain. *Brain Res.* **214**, 163-167.
- Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S. y Numa, S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* **295**, 202-206.
- Nomina Anatomica (1989). Churchill Livingstone, New York.
- Norris, C.H., Ricci, A.J., Housley, G.D. y Guth, P.S. (1992) The inactivating potassium currents of hair cells isolated from the crista ampullaris of the frog. *J. Neurophysiol.* **68**, 1642-1653.
- 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.
- Ohmori, H. (1984) Studies of ionic currents in the isolated vestibular hair cell of the chick. *J. Physiol.* **350**, 561-581.
- Ohmori, H. (1985) Mechano electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick. *J. Physiol.* **359**, 189-217.
- Ohmori, H. (1988) Mechanical stimulation and fura-2 fluorescence in the hair bundle of dissociated hair cells of the chick. *J. Physiol.* **399**, 115-137.
- Ohmori, H. (1989) Mechano electrical transduction of the hair cell. *Japanese J. Physiol.* **39**, 643-657.
- Ottolia, M., Platano, D., Qin, N., Noceti, F., Birnabaumer, M. Toro, L., Birnabaumer, L., Stefani, E. y Olcese, R. (1998) Functional coupling between human E-type Ca^{2+} channels and mu opioid receptor expressed in *Xenopus laevis*. *FEBS Lett.* **427**, 96-102.

- Padros, M.R., Vindrola, O., Zunszain, P., Fainboin, L., Finkielman, S. y Nahmod, V.E. (1989) Mitogenic activation of human lymphocytes induce the release of proenkephalin derived peptides. *Life Sci.* **45**, 1805-1811.
- Pan, Z.Z. (1998) μ -opposing actions of the κ -opioid receptor. *TIPS* **19**, 94-98.
- Panzanelli, P., Valli, P., Cantino, D. y Fasolo, A. (1994) Glutamate and carnosine in the vestibular system of the frog. *Brain Res.* **662**, 293-296.
- Pasternak, G.W. (1982) High and low affinity opioid binding sites relationship to mu and delta receptors. *Life Sci.* **31**, 1303-1306.
- Pasternak, G.W. y Wood, P.J. (1986) Multiple opiate receptors. *Life Sci.* **38**, 1889-1898.
- Paterson, S. J., Robson, L.E. y Kosterlitz, H.W. (1983) Classification of opioid receptors. *Br. Med Bull.* **39**, 36-1.
- Perachio, A.A. y Kevetter, G.A. (1989) Identification of vestibular efferent neurons in gerbil: histochemical and retrograde labelling. *Exp. Brain Res.* **78**, 315-326.
- Pérez, M.E., Soto, E. y Vega, R. (1991) Streptomycin blocks the postsynaptic effects of excitatory amino acids on the vestibular system primary afferents. *Brain Res.* **563**, 221-226.
- Perin P., Athas G.B., García M.M., Masetto S., Valli P., Holt J.C. y Guth P.S. (1998) Voltage-operated calcium channel expression by frog vestibular hair cells. *21th ARO Midwinter Research Meeting*, Abst. 577
- Perin, P., Soto, E., Botta, L., Masetto, S., Zucca, G., Vega, R. y Valli, P. (2000) Calcium channels functional roles in the frog semicircular canal. *NeuroReport* **11**, 417-420
- Pert, C., Aposhian, D. y Snyder, S. (1974) Phylogenetic distribution of opiate receptor binding. *Brain Res.* **75**, 356-361.
- Pert, K.A. y Snyder, S.H. (1973) Opiate receptor demonstration in nervous tissue. *Science* **179**, 1011-1014.
- Pert, K.A., Kuhar, M.J. y Snyder, S.H. (1975) Autoradiographic localization of the opiate receptor in the rat brain. *Life Sci.* **16**, 1849-1954.
- Peset, J.L. Terapéutica y farmacología en el romanticismo. En *Historia Universal de la medicina*. Lain-Entralgo (ed). Salvat, Barcelona pp. 331-332, 1973.
- Pickles, J.O. (1991) *An introduction to the physiology of hearing*. Academic Press, London.

Pickles, J.O., Brix, J., Comis, S.D., Gleich, O., Köppl, C., Manley, G.A. y Osborne, M.P. (1989) The organization of tip links and stereocilia on hair cells of bird and lizard basilar papillae. *Hearing Res.* **41**, 31-42.

Pickles, J.O., Comis, S.D. y Osborne, M.P. (1984) Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hearing Res.* **15**, 103-112.

Pickles, O. P. y Corey, P. D. (1992) Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Trends Neurosci.* **15**, 254-259.

Pickel, V. M. y Colago, E. E. (1999) Presence of mu-opioid receptors in targets of efferent projections from the central nucleus of the amygdala to the nucleus of the solitary tract. *Synapse* **33**(2):141-52.

Piepponen, T. P., Honkanen, A., Kivastik, T., Zharkovsky, A., Turtia, A., Mikkola, J. A. y Ahtee, L. (1999) Involvement of opioid mu₁-receptors in opioid-induced acceleration of striatal and limbic dopaminergic transmission. *Pharmacol Biochem Behav* **63**(2):245-52.

Portoghese, P.S., Sultana, M. y Takemori, A.E. (1992) Naltrindole, a highly selective and potent non-peptide delta opioid receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **146**, 185-186.

Prigioni, I., Massetto, S., Russo, G. y Taglietti, V. (1992) Calcium currents in solitary hair cells isolated from frog crista ampullaris. *J. Vestibular Res.* **2**, 31-39.

Prigioni, I., Russo, G., Valli, P. y Masetto, S. (1990) Pre- and postsynaptic excitatory action of glutamate agonists on the frog vestibular receptors. *Hearing Res.* **46**, 253-260.

Przewlocki, R., Parsons, K. L., Sweeney, D. D., Trotter, C., Netzeband, J. G., Siggins, G. R. y Gruol, D. L. (1999) Opioid enhancement of calcium oscillations and burst events involving NMDA receptors and L-type calcium channels in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **19**, 9705-9715.

Puel, J.L., Ladrech, S., Chabert, R., Pujol, R. y Eybalin M. (1995) Electrophysiological evidence for the presence of NMDA receptors in the guinea pig cochlea. *Hearing Res.* **51**, 255-264.

Rae, J., Cooper, K., Gates, P. y Watsky, M. (1991) Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J. Neurosci. Meth.* **37**, 15-26.

Ramanathan, K., Michael, T.H., y Fuchs, P.A., (2000) Beta subunits modulate alternatively spliced, large conductance, calcium-activated potassium channels of avian hair cells. *J Neurosci* **20**, 1675-84

Rawls, S. M., McGinty, J. F. y Terrian, D. M. (1999) Presynaptic kappa-opioid and muscarinic receptors inhibit the calcium-dependent component of evoked glutamate release from striatal synaptosomes. *J Neurochem* **73**, 1058-65.

- Rennie, K.J. y Ashmore, J.F. (1991) Ionic currents in isolated vestibular hair cells from the guinea pig crista ampullaris. *Hearing Res.* **51**, 279-292.
- Rennie, K.J., Ricci, A.J. y Correia, M.J (1996) Electrical filtering in gerbil isolated type I semicircular canal hair cells. *J. Neurophysiol.* **75**, 2117-2123.
- Ricci, A.J., ErosteGUI, C., Bobbin, R.P. y Norris, C.H. (1994) Comparative electrophysiological properties of guinea pig (*Cavia cobaya*) outer hair cells and frog (*Rana pipiens*) semicircular canal hair cells. *Comp. Biochem. Physiol.* **107A**, 13-21.
- Ricci, A.J. y Fettiplace, R. (1998) Calcium permeation of the turtle hair cell mechanotransducer channel and its relation to the composition of endolymph. *J. Physiol.* **506**, 159-173.
- Ricci, A.J., Wu, Y.C. y Fettiplace, R. (1998) The endogenous calcium buffer and the time course of transducer adaptation in auditory hair cells. *J. Neurosci.* **18**, 8261-8277.
- Richter, K., Egger, R., Negri, L., Corsi, R., Serrverini, C. y Krreil, G. (1990) cDNAs encoding (d-Ala²) deltorphin precursor from skin of *Phyllomedusa bicolor* also contain genetic information for three dermorphin related opioid peptides. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4836-4839.
- Roberts, W.M. (1993) Spatial calcium buffering in saccular hair cells. *Nature* **363**, 74-76.
- Roberts, W.M. (1994) Localization of calcium signals by a mobile calcium buffer in frog saccular hair cells. *J. Neurosci.* **14**, 3246-3262.
- Roberts, W.M., Jacobs, R.A. y Hudspeth, A.J. (1990) Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J. Neurosci.* **10**, 3664-3684.
- Roberts, B.L. y Ryan, K.P. (1971) The fine structure of the lateral sense organs of dogfish. *Proc. R. Soc. London* **179**, 157-169.
- Roberts, B.L. Russell, I. J. (1972) The activity of lateral-line efferent neurones in stationary and swimming dogfish. *J. Exp. Biol.* **57**, 435-448.
- Rosete, M. (1999) *Proencefalina en la piel del Ambystoma tigrinum: expresión, procesamiento postraduccionaL y efecto del estrés por inmovilización*. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Puebla.
- 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) Postsynaptic potentials recorded from afferent nerve fibers of the posterior semicircular canal in the frog. *Brain Res.* **135**, 67-75.

Rothlin, C.V., Katz, E., Verbitsky y Elgoyhen, A.B. (1999) The α -9 nicotinic acetylcholine receptor shares pharmacological properties with type A γ -Aminobutyric acid, glycine, y type 3 serotonin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **55**, 248-254.

Rüsch, A. y Eatock, A. (1996a) Voltage responses of mouse utricular hair cells to injected currents. *Annals N Y Acad. Sci.* **781**, 71-84.

Rüsch, A. y Eatock, A. (1996b) A delayed conductance in type I hair cells of the mouse utricle. *J. Neurophysiol.* **76**, 995-1004.

Rüsch, A., Lysakowski, A., y Eatock, R. A. (1998) Postnatal development of type I and Type II hair cells in the mouse utricle: acquisition of voltage-gated conductances and differentiated morphology. *J. Neurosci.* **15**, 7487-7501.

Russell, I. J. (1971) Role of the lateral-line efferents system in *Xenopus laevis*. *J. Exp. Biol.* **54**, 621-641.

Russo, G., Marcotti, W. y Prigioni, I. (1996) Inactivation of delayed rectifier K^+ current in semicircular canal hair cells. *NeuroReport* **13**, 2143-2146.

Safieddine, S. y Eybalin, M. (1992) Triple immunofluorescence evidence for the coexistence of acetylcholine, enkephalins and calcitonin gene-related peptide within efferent (olivocochlear) neurons of rats and guinea pigs. *European J. Neurosci.* **4**, 981-992.

Sahley, T. L y Nodar, R. H. (1994) Improvement in auditory function following pentazocine suggests a role for dynorphins in auditory sensitivity. *Ear. Hear.* **15**, 422-431.

Saravia, F.A., Ase, A., Aloys, R., Kleid, M.C., Ines, M., Vida, R., Nahmod, V.E. y Vindrola, O. (1993) Differential post-translational processing of proenkephalin in rat bone marrow and spleen mononuclear cells: evidence for synenkephalin cleavage. *Endocrinology* **132**, 1431-1437.

Saravia, F., Padros, M.R., Ase, A., Aloyz, R., Duran, S. y Vindrola, O. (1998) Differential response to a stress stimulus of proenkephalin peptide content in immune cells of naive and chronically stressed rats. *Neuropeptides* **32**, 351-359.

Sauer, G., Richter, C.P. y Klinke, R. (1999) Sodium, potassium, chloride and calcium concentrations measured in pigeon perilymph and endolymph. *Hearing Res.* **129**, 1-6.

Sbrenna, S., Marti, M., Morari, M., Calo, G., Guerrini, R., Beani, L. y Bianchi, C. (1999) L-glutamate and gamma-aminobutyric acid efflux from rat cerebrocortical synaptosomes: modulation by kappa- and mu- but not delta- and opioid receptor like-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **291**, 1365-1371.

Scarfone E, Dememes D. y Sans A. (1991) Synapsin I and Synaptophysin expression during ontogenesis of the mouse peripheral vestibular system. *J Neurosci* **11**, 1173-1181.

- Scholtz, A. W. y Schrott-Frischer, K.A. (1998) Immunohistochemical investigation of enkephalins in the human inner ear. *Hearing Res.* **118**, 123-128.
- Sewell, W.F. (1990) Synaptic potentials in afferent fibers innervating hair cells of the lateral line organ in *Xenopus laevis*. *Hearing Res.* **44**, 71-81.
- Sewell, W.F. y Starr, P.A. (1991) Effects of calcitonin gene related peptide and efferent nerve stimulation on afferent transmission in the lateral line organ. *J. Neurophysiol.* **65**, 1158-1169.
- Sewell, W.F. (1996) Neurotransmitters and synaptic transmission. En *The cochlea*. Dallos, P., Popper, A.N. y Fay, R.R. (eds.) Springer Handbook of Auditory Research: vol 8. Springer Verlag, New York, 501-533.
- Shaw, J.S., Miller, L., Turnbull, M.J., Gormley, J.J. y Morley, J.S. (1982) Selective antagonist of opiate delta-receptor. *Life Sci.* **31**, 1259-1262.
- Shigemoto, T. y Ohmori, H. (1990) Muscarinic agonists and ATP increase the intracellular Ca^{2+} concentration in chick cochlear hair cells. *J. Physiol.* **420**, 127-148.
- Siegel, J.H. y Relkin, E.M. (1987) Antagonistic effects off perilymphatic calcium and magnesium on the activity of single afferent neurons. **28**, 131-147.
- Simmons, P.J. (1999) The Performance of Synapses That Convey Discrete Graded potentials in an Insect Visual Pathway. *J. Neurosci.* **19**, 10584-10594.
- Simon, J., Szucs, M., Benyhe, S., Borsodi, A., Zeman, P. y Wollemann, M. (1984) Solubilization and characterization of opioid binding sites from frog (*Rana esculenta*) brain. *J. Neurochem.* **43**, 957-963.
- Simon, J., Benyhe, S., Borsodi, A., Szucs, M. y Wollemann, M. (1985) Separation of kappa-opioid receptor subtype from frog brain. *FEBS Lett.* **183**, 395-397.
- Simon, E.J. y Hiller, J.M. (1989) Opioid peptides and opioid receptors. En *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects* 4th ed. Eds. G.J Siegel y cols. Raven Press, New York. 271-285.
- 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. (1988) *Farmacología de aminoácidos excitadores en el oído interno*, Tesis de Doctorado. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- Soto, E. (1995) Características y papel funcional de corrientes iónicas en células sensoriales del oído interno. Symposium "Receptores Sensoriales", *XXXVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Resúmenes* S19.

Soto, E., Cebada, J. y Vega, R. (1998) Ionic currents in isolated neurons from the axolotl (*Ambystoma tigrinum*) Scarpas' ganglion. *XX Annual Meeting of the Association for Research in Otolaryngology*.

Soto, E., Chávez, H., Valli, P., Benvenuti, C. y Vega, R. (2001) Betahistine produces post-synaptic inhibition of the excitability of the primary afferent neurons in the vestibular endorgans. *Acta Otolaryngol.* **121**, 1-6.

Soto, E., Echague, J.V. y Vega, R. (1989) Computer program for statistical non-parametric Mann Whitney U test of neuronal spike activity. *Comput. Meth. Progs. Biomedicine.* **28**, 197-200.

Soto, E., Flores, A. y Vega, R. (1994) NMDA mediated potentiation of inner ear afferent synapse. *Neuroreport* **5**, 1963-1965.

Soto, E., Flores, A., Erostequi, C. y Vega, R. (1993) Evidence for NMDA receptor in the afferent synaptic transmission of the vestibular system. *Brain Res.* **633**, 289-196.

Soto, E., Guevara, J., Andrade, J. y Cruz, R. (1994) Ultraestructura e inervación del oído interno en el axolotl (*Ambystoma tigrinum*), *Segundo Congreso Mexicano de Microscopía Electrónica. Resúmenes* SSB14.

Soto, E., Manjarrez, E. y Vega, R. (1997) A microcomputer based expert system for neuronal spike train data analysis. *Int. J. Med. Informatics* **44**, 203-212.

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. y Vega, R. (1988) Actions of excitatory aminoacid agonists and antagonists on the primary afferents of the vestibular system of the ajolote (*Ambystoma tigrinum*). *Brain Res.* **462**, 104-111.

Soto, E., Budelli, R. y Vega, R. (2001) The vestibular hair cell receptor potential: a theoretical analysis. *Hearing Research*. Enviado a consideración editorial.

Steinacker, A. y Rojas, L. (1988) Acetylcholine modulated potassium channel in the hair cell of the toadfish saccule. *Hearing Res.* **35**, 265-270.

Steinacker, A., Monterrubio, J., Perez, R., Mensinger, A.F. y Marin, A. (1997) Electrophysiology and pharmacology of outward potassium currents in semicircular canal hair cells of toadfish, *Opsanus tau*. *Hearing Res.* **109**, 11-20.

Strutz, J., Bielenberg, K. y Spatz, W.B. (1982) Location of efferent neurons to the labyrinth of the green tree frog (*Hyla Cinerea*). *Arch. Otolaryngol.* **234**, 245-251.

Su Z.L., Jiang S.C., Gu R. y Yang W.P. (1995) Two types of calcium channels in bullfrog saccular hair cells. *Hearing Res.* **87**, 62-68.

- Sugai, T. Sugitani, M. y Ooyama, H. (1991) Effects of activation of the divergent efferent fibers on the spontaneous activity of vestibular afferent fibers in the toad. *Japanese. J. Physiol.* **41**, 217-232.
- Terenius, L. (1973) Stereospecific interaction between narcotic analgesic and synaptic plasma membrane fraction on rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **32**, 317-320.
- Tucker, T.R. y Fettiplace, R. (1996) Monitoring calcium in turtle hair cells with a calcium activated potassium channel. *J. Physiol.* **494**, 613-626.
- Tsien, R.W. (1987) Calcium currents in heart cells and neurons. En *Neuromodulation*. L.K., Kaczmarek y I.B., Levitan. Oxford University Press. New York. pp 206-242.
- Twitchell, W.A. y Rane, S. G. (1993) Opioid peptide modulation of Ca^{2+} -dependent K^+ and voltage-activated Ca^{2+} currents in bovine adrenal chromaffin cells. *Neuron* **10**, 701-709.
- Usami, S., Hozawa, J., Masayuki, T., Igarashi, M., Thompson, G.C., Wu, J. y Wenthold, R.J. (1989) Immunocytochemical study of the GABA system in chicken vestibular endorgans and the vestibular ganglion. *Brain Res.*, **503**, 214-218.
- Usami, S., Matsubara, A., Fujita, S, Shinkawa, H. y Hayashi, M. (1999) NMDA (NMDAR1) and AMPA-type (GluR2/3) receptor subunits are expressed in the inner ear. *J. Pharmacol. Exp Ther.* **289**, 312-20
- Van Bockstaele, E. J., Saunders, A., Commons, K. G., Liu, X. B. y Peoples, J. (2000) Evidence for coexistence of enkephalin and glutamate in axon terminals and cellular sites for functional interactions of their receptors in the rat locus coeruleus. *J. Comp. Neurol.* **417**, 103-14.
- Valli, P. y Zucca, G. (1976) The origin of slow potentials in semicircular canals of the frog. *Acta Otolaringol.* **81**, 395-405.
- 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.
- Vechiola, A. Collyer, P., Figueroa, R., Labarca, R. Bustos, G. y Magendzo, K. (1999) Differential regulation of mu-opioid receptor mRNA in the nucleus accumbens shell and core accompanying amphetamine behavioral sensitization. *Molecular Brain Res.* **21**. 1-9.
- Vega, R. (1987) Transmisión sináptica aferente en el sistema vestibular del ajolote (*Ambystoma tigrinum*). tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Fisiológicas. Instituto de Ciencias UAP.
- 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.

Vega, R., Soto, E. y Pérez, M.T. (1990) Magnesium potentiates quisqualate effects on the vestibular system afferents. *Neurochemistry International* **16 suppl 1**, 72.

Vindrola, O., Asai, M., Zubieta, M., Talavera, E., Rodríguez, E. y Linares, G. (1984) Pentylentetrazol kindling produces a long-lasting elevation of IR-met-enkephalin but not IR-met-enkephalin in rat brain. *Brain Res.* **297**, 121-125.

Vindrola, O., Chervin, A., Vitale, M., Mella, N.A., Aloyz, R. y Basso, A. (1998) Elevated proenkephalin-derived peptide levels in ACTH-producing adenomas. *Endocrine* **8**, 231-240.

Wackym, P.A., Popper, P. y Micevych, P.E. (1993) Distribution of calcitonin gene-related peptide mRNA and immunoreactivity in the rat central and peripheral vestibular system. *Acta Otolaryngol.* **113**, 601-608.

Warr, W.B. (1975) Olivocochlear and vestibular efferent neurons of the feline brain stem: their localization, morphology and number determined by retrograde axonal transport and acetylcholinesterase histochemistry. *J. Comp. Neurol.* **161**, 159-182.

Waud, D.R. (1968) On diffusion from a point source. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **159**, 123-128.

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, **6**, 123-170.

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.

Webster, B.D., Fay, R.R. y Popper, N.A. (1992): *The evolutionary biology of hearing*. Eds. Webster, B.D., Fay, R.R. and Popper, N.A. Springer-Verlag, 1992. Chapter 12. N.Y. Inc.

Wiley, J.W., Moises, H. C., Gross, R.A. y MacDonald, R.L. (1997) Dynorphin A-mediated reduction in multiple calcium current involves a G(o) alpha-subtypes G protein in rat primary afferent neurons. *J. Neurophysiol.* **77**, 1338-1348.

Yamada, W.M., Koch, C. Y Adams, P.R. (1989) Multiple channels and calcium dynamics. En *Methods in neuronal modelling*. Koch, C y Segev, I. (Eds.). MIT press, Cambridge, MA. 97-133.

Yamaguchi, K. y Ohmori, H. (1990) Voltage gated and chemically gated ionic channels in the cultured cochlear ganglion neurone of the chick. *J. Physiol.* **420**, 185-206.

Yamoah, E.N., Lumpkin, E.A., Dumont, R.A., Smith, P.J. y Hudspeth, A.J. (1998) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase extrudes Ca²⁺ from hair cell stereocilia. *J. Neurosci.* **18**, 610-624.

Yilmaz, B., Gilmore, D. P. (1999) Effects of mu, kappa, and delta opioid receptor agonists and antagonists on rat hypothalamic noradrenergic neurotransmission. *Brain Res. Bull.* **48**, 491-495.

- Ylikoski, J., Päivärinta, H., Eränkö, L. Mrena, I. y Lehtosalo, J. (1984) Is substance P the neurotransmitter in the vestibular end organs ?. *Acta Otolaryngol.* **97**, 523-528.
- You, Z. B., Herrera-Marschitz, M. y Terenius, L. (1999) Modulation of neurotransmitter release in the basal ganglia of the rat brain by dynorphin peptides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 1307-15.
- Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L. y Kastin, A. J. (1997) A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* **386**, 499-502.
- Zhang, M., Sun, Q.L., Wan, Y., Yao, L., Yu, Y.X. y Han, J.S. (1998) OFQ reverses the kappa-opioid receptor mediated depression of calcium current in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroreport* **22**, 2095-2098.
- Zamir, N., Palkovits, M., Weber, E. y Browns, S. M. (1984) A dynorphinergic pathway or leu-enkephalin production in the central substantia nigra. *Nature* **307**, 643-645.
- Zidanic, M. y Fuchs, P.A. (1995) Kinetic analysis of barium currents in chick cochlear hair cells. *Biophys. J.* **68**, 1323-1336.
- Zitlau, E.K., Bartels, M. y Munz, H. (1988). Representation of Octovalateralis systems in the brainstem of *Ambystoma mexicanum*. Elsner N, Barth FG. (eds) Sense organs. *Interfaces between environment and behaviour*. Thieme, Stuttgart, New York. p. 165.
- Zucca G, Akoev GN, Maracci A, Valli P. (1993) NMDA receptors in frog semicircular canals. *Neuroreport.* **4**, 403-404.
- Zucca G, Botta L, Milesi V, Dagani F, Valli P.(1992) Evidence for L-glutamate release in frog vestibular organs. *Hear Res.* **63**, 52-56.
- Zucca, G., Vega, R., Botta, L., Pérez, M.E., Valli, P. y Soto, E. (1992) Streptomycin blocks the afferent synapse of the isolated semicircular canals of the frog. *Hear. Res.* **59**, 70-74.