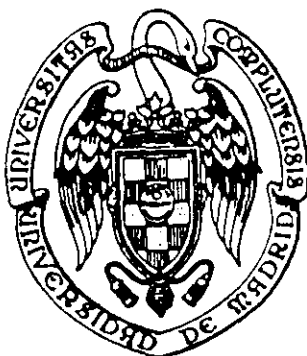


**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**ESTUDIO DE SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS  
EN EL OIDO INTERNO**

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup> ANGELES VICENTE TORRES**

**Madrid, 1998**

**22.735**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Ciencias Químicas**



ARCHIVO

**Estudio de sistemas monoaminérgicos  
en el oído interno**



\* 5 3 0 9 8 4 4 5 7 0 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Memoria realizada para la obtención del  
Grado de Doctor en Ciencias Químicas  
por

**Dña. M<sup>a</sup> Angeles Vicente Torres**

**Madrid, 1998**



FACULTAD DE MEDICINA  
CIUDAD UNIVERSITARIA  
28040 MADRID

UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE DE MADRID

HOSPITAL CLINICO DE SAN CARLOS  
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA II  
(ESPECIALIDADES QUIRURGICAS)

D. PABLO GIL LOYZAGA, Profesor Titular del Departamento de Cirugia II de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y Director del Centro de Cultivos Celulares, CAI-UCM,

CERTIFICA:

que la memoria de investigación titulada "Estudio de sistemas monoaminérgicos en el oído interno" ha sido realizada bajo mi dirección por Dña. M<sup>a</sup> ANGELES VICENTE TORRES, y que dicha memoria SI REÚNE las características necesarias para su presentación como Tesis Doctoral.

Prof. Dr. Pablo E. Gil-Loyzaga

*A mis padres y  
a Jose Luis Gómez*

## **Agradecimientos**

En el periodo de realización de los trabajos que se presentan en esta Memoria de Tesis Doctoral he compartido vivencias con distintas personas, que han influido decisivamente en mi formación actual, y a las que ahora deseo hacer constar mi agradecimiento.

En primer lugar, al Prof. Dr. Pablo Gil-Loyzaga, Profesor Titular del Departamento de Cirugía II y director del Centro de Cultivos Celulares (CAI-UCM), que es el director del trabajo que se refleja en la presente Memoria. Comencé a trabajar con él cuando terminé mi Licenciatura y él me ha introducido en el mundo científico y universitario. Con él aprendí la morfología y la bioquímica de la cóclea, y sobre todo aprendí que no eran disciplinas independientes, como tiene tendencia a pensar la mente de un químico recién licenciado. Además, el Prof. Gil-Loyzaga me enseñó materias que considero más importantes, como son: plantear un trabajo científico, desarrollarlo, analizarlo, discutirlo y presentarlo al público. Con su ejemplo aprendí a sobrevivir disfrutándolo en esta comunidad científica y universitaria, y a seguir trabajando siempre.

También quiero hacer constar mi agradecimiento a los Profesores: Joaquín Poch, Catedrático de Otorrinolaringología UCM, Jose María Teijón, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UCM y José Castro, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas UCM, por el interés demostrado en el transcurso de esta Tesis.

Con la Profa. Mariví Bartolomé compartí los mejores y los peores momentos de esta trayectoria, manteniendo siempre un tandem que nos permitió resolver innumerables problemas. Ella no perdió la paciencia cuando yo me encerraba en alguna idea preconcebida, y siempre me aportó su punto de vista y supo respetar mi espacio vital.

La Profa. Angeles Ibáñez me explicó desde aspectos tan básicos, pero tan complejos para el profano, como la estructura de un nervio, hasta clases magistrales de genética. Siempre me ayudó en lo que pudo y me tranquilizó cuando las situaciones me sobrepasaban.

Otros compañeros y Profesores del Centro de Cultivos Celulares y de los Departamentos de Cirugía II y de Bioquímica me han acompañado en el desarrollo de este trabajo, aportando cada uno su granito de arena. La Profa. Ana Esquifino me inició en la técnica de la HPLC, cuyas alegrías y los sinsabores he compartido con Agustín Arce, M<sup>a</sup>Eugenia Peña y Manuel García. Francisco Carricondo me ayudó de forma inestimable con la estadística y con los detalles finales de esta Memoria. De Teresa Rodríguez recibí un importante apoyo técnico y humano. Encarna Muñoz perfiló los esquemas presentes en esta Memoria y colaboró en su preparación final. Con Manuel Campos discutí la filosofía de la HPLC aunque creo que no llegué a convencerle. Los "otorrinos" Jesús San Román y Eduardo del Castillo me echaron una mano con el oído humano mientras me mareaban con sus problemas en la preparación de disoluciones. Esther Pascual y M<sup>a</sup> Cruz González me han acompañado y apoyado en el último periodo.

Por último, quiero reflejar el apoyo inestimable recibido de Jose Luis Gómez, de mi familia y de mis amigos. Ellos desde fuera vivieron las idas y venidas de este trabajo, los momentos de desesperación y aquellos en los que sacrifiqué su atención en aras del trabajo.

## **Financiación del trabajo**

Los experimentos incluidos en esta Memoria de Tesis Doctoral han sido parcialmente financiados por Ayudas a la Investigación de la DGICYT (PB91-0361 y 92-00228) y el FISss (92/141 y 95-1540), por el CEE SCIENCE Plan (ERBSCCCT9), por los Laboratorios SERVIER (Courbevoie, France) y por el proyecto Human Capital and Mobility ERBCHRXCT940659 .

## **Abreviaturas**

<b>AAD</b>	Aminoácido aromático decarboxilasa
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AMPA</b>	Acido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
<b>AMPc</b>	AMP cíclico
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>ARNm</b>	Acido ribonucleico mensajero
<b>CAE</b>	Conducto auditivo externo
<b>CCE(s)</b>	Célula(s) ciliada(s) externa(s)
<b>CCI(s)</b>	Célula(s) ciliada(s) interna(s)
<b>CGRP</b>	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
<b>COMT</b>	Catecol-O-metiltransferasa
<b>COS</b>	Complejo olivar superior
<b>DA</b>	Dopamina (3,4-dihidroxifeniletilamina)
<b>DBH</b>	Dopamina- $\beta$ -hidroxilasa
<b>DB SPL</b>	Decibelios de presión sonora
<b>DHPG</b>	3,4-dihidroxifenilglicol
<b>DOMA</b>	Acido 3,4-dihidroxi mandélico
<b>DOPAC</b>	Acido 3,4-dihidroxifenilacético
<b>GABA</b>	Acido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GAD</b>	Decarboxilasa de ácido glutámico
<b>5-HIAA</b>	Acido 5-hidroxiindolacético
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>HPLC-ED</b>	HPLC acoplada a detección electroquímica
<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>HVA</b>	Acido homovanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético)
<b>Hz</b>	Herzios



<b>KHz</b>	Kiloherzios
<b>L-DOPA</b>	L-dihidroxifenilalanina
<b>MAO</b>	Monoamino oxidasa
<b>MHPG</b>	4-hidroxi-3-metoxifenilglicol
<b>NA</b>	Noradrenalina ( $\beta$ -hidroxi-3,4-dihidroxifeniletilamina)
<b>NM</b>	Normetanefrina
<b>OC</b>	Organo de Corti
<b>6-OHDA</b>	6-hidroxidopamina
<b>PAC</b>	Potencial de acción compuesto
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PNMT</b>	Feniletanolamina N-metiltransferasa
<b>SEOL</b>	Sistema eferente olivococlear lateral
<b>SEOM</b>	Sistema eferente olivococlear medial
<b>SEV</b>	Sistema eferente vestibular
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TC</b>	Túnel de Corti
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa
<b>VMA</b>	ácido vanililmandélico (ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico)

# INDICE

<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>I. GENERALIDADES DEL OIDO</b>	2
1. El oído externo	2
2. El oído medio	3
3. El oído interno	4
3.1. El laberinto óseo	4
3.2. El laberinto membranoso	5
3.2.1. La cóclea membranosa	5
3.2.2. El vestíbulo membranoso	6
<b>II. EL RECEPTOR AUDITIVO U ORGANO DE CORTI</b>	9
1. Estructura del órgano de Corti	9
1.1. Células de soporte del órgano de Corti	10
1.2. Células sensoriales del órgano de Corti	11
1.2.1. Células ciliadas internas	11
1.2.2. Células ciliadas externas	12
2. Inervación de la cóclea	14
2.1. Inervación aferente	14
2.1.1. Inervación aferente de tipo I	14
2.1.2. Inervación aferente de tipo II	15
2.2. Inervación eferente	16
2.2.1. Sistema eferente olivococlear lateral	17
2.2.2. Sistema eferente olivococlear medial	17
2.3. Inervación simpática	18
3. Neurotransmisores de la cóclea	19
3.1. Neurotransmisores presentes en las células ciliadas	20
3.2. Neurotransmisores presentes en el sistema eferente olivococlear	21
3.2.1. Acetilcolina	21
3.2.2. Acido $\gamma$ -aminobutírico	22
3.2.3. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina	23
3.2.4. Encefalinas	24
3.2.5. Dinorfinas	25
4. Las monoaminas en la cóclea	25
4.1. Dopamina	25
4.2. Noradrenalina	27

4.3. Serotonina	28
5. Fisiología de la audición	31
5.1. Recorrido de la onda sonora	31
5.2. Activación del receptor auditivo	31
5.3. Activación de las células ciliadas internas	32
5.4. Activación de las neuronas aferentes y la vía auditiva ascendente	33
5.5. Modulación del mensaje auditivo por las neuronas eferentes	33
<b>III. LOS RECEPTORES VESTIBULARES</b>	<b>34</b>
1. Estructura de los receptores vestibulares	34
2. Inervación del vestíbulo	37
2.1. Inervación aferente	37
2.2. Inervación eferente	38
2.3. Inervación simpática	38
3. Neurotransmisores del vestíbulo	39
4. Las monoaminas en el vestíbulo	41
5. Fisiología vestibular	41
<b>IV. LAS MONOAMINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO</b>	<b>42</b>
1. Las catecolaminas en el sistema nervioso	42
1.1. Biosíntesis y secreción	42
1.2. Acción postsináptica	43
1.3. Degradación	45
1.4. Regulación de las neuronas catecolaminérgicas	46
2. La serotonina en el sistema nervioso	50
2.1. Biosíntesis y secreción	50
2.2. Acción postsináptica	50
2.3. Degradación	52
2.4. Regulación de las neuronas serotoninérgicas	52
<b>JUSTIFICACION Y OBJETIVOS</b>	<b>53</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>56</b>
1. Animales	57
2. Tratamiento con piribedil	59
3. Ganglionectomía cervical superior	59
4. Estimulación acústica	60

5. Perfusión intracardiaca	61
6. Recogida y procesado de las muestras	62
7. Determinación bioquímica	63
7.1. Modo cromatográfico de separación	64
7.2. Método de detección	67
7.3. Identificación y cuantificación de los picos cromatográficos	70
8. Análisis estadístico	73
<b>RESULTADOS</b>	<b>75</b>
<b>I. METODO PARA ELIMINAR DE LA COCLEA LA SEROTONINA SANGUINEA MEDIANTE PERFUSION AORTICA</b>	<b>76</b>
1. Efecto de la temperatura de perfusión	76
2. Efecto de la velocidad de perfusión	76
3. Efecto del tiempo de perfusión	76
4. Efecto del clampado de la aorta descendente	77
5. Efecto de la disolución de perfusión	77
<b>II. LAS CATECOLAMINAS EN LA COCLEA</b>	<b>78</b>
1. Efecto de la estimulación acústica sobre el metabolismo de las catecolaminas en la cóclea.	78
1.1 Efecto de la estimulación acústica sobre el metabolismo de la dopamina coclear.	78
1.2 Efecto del pretratamiento con piribedil sobre el metabolismo de la dopamina coclear.	80
1.3 Efecto de la estimulación acústica sobre la concentración de noradrenalina coclear.	82
2. Efecto de la ganglionectomía cervical superior sobre las concentraciones de catecolaminas en la cóclea	84
<b>III. LA SEROTONINA EN LA CÓCLEA</b>	<b>87</b>
<b>IV. LAS MONOAMINAS EN EL VESTÍBULO</b>	<b>90</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>93</b>
<b>I. METODO PARA ELIMINAR DE LA COCLEA LA SEROTONINA SANGUINEA MEDIANTE PERFUSION AORTICA</b>	<b>94</b>
1. Efecto de la temperatura de perfusión	94

2. Efecto de la velocidad de perfusión	94
3. Efecto del tiempo de perfusión y clampado de la aorta descendente	95
4. Efecto de la disolución de perfusión	95
<b>II. LAS CATECOLAMINAS EN LA COCLEA</b>	<b>96</b>
1. Efecto de la estimulación acústica sobre el metabolismo de las catecolaminas en la cóclea	96
2. Efecto de la ganglionectomía cervical superior sobre las concentraciones de catecolaminas en la cóclea	100
<b>III. LA SEROTONINA EN LA COCLEA</b>	<b>102</b>
1. Presencia de serotonina en distintos compartimentos cocleares	102
2. Efecto de la estimulación acústica sobre el metabolismo de la serotonina en la cóclea	103
<b>IV. LAS MONOAMINAS EN EL VESTIBULO</b>	<b>104</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>106</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO: Publicaciones</b>	

# **INTRODUCCION**

## I. GENERALIDADES DEL OIDO

El oído interno de los distintos mamíferos tiene muchas similitudes, y concretamente el de la rata y el del humano son muy parecidos, salvo en el tamaño. El objetivo de la presente Memoria de Tesis Doctoral es el mejor conocimiento del sistema auditivo humano, pero evidentemente este trabajo se ha realizado en un modelo animal, que ha sido en este caso la rata.

En el oído se distinguen tres regiones anatómicas: el oído externo, el oído medio y el oído interno. En el oído interno se ubican dos receptores sensoriales que son morfológica y funcionalmente distintos: el receptor auditivo o cóclea, en la región anterior, y el receptor del equilibrio o vestíbulo, en la región posterior. La neuroquímica monoaminérgica de ambos receptores será objeto de estudio en la presente Memoria de Tesis Doctoral.

### 1. EL OIDO EXTERNO

En este apartado seremos muy someros, al no afectar esta parte *significativamente a esta Memoria, aunque algo influye en la interpretación funcional.*

El oído externo está constituido por el pabellón auditivo y el conducto auditivo externo (CAE) (Fig. 1). El pabellón auditivo es una estructura cartilaginosa recubierta de piel. El CAE es un canal tubular que conecta el medio externo con el oído medio, del que se encuentra separado por la membrana timpánica. Su porción más externa es cartilaginosa y posee folículos pilosos y glándulas sebáceas y ceruminosas, mientras que la pared del tercio interno es ósea (Rouvière y Delmas, 1987; Moore, 1993; Kahle, 1995).

El oído externo desarrolla un papel fundamental como protector de la membrana timpánica y las estructuras del oído medio frente a las agresiones del medio externo. Además el pabellón auditivo está implicado en la localización del

sonido. Esta función se encuentra acentuada en los mamíferos como la rata, cuya audición se amplía hacia las frecuencias agudas, que están provistos de un pabellón móvil. Esta función se ha perdido progresivamente en los humanos. El oído externo tiene también un papel de amplificación selectiva de las frecuencias comprendidas entre 1,5 y 7 KHz (Uziel, 1985a).

## 2. EL OIDO MEDIO

El oído medio está constituido por una cavidad aérea, denominada caja del tímpano, situada en el interior del hueso temporal. Esta cavidad comunica con la faringe mediante la trompa de Eustaquio (Fig. 1), equilibrándose así la presión en el interior de la caja del tímpano con la presión atmosférica (Rouvière y Delmas, 1987; MacKinnon y Morris, 1993; Moore, 1993; Kahle, 1995). Hacia atrás se comunica con las celdas mastoideas. Esta cavidad se encuentra muy desarrollada en los mamíferos no primates formando la bulla mastoidea, que es muy prominente en roedores y lagomorfos.

La caja del tímpano se encuentra atravesada por un sistema de huesecillos articulados denominados: martillo, yunque y estribo, que se anclan a las paredes de la caja timpánica mediante ligamentos y músculos. El martillo, se ancla a través de su mango en la membrana del tímpano y por su lado interno se articula con el yunque. El yunque, a su vez, se articula por su lado interno con el estribo, el cual termina en una lámina aplanada (platina) que sella el orificio de la ventana oval del oído interno (Rouvière y Delmas, 1987; MacKinnon y Morris, 1993; Moore, 1993; Kahle, 1995) (Fig. 1).

El oído medio tiene tres funciones. En primer lugar permite la transmisión de las ondas acústicas al oído interno transformándolas en vibraciones mecánicas. La vía fundamental de transmisión del sonido desde el oído externo al interno es a través de la cadena de huesecillos del oído medio. Otras dos vías alternativas menos importantes en la fisiología normal, pero muy importantes en las patologías que



afectan al oído medio, son: el medio aéreo de la caja del tímpano y la conducción ósea. En segundo lugar, el oído medio actúa como un adaptador de impedancias entre el medio aéreo y el medio líquido del oído interno. Su existencia evita la pérdida de una parte importante de la energía acústica que alcanza el oído. En tercer lugar limita la energía que entra en el oído interno gracias al reflejo estapedial, que supone la contracción muscular y el bloqueo de la transmisión sonora en presencia de sonidos de alta intensidad (Uziel, 1985a).

### **3. EL OIDO INTERNO**

El oído interno se encuentra en el seno del peñasco del hueso temporal, limitado por una cápsula ósea (laberinto óseo) que forma en su interior un conjunto de cavidades. Dentro del laberinto óseo se encuentra un sistema de vesículas interconectadas y canales limitados por membranas (laberinto membranoso), donde asientan los receptores auditivo y vestibular (Fig. 1).

El espacio entre el laberinto óseo y el membranoso contiene un líquido denominado perilinfa de composición semejante a los líquidos extracelulares, es decir rico en sodio y pobre en potasio. Por el contrario, en el interior del laberinto membranoso se encuentra un líquido, denominado endolinfa, de características similares a los líquidos intracelulares, es decir, rico en potasio y pobre en sodio (Salt y Konishi, 1986).

#### **3.1. EL LABERINTO OSEO**

En el laberinto óseo se distinguen tres espacios cavitarios: la cóclea o caracol óseo, el vestíbulo óseo y los tres conductos semicirculares (Fig. 2).

La cóclea es un tubo óseo arrollado en espiral alrededor de un hueso cónico denominado modiollo, que se localiza en la zona anterior del oído interno. En su zona interna, el modiollo está horadado y aloja las fibras del nervio auditivo y los vasos sanguíneos que irrigan la cóclea. El modiollo presenta, en su zona externa,

una cresta espiral denominada lámina espiral ósea, bajo la cual se encuentra un canal espiral o de Rosenthal que aloja al ganglio auditivo o de Corti. La lámina espiral ósea divide el conducto óseo coclear en dos mitades, y continúa hacia el vestíbulo óseo (Rouvière y Delmas, 1987; Moore, 1993).

El vestíbulo óseo constituye la cavidad central, que comunica con el oído medio mediante las ventanas oval y redonda, selladas por las membranas oval y redonda respectivamente. En su pared se localizan los orificios de salida de los nervios auditivo y vestibular y los orificios del acueducto del vestíbulo y el acueducto del caracol, que son conductos óseos estrechos que comunican con la cavidad craneal (Rouvière y Delmas, 1987; Moore, 1993) (Fig. 2).

Del área posterior del vestíbulo parten los tres conductos semicirculares. Son perpendiculares entre sí y debido a su orientación en el espacio se denominan superior, posterior y externo u horizontal. Uno de sus extremos es tubular y en los canales superior y posterior se encuentra fusionado. El otro extremo termina en un ensanchamiento denominado ampolla (Rouvière y Delmas, 1987; Moore, 1993) (Fig. 2).

## **3.2. EL LABERINTO MEMBRANOSO**

En el laberinto membranoso se distinguen dos regiones bien diferenciadas en cuanto a su estructura y función: el laberinto anterior o cóclea membranosa y el laberinto posterior o vestíbulo membranoso.

### **3.2.1. LA COCLEA MEMBRANOSA**

La cóclea membranosa es un conducto de sección triangular que tiene una zona arrollada en espiral siguiendo el interior del caracol óseo y una zona lineal en el interior del vestíbulo óseo (gancho coclear). La zona superior de la espiral coclear, de menor diámetro, se denomina ápex y la inferior base coclear (Uziel, 1985b; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993) (Fig. 2).

Dos membranas separan la cóclea ósea de la membranosa (la membrana de Reissner y la membrana basilar) dividiendo el caracol óseo en tres rampas: la rampa superior (vestibular) y la rampa central (media o coclear) se encuentran sobre la lámina espiral ósea y la rampa inferior (timpánica) por debajo de ella. La rampa coclear constituye la cóclea membranosa, que se separa de la rampa vestibular por la membrana de Reissner y de la vestibular por la membrana basilar (Uziel, 1985b; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993). La rampa coclear está anclada, por su zona interna, al modiolo y la lámina espiral ósea, sobre la que se apoya la membrana basilar, y por la externa al laberinto óseo a través del ligamento espiral (Gil-Loyzaga y cols., 1987).

La rampa coclear es un tubo ciego en el ápex coclear, ya que se cierra en una zona denominada helicotrema, en la que se fusionan las rampas vestibular y timpánica. En el gancho coclear por una parte se comunica con el vestíbulo membranoso mediante el *canalis reuniens*, y por otra parte se cierra en el denominado el ciego vestibular. La rampa vestibular se abre al vestíbulo y comunica con el oído medio mediante la membrana oval, sobre la que asienta la platina del estribo. La rampa timpánica, que no comunica con el vestíbulo, está cerrada por la membrana redonda. Desde la rampa timpánica, a través del acueducto del caracol, hay una comunicación perilinfática con el espacio subaracnoideo (Rouvière y Delmas, 1987; MacKinnon y Morris, 1993; Kahle, 1995) (Fig. 2).

Sobre la membrana basilar, hacia el interior de la rampa coclear, asienta el receptor auditivo u órgano de Corti, que será objeto de estudio en el apartado II.

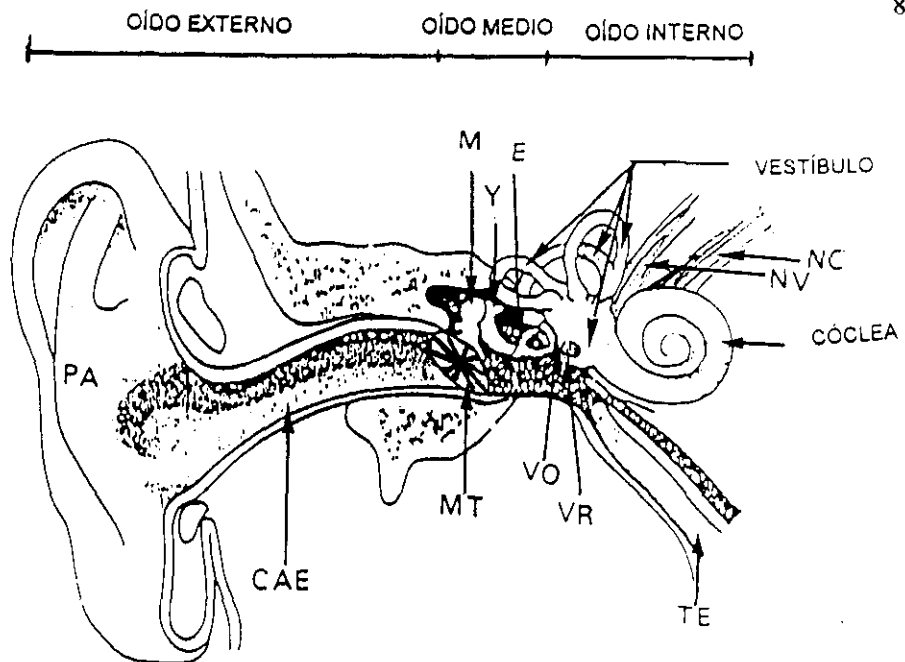
### 3.2.2. EL VESTIBULO MEMBRANOSO

En el interior del vestíbulo óseo se encuentran dos cavidades membranosas, el sáculo y el utrículo, comunicadas entre si por el conducto utrículo-sacular, y con la rampa coclear mediante el *canalis reuniens* de Hensen, que en el adulto suele estar obliterado. En el conducto utrículo-sacular se origina el conducto endolinfático, que

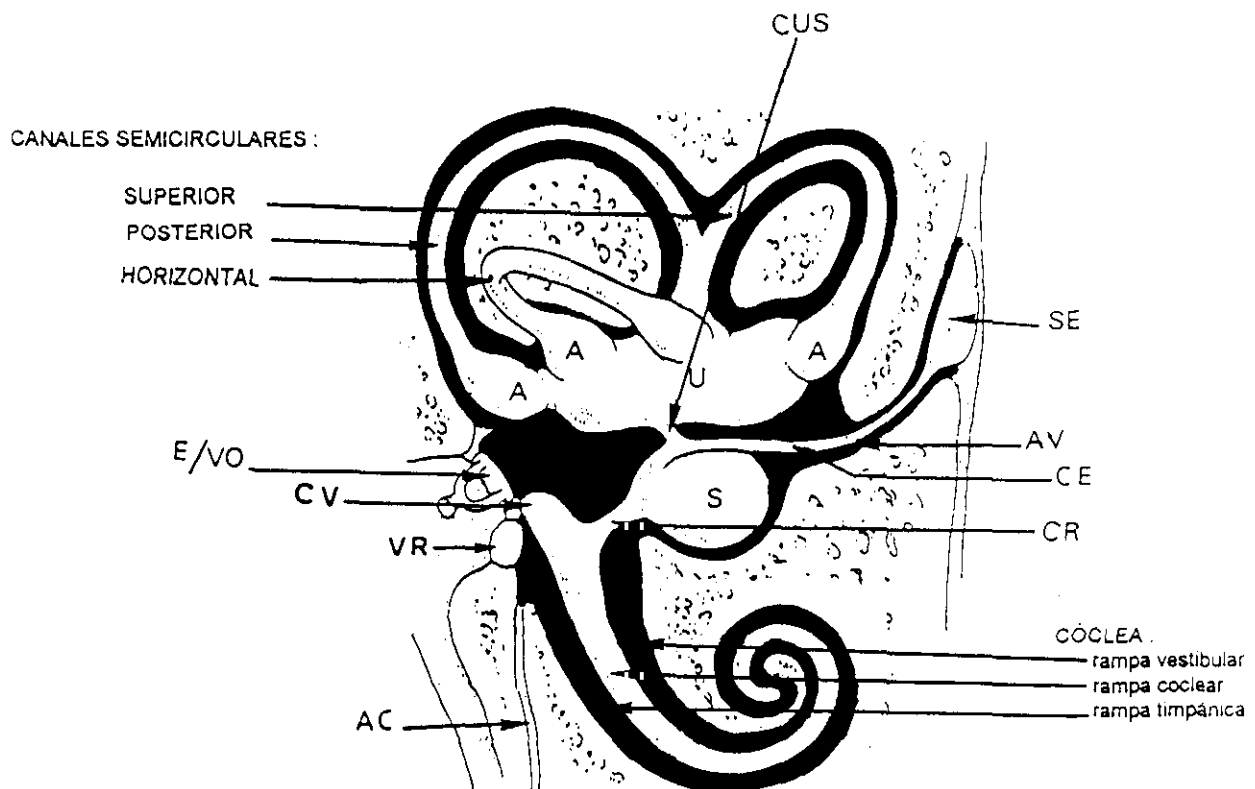
recorre el interior del acueducto del vestíbulo y termina en un saco ciego, denominado saco endolinfático, bajo la duramadre cerebelosa. El saco endolinfático está implicado en la renovación de la endolinfa (Sans y Raymond, 1985; Rouvière y Delmas, 1987; MacKinnon y Morris, 1993; Moore, 1993; Kahle, 1995) (Fig. 2).

En el interior de los conductos semicirculares óseos se encuentran los canales semicirculares membranosos que conectan con el utrículo. Reciben el mismo nombre de los canales óseos que los circundan, y al igual que ellos presentan un ensanchamiento en un extremo denominado ampolla. El otro extremo, también al igual que los canales óseos, se encuentra fusionado en los canales superior y posterior (Sans y Raymond, 1985; Rouvière y Delmas, 1987; MacKinnon y Morris, 1993; Moore, 1993; Kahle, 1995) (Fig. 2).

El utrículo, el sáculo y los canales semicirculares membranosos están fijados al laberinto óseo mediante fibras conjuntivas. Constituyen el vestíbulo membranoso y en su interior se encuentran las estructuras receptoras del equilibrio. Estas estructuras son epitelios sensoriales de dos tipos: las máculas y las crestas ampulares. Se distinguen dos máculas (utricular y sacular) y tres crestas, una en cada ampolla de los canales semicirculares (Sans y Raymond, 1985; Kahle, 1995). La estructura de estos epitelios sensoriales será analizada en el apartado III.



**Figura 1:** Esquema anatómico del oído externo, medio e interno. PA = pabellón auditivo, CAE = conducto auditivo externo, E = estribo, M = martillo, MT = membrana timpánica, NC = nervio coclear, NV = nervio vestibular, TE = trompa de Eustaquio, VO = ventana oval, VR = ventana redonda, Y = yunque.



**Figura 2:** Esquema del laberinto óseo (en negro) y el laberinto membranoso (en el interior del óseo) del oído interno. A = ampolla, AC = acueducto de la cóclea, AV = acueducto del vestíbulo, CE = conducto endolinfático, CR = *canalis reuniens* de Hensen, CV = cíego vestibular, CUS = conducto utriculo-sacular, E/VO = estribo apoyado en la ventana oval, S = sáculo, SE = saco endolinfático, U = utrículo, VR = ventana redonda (modificada de Iurato, 1967).

## II. EL RECEPTOR AUDITIVO U ORGANO DE CORTI

### 1. ESTRUCTURA DEL ORGANO DE CORTI

La rampa coclear, como se indicó en el apartado I, es un conducto de sección triangular que recorre la espiral coclear desde la base hasta el ápex. La base del triángulo está constituida por la membrana basilar que es una membrana fibrosa sobre la que asienta el receptor auditivo. La cara superior del triángulo la forma la membrana de Reissner que separa las rampas coclear y vestibular. Y la cara lateral del triángulo está constituida por un epitelio multiestratificado, denominado *estría vascular*, entre cuyas células circulan gran cantidad de vasos sanguíneos. La *estría vascular* está implicada en el mantenimiento de la homeostasis del receptor auditivo. Es la responsable de la renovación iónica de la endolinfa que llena la rampa coclear (Merchán y Ludeña, 1983; Uziel, 1985b; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993) (Figs. 3 y 4).

Sobre la membrana basilar, en la porción central del conducto, se localiza el receptor auditivo u órgano de Corti (OC) que recorre toda la espiral coclear. A ambos lados del OC se encuentran distintos tipos celulares que mantienen la estructura y la funcionalidad del receptor auditivo. En la región más próxima al modiollo, se encuentra una protuberancia denominada *limbo espiral*, que se continua con un surco denominado *surco espiral interno* (Merchán y Ludeña, 1983; Uziel, 1985b; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993; Kahle, 1995). Al *limbo espiral* se encuentra anclada una membrana acelular constituida fundamentalmente por proteoglicanos (la membrana tectoria), la cual está implicada en el proceso de transducción del mensaje auditivo (Gil-Loyzaga y cols., 1985, 1991; Remezal y Gil-Loyzaga, 1993; Thalmann y cols., 1993; Gil-Loyzaga, 1997; Ibáñez y cols., 1997). La porción lateral de la membrana basilar la ocupan las células de Hensen y las células de Claudius, que constituyen el *surco espiral externo* (Merchán y Ludeña, 1983; Uziel, 1985b; Kahle, 1995) (Fig. 4).

El OC está constituido por células de soporte y por células sensoriales: células ciliadas internas (CCIs) y células ciliadas externas (CCEs).

### **1.1. CELULAS DE SOPORTE DEL ORGANO DE CORTI**

El soporte del OC lo constituyen fundamentalmente: las células de los pilares, las células de soporte internas y las células de Deiters.

Las células de los pilares (Corti, 1851) se encuentran entre las CCIs y las CCEs constituyendo dos hileras paralelas a lo largo de la espiral coclear: los pilares internos y los externos. Estas células tienen un ensanchamiento en la base, en el cual se localiza el núcleo celular, un cuerpo muy estrecho y un segundo ensanchamiento en la región apical o cabeza. La base y la cabeza de los pilares internos y externos están en contacto, y los cuerpos separados dejando entre ellos un espacio de sección triangular denominado túnel de Corti (TC) (Merchán y cols., 1982). Las fibras nerviosas procedentes del modiollo pasan entre los pilares internos y atraviesan el TC por las zonas media y basal para acabar contactando con las CCEs (Merchán y cols., 1982; Uziel, 1985b; Gil-Lozaga y Pujol, 1993; Kahle, 1995) (Fig. 4).

Las células de soporte internas se disponen en una hilera bajo las CCIs. Las CCIs quedan de esta forma cubiertas por su lado más externo por los pilares internos, por su base por las células internas de soporte y por su lado interno por otro tipo de células epiteliales de soporte menos especializadas, las denominadas células marginales internas, que forman el límite entre el órgano de Corti y el surco espiral interno (Merchán y Ludeña, 1983).

Las células de Deiters o falángicas se disponen en tres hileras paralelas bajo los polos basales de las CCEs. Estas células tienen una prolongación que se dirige hacia la superficie del OC donde se expande a modo de sombrilla. Entre las CCEs y las prolongaciones de las células de Deiters quedan espacios, los espacios de Nuel, que comunican con el TC a través de los espacios que existen entre los cuerpos de

los pilares externos (Merchán y Ludeña, 1983; Uziel, 1985b; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993; Kahle, 1995) (Fig. 4).

El TC y los espacios de Nuel están llenos de perilinfa (Salt y Konishi, 1986) procedente de la rampa timpánica, ya que la membrana basilar y las células basales del OC permiten su circulación (Merchán y cols., 1982). Sin embargo, la perilinfa no difunde a la rampa media porque toda la superficie del OC, al igual que el resto de la rampa media, se encuentra sellada por uniones intercelulares de tipo ocluyente (Merchán y cols., 1982), lo cual impide el intercambio libre de iones entre endolinfa y perilinfa.

## **1.2. CELULAS SENSORIALES DEL ORGANO DE CORTI**

### **1.2.1. CELULAS CILIADAS INTERNAS**

Las CCI se sitúan en la región interna del OC, rodeadas por las expansiones de las células de soporte internas. Constituyen una hilera a lo largo de la espiral coclear (Merchán y Ludeña, 1983; Uziel, 1985b; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993; Kahle, 1995) (Fig. 4).

Son células con forma de matraz. El núcleo es medial aunque la mayoría de los orgánulos citoplasmáticos se encuentran en la región basal. En el polo apical presentan estereocilios, cilios sin motilidad autónoma, anclados en una estructura glicoproteica denominada placa cuticular. Los estereocilios de las CCI están alineados en hileras paralelas a la línea espiral coclear y conectados entre sí por puentes glicoproteicos (Evans y cols., 1985; Furness y Hackney, 1986; Remezal y cols., 1993; Gil-Loyzaga, 1997), lo cual permite el movimiento al unísono de todos los cilios de una célula. La longitud de los estereocilios aumenta hacia el lateral de la espira (Uziel, 1985b; Corwin y Warchol, 1991; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

Las CCI son las verdaderas células sensoriales del receptor auditivo, es decir son las células que se estimulan mecánicamente por la onda sonora y traducen el



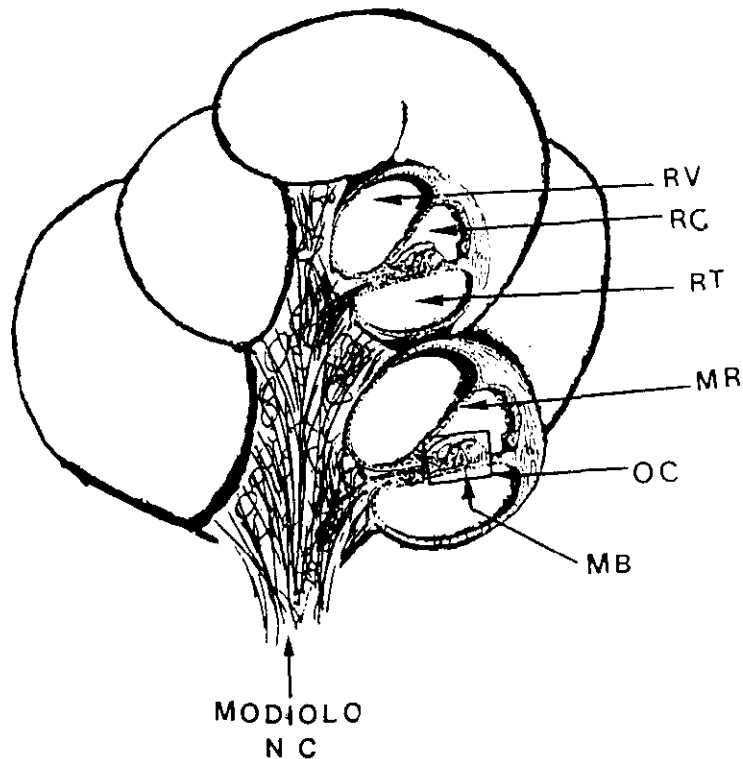
mensaje mecánico en un mensaje bioeléctrico que llega al sistema nervioso central (Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

### **1.2.2. CELULAS CILIADAS EXTERNAS**

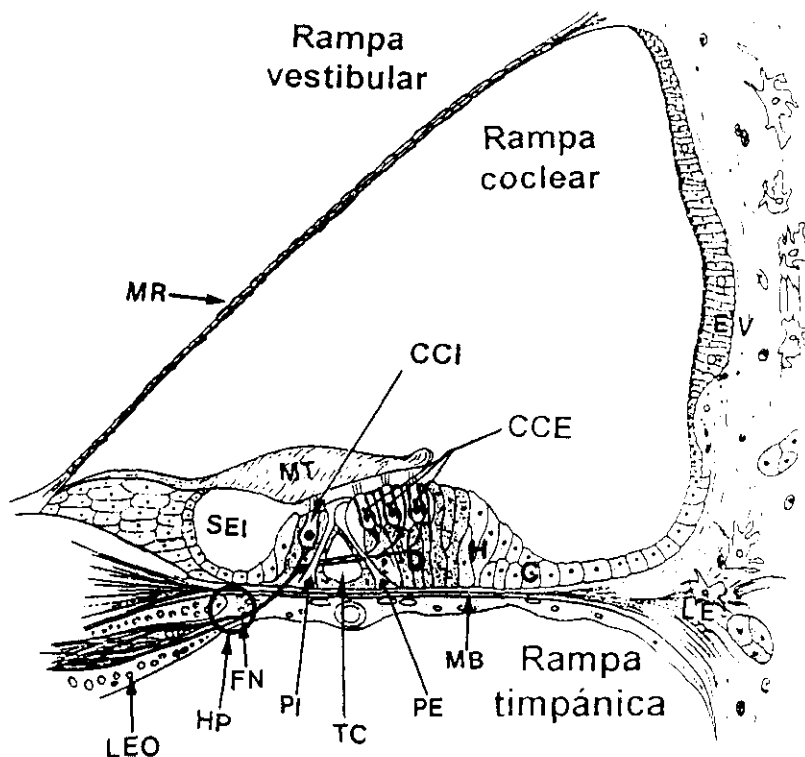
Las CCEs se sitúan en la región externa del órgano de Corti, sustentadas sobre las células de Deiters. Se disponen en tres o cuatro hileras paralelas que recorren la espiral coclear (Merchán y Ludeña, 1983; Uziel, 1985b; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993; Kahle, 1995) (Fig. 4).

Son células cilíndricas con el núcleo en la región basal. Al igual que en las CCIs, en el polo apical tienen una placa cuticular con estereocilios dispuestos en hileras y conectados entre sí por puentes glicoproteicos. Pero en este caso, las hileras de estereocilios forman una V o W con el vértice orientado hacia la pared lateral de la rampa media. La longitud de los estereocilios aumenta hacia el exterior de la espiral y los más externos, y más largos, están anclados en la membrana tectoria, a diferencia de los estereocilios de las CCIs que no contactan con dicha membrana (Kimura, 1965; Uziel, 1985b; Furness y Hackney, 1986; Corwin y Warchol, 1991; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

Las CCEs son células contráctiles. Las células de Deiters sobre las que se apoyan están en contacto directo con la membrana basilar, por lo tanto la vibración de las CCEs puede ser transmitida a través de la membrana basilar al resto del receptor. Se les ha asignado un papel fisiológico como moduladores de la energía mecánica que recibe el receptor auditivo, participando en la selectividad frecuencial de las CCIs. También han sido relacionadas con la protección del sistema auditivo frente a elevadas intensidades acústicas (Corwin y Warchol, 1991; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).



**Figura 3:** Esquema de un corte transversal de dos de las espiras del conducto coclear. Dicho conducto se encuentra dividido en tres rampas (RC = rampa coclear, RT = rampa timpánica y RV = rampa vestibular) mediante dos membranas (MB = membrana basilar y MR = membrana de Reissner). (NC = nervio coclear, OC = órgano de Corti).



**Figura 4:** Esquema de la rampa coclear y del receptor auditivo u órgano de Corti. La rampa coclear está delimitada por: la membrana basilar (MB), la membrana de Reissner (MR) y la estría vascular (EV). Sobre la MB asienta el órgano de Corti, constituido por células de soporte (D, células de Deiters; PE/PI pilares externo e interno que delimitan el TC, túnel de Corti), y células sensoriales (CCI, célula ciliada interna; CCE, células ciliadas externas). En los laterales del receptor se localizan el surco espiral interno (SEI), las células de Hensen (H) y las células de Claudius (C), y sobre él la membrana tectoria (MT). (FN = fibras nerviosas, HP = *habenula perforata*, LE = ligamento espiral, LEO = lámina espiral ósea).

## 2. INERVACION DE LA COCLEA

La cóclea recibe tres tipos de fibras nerviosas: aferentes y eferentes, que alcanzan el OC, y simpáticas, que no inervan directamente a las células receptoras.

### 2.1. INERVACION AFERENTE

Las neuronas aferentes cocleares son las encargadas de transmitir la información auditiva desde el receptor hacia el sistema nervioso central, donde es procesada. Constituyen el primer eslabón de la vía auditiva.

Sus cuerpos celulares se encuentran localizados en el ganglio espiral o de Corti. Este ganglio se sitúa en el canal espiral de Rosenthal, que es un canal excavado en la región lateral del modiolo desde la base hasta el ápex coclear. Los axones de estas neuronas recorren el interior del modiolo y salen de la cóclea por la espira basal constituyendo el nervio coclear. Estos axones contactan con neuronas de los núcleos cocleares, en el tronco cerebral, constituyéndose la segunda sinapsis de la vía auditiva. La primera sinapsis se encuentra en el propio receptor auditivo como se comentará más adelante. Las dendritas de las neuronas aferentes salen del modiolo atravesando la lámina espiral ósea, cruzan unos orificios perforados en dicha lámina denominados *habenula perforata* y alcanzan las células sensoriales (Brodal, 1981; Uziel, 1985b; Brown, 1987; Brown y cols., 1988; Brown y Ledwith, 1990; Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

Se distinguen dos tipos de neuronas aferentes: neuronas de tipo I que inervan la base de las CCIs y neuronas de tipo II que inervan la base de las CCEs.

#### 2.1.1. INERVACION AFERENTE DE TIPO I

Las neuronas de tipo I son bipolares y mielinizadas hasta la *habenula perforata*. Sus dendritas alcanzan las CCIs de manera radial desde el centro de la espira sin ramificarse. Cada dendrita aferente tipo I inerva una única CCI, sin embargo cada CCI está inervada hasta por treinta dendritas de tipo I (Fig. 5). Las neuronas tipo I

constituyen del 90 al 95% de las neuronas del ganglio espiral, mientras que las CCIs, cuyo polo basal inervan, suponen sólo el 25% de las células ciliadas (Spoendlin, 1969, 1984; Brodal, 1981; Kiang y cols., 1982; Uziel, 1985b; Berglund y Ryugo, 1987; Brown, 1987; Dannhof y Bruns, 1993; Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993). Funcionalmente este hecho supone que cada zona puntual del receptor está representada de forma amplia en el ganglio espiral. Esta representación divergente de la información se incrementa en niveles más altos de la vía auditiva por la existencia de numerosas colaterales en cada nivel.

Hoy en día está aceptado que las neuronas de tipo I son las responsables de la transmisión del mensaje auditivo a los núcleos cocleares (Liberman, 1982a,b; Liberman y Oliver, 1984; Robertson, 1984; Uziel, 1985b; Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993). Dentro de estas neuronas se han caracterizado dos subpoblaciones con distinta frecuencia de descarga y distintas características morfológicas (Liberman, 1978, 1980a, 1982a,b; Liberman y Oliver, 1984; Ryugo y Rouiller, 1988; Liberman y cols., 1990; Merchán-Pérez y Liberman, 1996; Rosbe y cols., 1996).

### **2.1.2. INERVACION AFERENTE DE TIPO II**

Las neuronas de tipo II son pseudomonopolares y amielínicas. Sus dendritas alcanzan el receptor desde el ganglio espiral paralelamente a las aferentes de tipo I, atraviesan el TC por la zona basal, ascienden apoyadas en las células de Deiters hasta las CCEs y emiten varias ramificaciones. Una dendrita tipo II puede establecer contactos sinápticos con varias CCEs (de 6 a 20) situadas en distintas filas. Sin embargo, una CCE es inervada solamente por aproximadamente dos dendritas tipo II (Fig. 5). Las neuronas de tipo II constituyen del 5 al 10% de las neuronas del ganglio espiral, y este bajo número inerva a todas las CCEs (es decir al 75% de las células ciliadas de la cóclea) (Spoendlin, 1969, 1984; Brodal, 1981; Kiang y cols., 1982; Uziel, 1985b; Berglund y Ryugo, 1987; Brown, 1987; Simmons y Liberman, 1988; Liberman y cols., 1990; Dannhof y Bruns, 1993; Eybalin, 1993). Este patrón de

inervación representa, contrariamente a lo expuesto para las neuronas tipo I, un ejemplo de convergencia, es decir cada neurona tipo II recibe información procedente de un amplio sector coclear.

Las neuronas de tipo II, cuyas dendritas establecen contactos sinápticos con la base de las CCEs, no parecen responder a estímulos sonoros (Robertson, 1984). Se ha sugerido que estas neuronas informan al SNC sobre la actividad mecánica de las CCEs o que pueden constituir un sistema de alarma frente a situaciones de stress acústico (Cody y Russell, 1985; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

## **2.2. INERVACION EFERENTE**

Las neuronas eferentes cocleares actúan como moduladores del receptor auditivo y del mensaje auditivo. Es un sistema de control procedente del sistema nervioso central que se activa dependiendo de la información que reciben los centros superiores.

Los cuerpos celulares de estas neuronas se encuentran situados en el tronco cerebral, concretamente en el complejo olivar superior (COS) (Warr, 1975; Warr y Guinan, 1979; Guinan y cols., 1983; White y Warr, 1983; Schwarz y cols., 1986; Thompson y Thompson, 1986; Aschoff y Ostwald, 1987; Campbell y Henson, 1988). Sus axones constituyen el haz olivococlear o de Rasmussen que sale del cráneo acompañando a una rama del nervio vestibular y en la anastomosis de Oort, en el conducto auditivo interno, se une al nervio coclear y entra en la cóclea por la espira basal (Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga, 1995). En la base coclear alcanza el canal espiral o de Rosenthal y por su parte externa recorre la cóclea siguiendo la espiral y constituyendo el haz espiral intraganglionar (Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga, 1995). Estos axones dejan el canal de Rosenthal a distintos niveles, atraviesan la habenula perforata y alcanzan el receptor auditivo (Brodal, 1981; Spoendlin, 1984; Wilson y cols., 1991; Warr, 1992; Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga, 1995).

Según su núcleo de origen se distinguen dos fascículos o sistemas: el sistema eferente olivococlear lateral (SEOL) y el medial (SEOM).

### **2.2.1. SISTEMA EFERENTE OLIVOCOCLEAR LATERAL**

Los cuerpos celulares de las neuronas del SEOL se encuentran en el núcleo lateral del complejo olivar superior. Son neuronas pequeñas, con axones finos y amielínicos. Esta inervación constituye del 50 al 70%, según la especie estudiada, de la inervación olivococlear que recibe el receptor auditivo y es mayoritariamente ipsilateral. Tras atravesar la *habenula perforata* estos axones realizan un recorrido en espiral, en el que constituyen el haz espiral interno bajo las CCIs. Aquí contactan con varias terminaciones de dendritas aferentes de tipo I realizando sinapsis axodendríticas en passant y/o terminales (Warr y Guinan, 1979; Liberman, 1980b; White y Warr, 1983; Ginzberg y Morest, 1984; Guinan y cols., 1984; Spöndlin, 1984; Pujol y Lenoir, 1986; Schwarz y cols., 1986; Robertson y cols., 1987; Liberman y cols., 1990; Wilson y cols., 1991; Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga, 1995; Satake y Liberman, 1996) (Fig. 5).

La estimulación eléctrica de las fibras del SEOL disminuye la amplitud del potencial de acción compuesto (PAC) del nervio auditivo, que es la suma de las respuestas unitarias de las fibras del nervio coclear (Brodal, 1981; Aran y Harrison, 1985). Por lo tanto parece que estas neuronas modulan el mensaje auditivo inhibiendo las fibras aferentes primarias (Gil-Loyzaga y Pujol, 1993). También se ha sugerido la misma modulación sobre los núcleos cocleares, ya que estas neuronas envían colaterales a las zonas de los núcleos cocleares en las que terminan los axones de las neuronas aferentes primarias (Godfrey y cols., 1987a, 1987b; Ryan y cols., 1987, 1990; Winter y cols., 1989; Shore y cols., 1991).

### **2.2.2. SISTEMA EFERENTE OLIVOCOCLEAR MEDIAL**

Los cuerpos celulares de las neuronas del SEOM se encuentran fundamentalmente en el núcleo ventromedial del cuerpo trapezoides y su entorno.

Son neuronas grandes y con axones mielinizados que proyectan a la cóclea con una importante componente contralateral. Tras atravesar la *habenula perforata* estas fibras tienen una distribución radial cruzando el TC por la región central hasta contactar con el polo basal de, aproximadamente, una decena de CCEs de distintas hileras formando sinapsis axo-somáticas (Warr, 1975, 1992; Warr y Guinan, 1979; White y Warr, 1983; Ginzberg y Morest, 1984; Guinan y cols., 1984; Spöndlin, 1984; Pujol y Lenoir, 1986; Schwarz y cols., 1986; Robertson y cols., 1987; Liberman y cols., 1990; Wilson y cols., 1991; Eybalin, 1993) (Fig. 5).

La estimulación eléctrica de las fibras del SEOM produce un aumento de los potenciales microfónicos cocleares, lo cual refleja un aumento de la actividad de las CCEs. Se podría sugerir por tanto que el SEOM está implicado en la regulación de la contractilidad de las CCEs (Aran y Harrison, 1985; LePage, 1989; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993). Al igual que las fibras del SEOL, las fibras del SEOM envían colaterales a los núcleos cocleares (Godfrey y cols., 1987a, 1987b; Winter y cols., 1989; Ryan y cols., 1990; Brown y cols., 1991; Shore y cols., 1991). Sin embargo, el efecto modulador de estas neuronas en los núcleos cocleares permanece aún sin aclarar.

### **2.3. INERVACION SIMPATICA**

Las fibras simpáticas que proyectan sobre la cóclea tienen una distribución periférica dual. La mayoría de las fibras son perivasculares, pero algunas no están relacionadas con los vasos sanguíneos sino que terminan en la región de la *habenula perforata* entre las fibras aferentes y eferentes. Estos dos grupos de fibras simpáticas se caracterizaron en los años '60 mediante técnicas de histofluorescencia y microscopía electrónica (Spöndlin y Lichtensteiger, 1966; Terayama y cols., 1966, 1968; Vinnikov y cols., 1966; Ross, 1971; Densert, 1974; Densert y Flock, 1974; Spöndlin, 1981, 1984). Estudios más recientes de inmunocitoquímica (Jones y cols., 1987; Usami y cols., 1988; Hozawa y Kimura,

1990; Eybalin y cols., 1993), degeneración neuronal tras administración de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Densert, 1975a; Eybalin y cols., 1993) y captación de  $^3\text{H}$ -noradrenalina (Eybalin y cols., 1983) han confirmado esta distribución.

El origen principal de estas fibras parece ser el ganglio cervical superior (GCS) (Terayama y cols., 1966, 1968; Densert, 1974; Spoendlin, 1981, 1984; Shibamori y cols., 1994). Sin embargo, mientras algunos autores (Terayama y cols., 1966, 1968; Shibamori y cols., 1994) defienden el GCS como único origen, otros (Spoendlin, 1981, 1984; Laurikainen y cols., 1993, 1997; Ren y cols., 1993) añaden el ganglio estrellado (GE) como origen de algunas de las fibras simpáticas que proyectan a la cóclea con una distribución exclusivamente perivascular (Spoendlin, 1981, 1984).

Las fibras simpáticas cocleares se han relacionado con el control del flujo sanguíneo coclear (Hultcrantz, 1979; Beausang-Linder y Hultcrantz, 1980; Laurikainen y cols., 1993, 1994, 1997; Ren y cols., 1993a, 1993b, 1994) y con la modulación de la actividad del nervio coclear a nivel de la *habenula perforata* (Pickles, 1979; Hultcrantz y cols., 1982; Lee y Moller, 1985; Hildesheimer y cols., 1991).

### **3. NEUROTRANSMISORES DE LA COCLEA**

Las sinapsis neurosensoriales presentes en el receptor auditivo son de tipo químico, es decir mediadas por un neurotransmisor. Las sinapsis implicadas en la vía ascendente, vía de entrada de información al sistema nervioso central, son en primer lugar las constituidas por las CCIs y las dendritas aferentes tipo I y, en segundo lugar, las constituidas por las CCEs y las dendritas aferentes tipo II. Las implicadas en la vía descendente, vía moduladora procedente del sistema nervioso central, están constituidas, en primer lugar, por los axones del SEOL y las dendritas aferentes tipo I y, en segundo lugar, por los axones del SEOM y las CCEs. Por lo tanto, en la vía ascendente el polo presináptico está constituido por las células ciliadas y el postsináptico por las neuronas aferentes, mientras que en la vía



descendente el polo presináptico lo constituyen las fibras eferentes olivococleares y el postsináptico las aferentes primarias o las CCEs.

A continuación desglosaremos la localización y el papel funcional de diversos tipos de neurotransmisores detectados en las sinapsis aferentes y eferentes, mientras que los neurotransmisores con estructura química de monoaminas son tratados de forma conjunta en un capítulo específico (el capítulo 4), ya que son los compuestos en los que está centrada la presente Memoria de Tesis Doctoral.

### **3.1. NEUROTRANSMISORES PRESENTES EN LAS CELULAS CILIADAS**

El principal candidato a ser el neurotransmisor de la sinapsis CCI-aferentes primarias parece ser el glutamato (Fig. 6). Estudios inmunocitoquímicos (Altschuler y cols., 1989; Usami y cols., 1992) mostraron la presencia de glutamato en las CCIs. Asimismo métodos autorradiográficos pusieron de manifiesto la captación de glutamina, precursor del glutamato, por las CCIs (Eybalin y Pujol, 1983). Más recientemente, se han identificado, mediante hibridación *in situ*, varias subunidades de receptores de glutamato en las neuronas del ganglio espiral (Ryan y cols., 1991a; Safieddine y Eybalin, 1992a, 1995; Kuriyama y cols., 1993; Puel, 1995; Pujol y cols., 1995).

La perfusión intracoclear de glutamato o sus agonistas altera los potenciales cocleares y las respuestas de fibras unitarias (Bobbin y Thompson, 1978; Comis y Leng, 1979; Puel y cols., 1991a, 1991b) mostrando un efecto en la fisiología coclear. Estos compuestos también modifican los registros electrofisiológicos *in vitro* de las neuronas del ganglio espiral aisladas (Nakagawa y cols., 1991). La administración intracoclear de dosis elevadas de glutamato o sus agonistas produce además la degeneración de las dendritas aferentes primarias (Pujol y cols., 1985, 1991, 1992, 1993, 1995; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990; Juárez y cols., 1989; Puel y cols., 1991a; Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga y cols., 1993), así como un aumento en la

expresión de RNAm que codifica receptores glutamatérgicos en las neuronas aferentes (Eybalin y cols., 1995; Pujol y cols., 1995).

El neurotransmisor que activa las aferentes tipo II aún no ha sido determinado, aunque estudios inmunocitoquímicos han demostrado la presencia de glutamato y aspartato en las CCEs (Altschuler y cols., 1989; Usami y cols., 1992).

### **3.2. NEUROTRANSMISORES PRESENTES EN EL SISTEMA EFERENTE OLIVOCOCLEAR**

En el SEOL se han detectado varios neurotransmisores y neuromoduladores: acetilcolina (ACh), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), encefalinas, dinorfinas y DA. Sin embargo, en el SEOM sólo se ha descrito la presencia de ACh y CGRP, y en el segmento más apical GABA, aunque este último se desconoce si realmente pertenece al SEOM (Fig. 6).

#### **3.2.1. ACETILCOLINA**

Estudios inmunocitoquímicos a microscopía óptica y electrónica localizaron la enzima responsable de la síntesis de ACh (colina acetil-transferasa) en las fibras nerviosas y las neuronas del SEOL y el SEOM (Klinke, 1981; Altschuler y cols., 1984, 1985a; Schwarz y cols., 1986; Eybalin y Pujol, 1987; Safieddine y Eybalin, 1992b; Merchán-Pérez y cols., 1994; Schrott-Fischer y cols., 1994; Gil-Loyzaga, 1995; Safieddine y cols., 1997). Asimismo se evidenció la existencia de actividad ACh esterasa (enzima responsable de la hidrólisis de ACh) en la cóclea y el COS (Iurato y cols., 1971; Warr, 1975; Klinke, 1981; White y Warr, 1983; Godfrey y Ross, 1985; Schwarz y cols., 1986; Sobkowicz y Emmerling, 1989; Hozawa y Kimura, 1990). Recientemente, se ha descrito la presencia de receptores colinérgicos y sus correspondientes RNAm en las CCEs, las neuronas del ganglio espiral y las neuronas del COS (Plinkert y cols., 1990; Eybalin, 1993; Puel, 1995; Dulon y Lenoir, 1996; Safieddine y cols., 1996). En las neuronas del COS, el RNAm que codifica el

receptor muscarínico M3 colocalizó con el RNAm que codifica la enzima colina acetil-transferasa (Safieddine y cols., 1996, 1997).

La perfusión intracoclear de ACh y agonistas colinérgicos, disminuye la amplitud del PAC del nervio auditivo y altera la actividad de las fibras aferentes auditivas unitarias (Comis y Leng, 1979; Felix y Ehrenberger, 1992; Hunter y cols., 1992; Eybalin, 1993; Puel, 1995), lo cual sugiere una acción de la ACh sobre las fibras aferentes primarias. En este sentido, se ha observado que la administración intracoclear de dosis tóxicas de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), un aminoácido análogo del glutamato, y el trauma acústico producen un aumento de los niveles del RNAm que codifica la enzima colina acetil-transferasa en el COS (Eybalin y cols., 1995; Pujol y cols., 1995).

Por otra parte, la administración ACh y agonistas colinérgicos aumenta la amplitud de los potenciales microfónicos cocleares (Hunter y cols., 1992; Kujawa y cols., 1992; Pujol, 1994; Puel, 1995; Pujol y cols., 1995) y regula la motilidad *in vitro* de las CCEs (Brownell y cols., 1985; Slepecky y cols., 1988; Le Page, 1989; Plinkert y cols., 1990; Sziklai y cols., 1996). De aquí se deduce que la ACh podría tener actividad sobre el SEOL y el SEOM.

### 3.2.2. ACIDO $\gamma$ -AMINO BUTIRICO

El GABA y la enzima responsable de su síntesis, la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), han sido localizados inmunocitoquímicamente en el haz espiral interno, lo cual indica que este neurotransmisor está presente en las fibras del SEOL (Fex y Altschuler, 1984; Fex y cols., 1986; Eybalin y cols., 1988; Usami y cols., 1988, Eybalin y Altschuler, 1990; Merchán-Pérez y cols., 1990a y b, 1993; Gil-Loyzaga, 1995; Nitecka y Sobkowicz, 1996). Tanto el GABA, como la GAD, como el RNAm que codifica dicha enzima han sido descritos además, mediante inmunocitoquímica e hibridación *in situ* respectivamente, en el núcleo lateral del COS (Moore y Moore, 1987; Helfert y cols., 1989; Vetter y cols., 1991; Eybalin y

cols., 1995; Safieddine y cols., 1997). En el ápex coclear también se han observado fibras GABAérgicas cruzando el túnel de Corti y contactando con el polo basal de las CCEs (Fex y cols., 1986; Usami y cols., 1988; Merchán-Pérez y cols., 1990a y b, 1993; Gil-Loyzaga, 1995; Nitecka y Sobkowicz, 1996), y receptores GABA<sub>A</sub> en el polo basal de las CCEs (Plinkert y cols., 1989). Sin embargo, la procedencia de estas fibras que contactan las CCEs aún no ha quedado establecida definitivamente.

Varios estudios no han detectado modificaciones significativas en los registros electrofisiológicos tras la administración intracoclear de GABA (Bobbin y Thompson, 1978; Hunter y cols., 1992; Eybalin, 1993; Puel, 1995). Sin embargo, se ha observado que el GABA disminuye la actividad de las fibras aferentes primarias inducida por aminoácidos excitotóxicos (Felix y Ehrenberger, 1992). Además el GABA hiperpolariza las CCEs (Gitter y Zenner, 1992) y disminuye su motilidad (Sziklai y cols., 1996). Por otra parte, la estimulación sonora induce la liberación de GABA a la perilinfa en concentración proporcional a la intensidad aplicada (Drescher y cols., 1983). Asimismo el trauma acústico y la neurotoxicidad inducida por AMPA aumentan la expresión del RNAm que codifica la GAD en las neuronas del COS (Eybalin y cols., 1995; Pujol y cols., 1995).

### **3.2.3. PEPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA**

El CGRP se ha identificado mediante inmunocitoquímica en varicosidades del haz espiral interno y en fibras que proyectan sobre las CCEs (Eybalin y Pujol, 1989; Sliwinska - Kowalska y cols., 1989; Kuriyama y cols., 1990; Merchán-Pérez y cols., 1990c y d; Safieddine y Eybalin, 1992b; Gil-Loyzaga, 1995). También se ha observado su presencia (Takeda y cols., 1986; Lu y cols., 1987; Vetter y cols., 1991; Safieddine y Eybalin, 1992b; Simmons y Raji-Kubba, 1993; Safieddine y cols., 1997), así como la del RNAm que lo codifica (Eybalin y cols., 1995; Safieddine y cols., 1997), en neuronas del COS. Por otra parte, se ha descrito la presencia de

fibras que contienen CGRP inervando la arteria basilar modiolar (arteria terminal de la cóclea) (Carlisle y cols., 1990), y las ramas de la misma (Merchán-Pérez y cols., 1990c y d).

Excluyendo una comunicación preliminar que describió que la perfusión intracoclear de CGRP disminuía la amplitud del PAC del nervio auditivo, no existen mayores evidencias del papel funcional del CGRP en la cóclea (Hunter y cols., 1992; Eybalin, 1993; Puel, 1995). Tampoco los niveles del RNAm que codifica el CGRP se modificaron en el COS tras la administración de AMPA o tras someter los animales a trauma acústico (Eybalin y cols., 1995; Pujol y cols., 1995).

#### **3.2.4. ENCEFALINAS**

En las terminaciones cocleares del SEOL se han detectado inmunocitoquímicamente los péptidos: Met-encefalina, Leu-encefalina y el octapéptido Met-encefalina-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> (Fex y Altschuler, 1981; Altschuler y cols., 1984; Eybalin y cols., 1984, 1985; Gil-Loyzaga y cols., 1988; Eybalin y Altschuler, 1990; Safieddine y Eybalin, 1992b; Gil-Loyzaga, 1995). Asimismo, mediante técnicas de HPLC y radioinmunoensayo se cuantificaron las concentraciones cocleares de Met-encefalina y del octapéptido Met-encefalina-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> (Eybalin y cols., 1984, 1985, 1987). En el COS solamente algunas neuronas del núcleo lateral expresan estos péptidos, lo cual concuerda con la reducida población de fibras que contienen encefalinas detectada en la cóclea (Altschuler y cols., 1984, 1988; Safieddine y Eybalin, 1992b; Safieddine y cols., 1997).

La concentración de Met-encefalina en perilinfa aumenta debido a la estimulación acústica con ruido blanco, igual que sucede con el GABA (Drescher y cols., 1983). Al mismo tiempo, la estimulación acústica provoca una disminución de la cantidad total de Met-encefalina coclear (Eybalin y cols., 1987). Ambos resultados

considerados conjuntamente podrían sugerir que el neuropéptido es liberado debido a la estimulación acústica y catabolizado.

### **3.2.5. DINORFINAS**

Estas sustancias, al igual que las encefalinas son péptidos opioides, aunque actúan sobre distintos receptores (Hunter y cols., 1992). Las dinorfinas A y B y la  $\alpha$ -neoendorfina han sido identificadas inmunocitoquímicamente en la región del haz espiral interno (Altschuler y cols., 1985b; Abou-Madi y cols., 1987), así como en neuronas del núcleo lateral del COS (Abou-Madi y cols., 1987; Altschuler y cols., 1988).

Los únicos datos disponibles en la actualidad acerca del papel funcional de las dinorfinas en la cóclea se deben a Sahley y cols. (1991). Estos autores observaron que la amplitud del PAC del nervio auditivo aumentaba tras la administración intravenosa de agonistas de receptores kappa (Hunter y cols., 1992; Puel, 1995).

## **4. LAS MONOAMINAS EN LA COCLEA**

### **4.1. DOPAMINA**

Los primeros estudios que sugieren la existencia de catecolaminas en las fibras del sistema eferente olivococlear son los trabajos de histofluorescencia de Vinnikov y cols. (1966) y los de neurotoxicidad de 6-OHDA realizados por Densert (1975a). Ambos estudios describieron fibras de tipo catecolaminérgico proyectando hacia el OC que no coincidían con la distribución conocida de las fibras simpáticas cocleares.

Posteriormente se identificó dopamina (DA) en homogeneizados cocleares de ratas, adultas y en desarrollo, mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección electroquímica (HPLC-ED) (Gil-Loyzaga y Parés-Herbuté, 1986, 1989). La existencia de esta monoamina en el receptor auditivo había sido

negada en estudios previos de HPLC que determinaron la presencia de NA en la cóclea y la ausencia de DA, 5-HT y adrenalina (Rarey y cols., 1981, 1982).

La presencia de DA en la cóclea ha sido demostrada mediante métodos inmunocitoquímicos, utilizando anticuerpos contra la tirosina hidroxilasa (TH) y la aminoácido aromático descarboxilasa (AAD). La localización de estas enzimas, implicadas en la síntesis de catecolaminas a partir de tirosina, en el haz espiral interno, bajo las CCI, indicó la existencia de una catecolamina en las fibras del SEOL. La ausencia en ese haz de inmunorreactividad positiva al uso de anticuerpos contra dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (DBH) y feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT), enzimas que catalizan la transformación de DA en NA y de ésta en adrenalina respectivamente, sugirió que la catecolamina presente en las fibras del SEOL es DA, descartándose la presencia de NA y adrenalina en esta ubicación (Jones y cols., 1987; Usami y cols., 1988). Estudios inmunocitoquímicos a microscopía electrónica han corroborado la presencia de TH en estas fibras, indicando que dicha reacción positiva desaparece tras la administración de la neurotoxina 6-OHDA (Eybalin y cols., 1993). En el COS también se ha encontrado inmunorreactividad positiva usando anticuerpos contra TH en neuronas que, por su localización, podrían pertenecer al SEOL (Jones y Beaudet, 1987; Vincent, 1988; Safieddine y cols., 1997).

Recientemente, estudios de hibridación in situ han aportado nuevos datos que apoyan la existencia de DA en el SEOL, identificando el ARNm que codifica la TH en las neuronas de la oliva superior lateral. Además se han detectado los ARNm que codifican los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en las neuronas aferentes del ganglio espiral (Eybalin y cols., 1995; Pujol y cols., 1995; Safieddine y cols., 1997).

El papel funcional de la DA en la cóclea en un principio pareció inexistente, ya que su administración por vía intracoclear apenas alteró los potenciales cocleares (Bobbin y Thompson, 1978). Sin embargo, estudios posteriores han mostrado que la administración intracoclear de piribedil, un agonista dopaminérgico, disminuye la

amplitud del PAC del nervio auditivo (Puel y Pujol, 1993; Pujol y cols., 1993, 1995; Pujol, 1994) y evita la degeneración de las dendritas aferentes tipo I por efecto del trauma acústico y la hipoxia (Puel y Pujol, 1993; Pujol y cols., 1993, 1995; Pujol, 1994; D'Aldin y cols., 1995). Además se ha observado que el trauma acústico produce un aumento en la expresión del ARNm del receptor dopaminérgico D2 en las neuronas aferentes y del ARNm de la TH en las neuronas de la oliva superior lateral (Eybalin y cols., 1995; Pujol y cols., 1995). Asimismo la expresión del ARNm que codifica la TH aumentó en la oliva superior lateral tras someter la cóclea a un proceso de neurotoxicidad inducida por AMPA (Eybalin y cols., 1995; Pujol y cols., 1995). Todos estos estudios permiten implicar la DA en el proceso de neurotransmisión coclear, sugiriendo que podría participar en la regulación de las aferentes primarias en situaciones de stress auditivo como son la hipoxia, el trauma acústico o la neurotoxicidad.

#### **4.2. NORADRENALINA**

Los estudios de histofluorescencia y microscopía electrónica que establecieron la distribución de fibras simpáticas en la cóclea (Spoendlin y Lichtensteiger, 1966; Terayama y cols., 1966, 1968; Vinnikov y cols., 1966; Ross, 1971; Densert, 1974; Densert y Flock, 1974; Spoendlin, 1981, 1984), sugirieron a su vez la presencia de noradrenalina (NA) en dichas localizaciones. Este hecho es apoyado por la captación de  $^3\text{H}$ -NA por dichas fibras (Eybalin y cols., 1983). La degeneración neuronal producida por la administración de 6-OHDA (Densert, 1975a; Eybalin y cols., 1993) también indica la presencia de catecolaminas en las fibras simpáticas cocleares.

La NA no ha sido localizada inmunocitoquímicamente en la cóclea. Sin embargo, la presencia de TH y DBH y la ausencia de PNMT en las fibras simpáticas cocleares sugiere que la NA es el candidato más probable a ser el neurotransmisor liberado por estas fibras, aunque no se puede descartar la presencia de DA en las



mismas como precursor de la NA (Jones y cols., 1987, Usami y cols., 1988; Hozawa y Kimura, 1990).

La concentración de NA fue cuantificada mediante HPLC-ED en la cóclea de distintos mamíferos observándose variaciones debidas a la especie animal y la pigmentación (Rarey y cols., 1981) y al momento del desarrollo (Gil-Loyzaga y Parés-Herbuté, 1986, 1989). Sin embargo, la simpatectomía cervical superior 48 horas después de la intervención quirúrgica no afectó las concentraciones de NA (Rarey y cols., 1981). Las variaciones debidas a la pigmentación parecen deberse a una distinta concentración de NA en el modíolo y la pared lateral de la cóclea (Rarey y cols., 1982).

La administración intracoclear de NA inhibió la actividad espontánea de algunas fibras del nervio auditivo (Comis y Leng, 1979). Por otra parte la administración intravenosa o intraarterial de NA modificó el flujo sanguíneo coclear (Suga y Snow, 1969; Suga, 1976). Tanto el efecto sobre los potenciales auditivos como el efecto sobre el flujo sanguíneo coclear han sido relacionados con las fibras simpáticas que inervan la cóclea (Hultcrantz, 1979; Pickles, 1979; Beausang-Linder y Hultcrantz, 1980; Hultcrantz y cols., 1982; Lee y Moller, 1985; Hozawa y cols., 1990; Hildesheimer y cols., 1991; Laurikainen y cols., 1993, 1994; Ren y cols., 1993a, 1993b, 1994).

#### **4.3. SEROTONINA**

Estudios previos de HPLC han descrito la ausencia de serotonina (5-HT) en la cóclea (Rarey y cols., 1981). Asimismo la  $^3\text{H}$ -5HT no resultó captada por las células cocleares in vitro (Eybalin y cols., 1983).

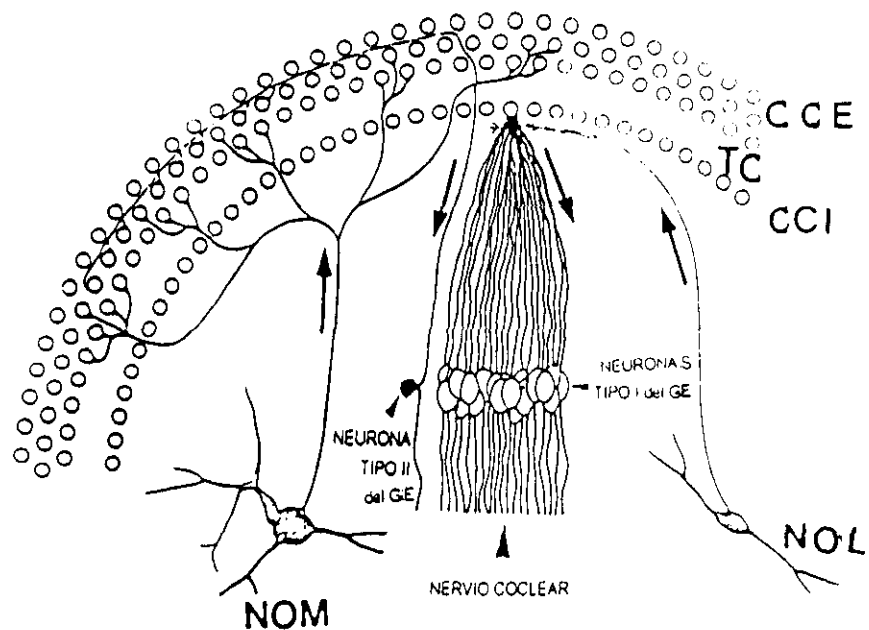
Sin embargo, al igual que sucedió con la DA en su día, existen algunos indicios que podrían inducir a pensar en la 5-HT como otro de los neurotransmisores cocleares, o al menos como un compuesto presente en la cóclea. En primer lugar, la administración intracoclear de 5-HT redujo el PAC del nervio auditivo (Bobbin y

Thompson, 1978). Además en la cóclea se ha detectado melatonina, un derivado de la 5-HT, mediante radioinmunoensayo (Biesalski y cols., 1988), lo cual sugiere la presencia de 5-HT como precursor. Otros derivados de la 5-HT se produjeron tras la incubación de cócleas con  $^{14}\text{C}$ -5HT. Entre ellos se encuentra el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), que es el principal producto de degradación de la 5-HT (Biesalski y cols., 1988). Otro indicio a favor de la presencia de 5-HT en el receptor auditivo es la localización del ARNm que codifica la subunidad A del receptor 5-HT<sub>3</sub> en el epitelio sensorial de la rata embrionaria (Johnson y Heinemann, 1995).

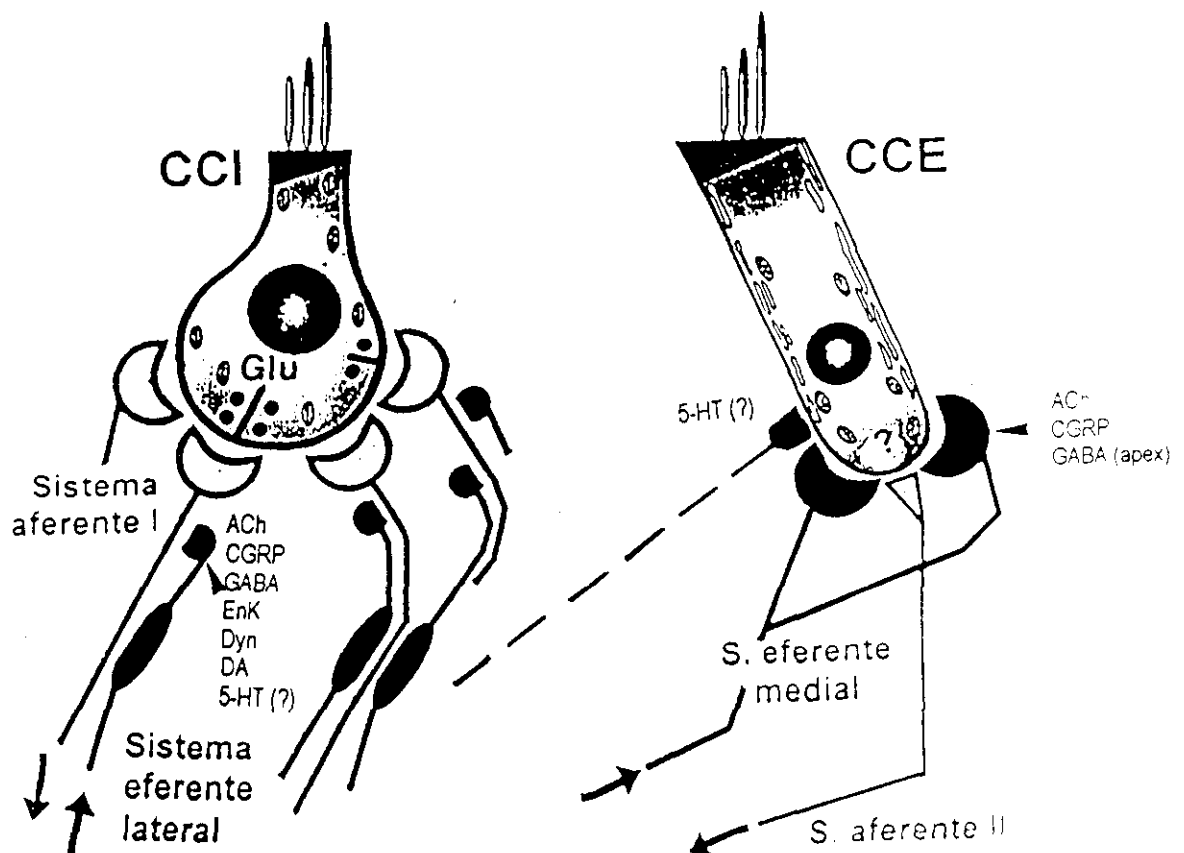
Por otra parte existen estudios inmunohistoquímicos (Chang y cols., 1988; Cohen y cols., 1992) y bioquímicos (Bonvento y cols., 1991) que sugieren la presencia de 5-HT en fibras simpáticas procedentes del GCS que proyectan a territorios distintos de la cóclea. Estas fibras son capaces de captar y liberar 5-HT (Chang y cols., 1989). También algunas neuronas del GCS contienen y sintetizan 5-HT (Häppölä, 1988).

Otra opción que debe ser considerada es la posibilidad de encontrar 5-HT relacionada con los vasos sanguíneos cocleares, ya que este compuesto está presente en el torrente circulatorio. La mayoría se encuentra en las plaquetas, aunque una pequeña parte aparece libre en el plasma (Anderson y cols., 1987; Kumar y cols., 1990; Pussard y cols., 1996).

Estudios recientes de nuestro laboratorio (Gil-Loyzaga y cols., 1997a) han identificado fibras serotoninérgicas proyectan a la cóclea y contactan con las CCIs y las CCEs. La distribución en la cóclea de estas fibras no corresponde con las fibras simpáticas, sino que se ajusta más a la del sistema eferente olivococlear. Sin embargo, presenta diferencias respecto a la distribución de fibras de este sistema, como son la inervación de ambos tipos de células sensoriales (Fig. 6).



**Figura 5:** Esquema de la distribución de las fibras nerviosas aferentes y eferentes en el receptor auditivo (modificado de Warr, 1992). CCE = células ciliadas externas, CCI = células ciliadas internas, GE = ganglio espiral, NOL = neurona olivococlear lateral, NOM = neurona olivococlear medial, TC = túnel de Corti.



**Figura 6:** Esquema de los neurotransmisores localizados en el receptor auditivo. Las células ciliadas internas (CCI) contienen glutamato (Glu) que activa las neuronas aferentes de tipo I. Estas neuronas son moduladas por las fibras eferentes olivococleares laterales que contienen: acetilcolina (ACh), CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina), ácido gamma-aminobutírico (GABA), encefalinas (Enk), dinorfinas (Dyn) y dopamina (DA). El neurotransmisor que liberan las células ciliadas externas (CCE) para activar el sistema aferente de tipo II se desconoce en la actualidad. En el sistema eferente olivococlear medial se ha descrito la presencia de: ACh, CGRP y en el ápex coclear GABA. Fibras que contienen 5-HT han sido identificadas contactando con el polo basal de las CCI y las CCE, pero se desconoce si pertenecen al sistema olivococlear.

## **5. FISILOGIA DE LA AUDICION**

### **5.1. RECORRIDO DE LA ONDA SONORA**

Las ondas sonoras que son captadas por el pabellón auditivo recorren el oído externo hasta la membrana timpánica y producen su vibración. Esta vibración se transmite a la cadena de huesecillos del oído medio desde el martillo al estribo. El estribo, a su vez, hace vibrar la ventana oval, que separa el oído medio del interno, y en la porción coclear del oído interno, como se comentará más adelante, dichas vibraciones son transformadas en un mensaje neural que es enviado al sistema nervioso central (Aran y Harrison, 1985; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

La vibración de la membrana oval genera una onda de presión en la periliíngula coclear. Esta onda circula por la rampa vestibular desde la base coclear hasta el ápex, alcanza el helicotrema, zona en que se fusionan las rampas vestibular y timpánica, y regresa a la base por la rampa timpánica. En la base coclear la onda de presión es eliminada mediante el desplazamiento de la ventana redonda, en sentido inverso al de la ventana oval (Aran y Harrison, 1985; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

### **5.2. ACTIVACION DEL RECEPTOR AUDITIVO**

En su recorrido por la rampa timpánica hacia la base coclear, la onda de presión produce el abombamiento de la membrana basilar, aproximándola a la membrana tectoria en zonas específicas según la frecuencia de la onda circulante. Las frecuencias graves producen el movimiento de los segmentos más apicales, las agudas de los más basales, y a lo largo de la espiral coclear se encuentran codificadas las frecuencias intermedias. Esta distribución tonotópica de frecuencias se puede explicar en base a las diferencias morfológicas entre la base y el ápex cocleares. Uno de los factores más determinantes es la estructura de la propia membrana basilar, que es progresivamente más delgada y larga a medida se avanza hacia el ápex coclear (Aran y Harrison, 1985; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

Se considera que la estructura del receptor, y concretamente de la membrana basilar, constituye un filtro pasivo de la frecuencia de la onda sonora. Existe un segundo filtro activo debido a las CCEs. Las CCEs de la región del receptor que se desplaza por la llegada de la onda sonora son presionadas contra la membrana tectoria. Los estereocilios más externos de estas células, que están anclados en la membrana tectoria, modifican su inclinación, y arrastran a los estereocilios menores. Este movimiento produce la apertura de canales iónicos en la superficie apical de las células y su activación. La activación de las CCEs provoca rápidas contracciones de las mismas, que permiten la amplificación de la señal en la zona central del segmento del receptor estimulado por la onda sonora, es decir aumentan la selectividad frecuencial (LePage, 1989; Dulon y Aran, 1990; Corwin y Warchol, 1991; Fuchs, 1992; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

Mientras que la frecuencia de la onda recibida queda reflejada en la cóclea por el movimiento selectivo de un pequeño segmento de membrana basilar, la intensidad de la onda se refleja en la anchura de dicho segmento. Por lo tanto, a intensidades elevadas disminuye la discriminación frecuencial (Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

### **5.3. ACTIVACION DE LAS CELULAS CILIADAS INTERNAS**

La aproximación de la membrana basilar hacia la tectoria debido a la circulación de la onda sonora por la perilinfa de la rampa timpánica produce el movimiento del OC, y concretamente de las CCIs, hacia la membrana tectoria. Las CCIs desplazadas por cada frecuencia recibida son pocas debido a los dos filtros antes citados (Aran y Harrison, 1985; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

Los estereocilios de las CCIs desplazadas son inclinados por la corriente de endolinfa que se genera entre la membrana tectoria y el receptor debido al movimiento de la membrana basilar. Al igual que en las CCEs, el desplazamiento de los estereocilios en determinada dirección conlleva la apertura de canales iónicos y

la activación celular, que a su vez se traduce en la liberación del neurotransmisor glutamato por su polo basal (Dulon y Aran, 1990; Corwin y Warchol, 1991; Fuchs, 1992; Aran y Harrison, 1985; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

#### **5.4. ACTIVACION DE LAS NEURONAS AFERENTES Y LA VIA AUDITIVA ASCENDENTE**

El glutamato liberado por las CCI<sub>s</sub> actúa sobre receptores específicos localizados en la membrana de las dendritas de las neuronas aferentes tipo I y produce su activación. A su vez la activación de las CCE<sub>s</sub> se refleja en la activación de las neuronas aferentes tipo II, aunque el neurotransmisor que media este proceso aún no está plenamente establecido (Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

Las neuronas aferentes proyectan sobre los núcleos cocleares, que son la primera estación de relevo en la vía auditiva. Desde los núcleos cocleares, el mensaje auditivo circula por la vía auditiva ascendente realizándose contactos sinápticos en varios núcleos (COS, lemnisco lateral, colículo inferior y cuerpo geniculado medial del tálamo) hasta alcanzar la corteza auditiva (Uziel, 1985c; Irvine, 1986; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993; Gil-Loyzaga, 1995).

#### **5.5. MODULACIÓN DEL MENSAJE AUDITIVO POR LAS NEURONAS EFERENTES**

De los distintos núcleos que constituyen la vía auditiva ascendente parten fibras nerviosas que contactan con estructuras inferiores y constituyen la vía auditiva descendente. Estas fibras nerviosas modulan la información ascendente a distintos niveles de la vía auditiva (Aran y Harrison, 1985; Irvine, 1986; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993).

En concreto, entre el tronco cerebral y el receptor auditivo se realiza un circuito de información. Este circuito lo componen tres fascículos nerviosos: 1) las fibras aferentes, que comunican las células ciliadas con neuronas de los núcleos

cocleares, 2) un haz de fibras que comunica las neuronas de los núcleos cocleares con neuronas del COS (estas fibras son colaterales de los axones ascendentes que parten de los núcleos cocleares y proyectan al colículo inferior contralateral) (Cant y Casseday, 1986; Thompson y Thompson, 1991; Eybalin, 1993) y 3) las fibras eferentes olivococleares, que comunican neuronas del COS con las dendritas aferentes tipo I o las CCEs.

### **III. LOS RECEPTORES VESTIBULARES**

#### **1. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES VESTIBULARES**

Los receptores vestibulares son de dos tipos: las máculas u órganos otolíticos y las crestas. Las máculas constituyen superficies ovaladas sobre el suelo del sáculo y el utrículo (Figs. 7 y 8). Tienen una orientación relativa perpendicular entre sí: la mácula utricular es horizontal y la sacular vertical. Las máculas son sensibles a las aceleraciones lineales y a la atracción de la gravedad. Las crestas son repliegues del suelo de las ampollas perpendiculares a la luz de los canales semicirculares. Son sensibles a las aceleraciones angulares (Sans y Raymond, 1985; Sans, 1993).

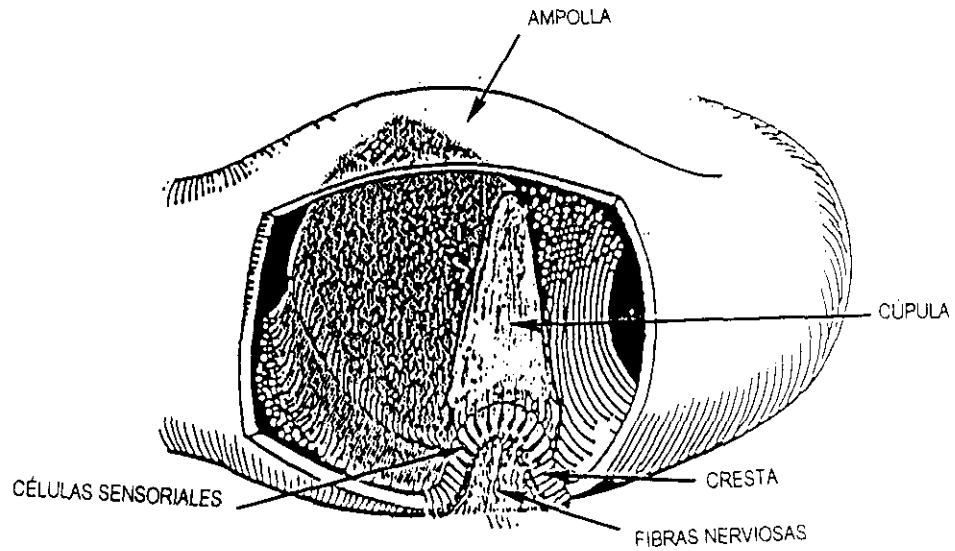
Ambos epitelios sensoriales constan de células de soporte y células sensoriales. En las máculas, el epitelio sensorial constituye una superficie plana y en las crestas se distribuye a lo largo de la superficie externa de las mismas, quedando en el interior de las crestas las fibras nerviosas (Sans y Raymond, 1985) (Figs. 7 y 8).

Las células sensoriales, al igual que en el receptor auditivo son de dos tipos: I, con forma de matraz, y II, alargadas. Ambos tipos presentan en su superficie apical estereocilios dispuestos en varias hileras paralelas constituyendo un hexágono y anclados a una placa cuticular. Estos estereocilios se encuentran libres entre sí, pero el espacio que los separa es muy pequeño. A diferencia de las células ciliadas del receptor auditivo, las células ciliadas del vestíbulo tienen además un

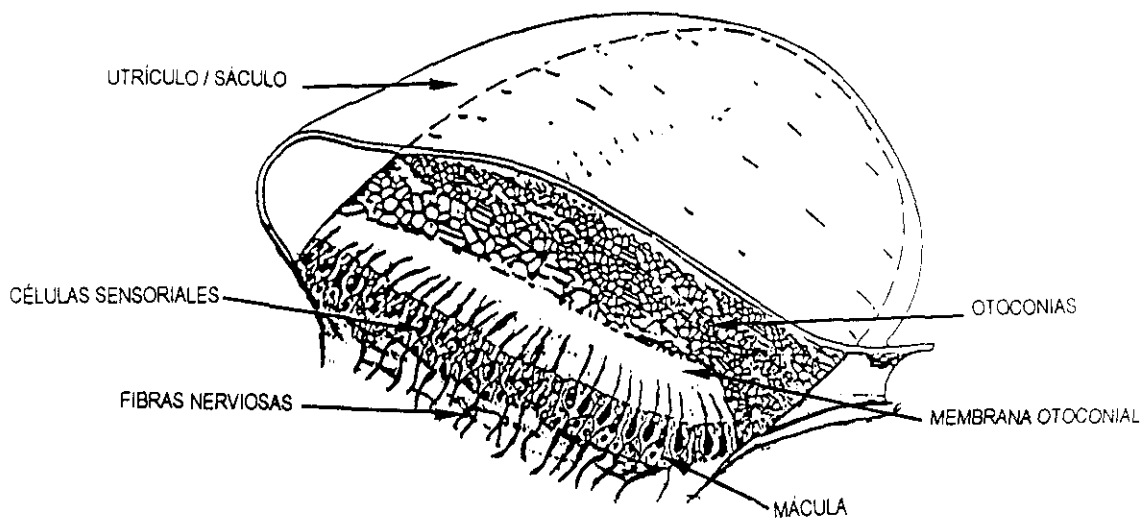
quinetocilio, o cilio verdadero, extrínseco al penacho de estereocilios, que está unido a los estereocilios adyacentes mediante finas trabéculas. Las hileras de estereocilios tienen una longitud creciente según se encuentran más próximas al quinetocilio (Sans y Raymond, 1985).

Sobre los epitelios sensoriales del vestíbulo se localizan unas estructuras gelatinosas de composición semejante a la membrana tectoria coclear (Gil-Loyzaga y cols., 1985; Gil-Loyzaga, 1997): la membrana otoconial sobre los epitelios maculares y la cúpula sobre las crestas (Figs. 7 y 8). La membrana otoconial está anclada al epitelio de las máculas por estrechos filamentos. En su zona inferior hay unos alvéolos en los cuales penetran los cilios de las células sensoriales, contactando con la membrana otoconial únicamente los quinetocilios (Sans, 1993). Sobre su superficie superior se encuentran cristales de carbonato cálcico que se denominan otoconias (Fig. 8). Las cúpulas están ancladas por sus extremos inferiores a las células de soporte de las crestas mediante finos filamentos. Por el extremo superior se fijan al techo de las ampollas, de manera que se forma un tabique que es flexible y permite el flujo de endolinfa en algunos puntos (Sans y Raymond, 1985). Al igual que en las máculas, los quinetocilios de las células sensoriales de las crestas contactan con la superficie inferior de las cúpulas (Sans y Raymond, 1985; Sans, 1993).





**Figura 7:** Esquema de un corte transversal de una ampolla vestibular. En su interior se observa el epitelio sensorial (cresta) recubierto por la cúpula.



**Figura 8:** Esquema de un corte transversal del utrículo o el sáculo vestibulares. En su interior se observa el epitelio sensorial (mácula) recubierto por la membrana otoconial.

## 2. INERVACION DEL VESTIBULO

El vestíbulo, al igual que la cóclea, recibe tres tipos de inervaciones: aferente, que proyecta al sistema nervioso central, eferente, proveniente del sistema nervioso central, y simpática.

### 2.1. INERVACION AFERENTE

Las neuronas aferentes son bipolares. Sus cuerpos celulares se encuentran en el ganglio vestibular o de Scarpa, que realmente está constituido por dos masas ganglionares independientes situadas en segmentos distintos del conducto auditivo interno. Las neuronas de la masa ganglionar superior proyectan a las crestas ampulares de los conductos semicirculares superior y lateral, a la mácula utricular y a una parte de la mácula sacular. Mientras que las de la inferior proyectan a la cresta del canal semicircular posterior y a una parte de la mácula sacular (Kahle, 1995).

Los axones de las neuronas aferentes forman el nervio vestibular y proyectan a los núcleos vestibulares, en el tronco cerebral (Brodal, 1981; Sans y Raymond, 1985). Las dendritas vestibulares aferentes contactan con la base de las células ciliadas. Las terminaciones que contactan con las células ciliadas tipo I las envuelven formando cálices. Entre las células ciliadas tipo I y estas dendritas se constituyen sinapsis conjugadas, es decir, la célula ciliada libera un neurotransmisor por su zona basal que actúa sobre la fibra aferente, y la dendrita libera un neurotransmisor en la zona apical que actúa sobre la célula ciliada. Las terminaciones aferentes que proyectan a las células ciliadas tipo II son de tipo botón terminal (Sans y Raymond, 1985; Sans, 1993; Lysakowski y Goldberg, 1997; Ross, 1997) (Fig. 9).

## 2.2. INERVACION EFERENTE

Las fibras nerviosas eferentes que alcanzan los receptores vestibulares tienen sus cuerpos celulares en el tronco cerebral, distribuidos bilateralmente en una región localizada entre los núcleos vestibulares y abducens (Gacek y Lyon, 1974; Warr, 1975; Goldberg y Fernández, 1980; White y Warr, 1983; Dechesne y cols., 1984; Shumilina y cols., 1986; Schwarz y cols., 1986; Parker y cols. 1988; Perachio y Kevetter, 1989; Tanaka y cols., 1989; Ohno y cols. 1991; Marco y cols., 1996).

Los axones del sistema eferente vestibular (SEV) contactan en el receptor periférico, con los cálices de las aferentes que envuelven las células ciliadas tipo I y/ o con el polo basal de las células ciliadas tipo II (Brodal, 1981; Sans y Raymond, 1985; Sans, 1993; Lysakowski y Goldberg, 1997) (Fig. 9).

El papel funcional del SEV no ha sido aclarado aún, aunque se ha sugerido que tiene un efecto modulador sobre la vía aferente, actuando sobre las células ciliadas tipo II o sobre los cálices aferentes. Sin embargo, aún se discute si su efecto es inhibitorio o activador, ya que se han obtenido resultados opuestos en distintas especies (Sans y Raymond, 1985).

## 2.3. INERVACION SIMPATICA

Las fibras simpáticas que proyectan al vestíbulo, al igual que las que proyectan a la cóclea, tienen una distribución periférica doble. Un grupo se localiza alrededor de los vasos sanguíneos y otro es independiente de éstos y termina bajo los epitelios sensoriales de las máculas y las crestas. Estas fibras se identificaron inicialmente usando el método de histofluorescencia de Falck y Hillarp (Spoendlin y Lichtensteiger, 1966; Terayama y cols., 1973; Densert, 1975b), y mediante microscopía electrónica (Spoendlin y Lichtensteiger, 1966; Densert, 1975b). Posteriores estudios inmunocitoquímicos, tanto a microscopía óptica y electrónica, (Hozawa y Kimura, 1989; Ylikoski y cols., 1989; Hozawa y cols., 1991; Hozawa y Takasaka, 1993a) mostraron la presencia de fibras inmunorreactivas cuando se

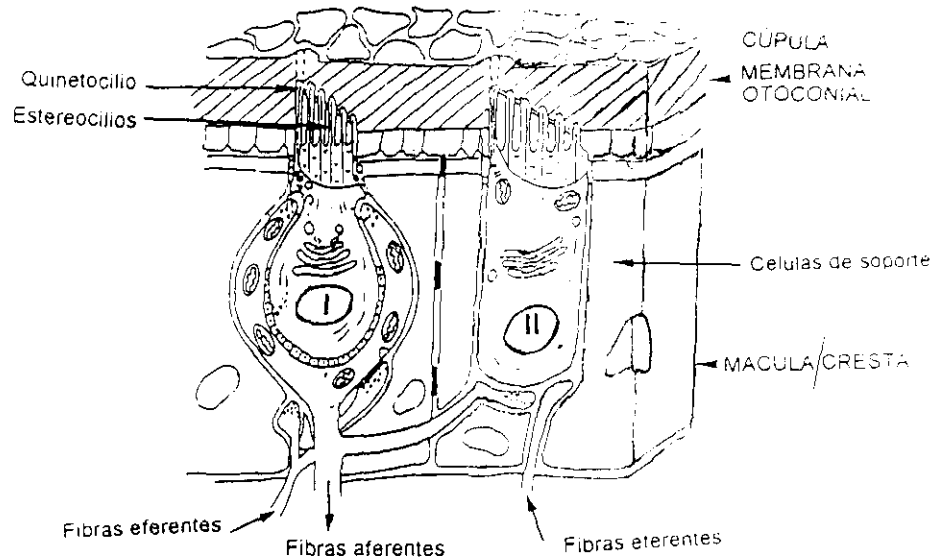
utilizaron anticuerpos contra TH y DBH en ambas localizaciones periféricas, lo cual corrobora la distribución doble de las fibras simpáticas vestibulares. Recientemente, también se ha observado una inmunoreactividad similar en el saco endolinfático (Hozawa y cols., 1991; Hozawa y Takasaka, 1993b).

El origen de estas fibras se ha establecido en el GCS ipsilateral. Así lo demuestran los estudios realizados tras simpatectomía quirúrgica (Terayama y cols., 1973; Densert, 1975b; Hozawa y Kimura, 1989), y el empleo de un anticuerpo contra DBH como trazador retrógrado (Hozawa y Kimura, 1989).

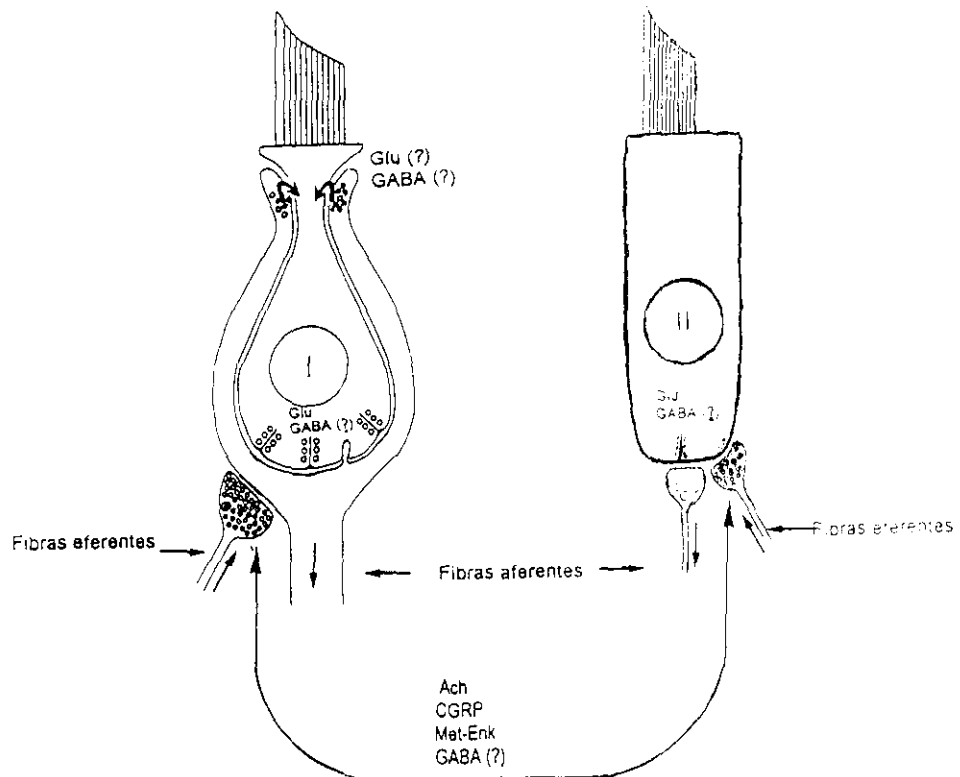
### 3. NEUROTRANSMISORES DEL VESTIBULO

El neurotransmisor implicado en las sinapsis entre las células ciliadas y las fibras aferentes parece ser un neurotransmisor excitador como el glutamato y/o el aspartato (Demêmes y cols., 1984, 1990; Sans, 1993; Harper y cols., 1995; Fujita y cols., 1994; Smith y Darlington, 1996; Usami y Ottersen, 1996). Por otra parte, el neurotransmisor liberado por las fibras aferentes y que actúa sobre las células ciliadas también podría ser el glutamato (Sans, 1993) (Fig. 10).

Los principales neurotransmisores identificados, mediante inmunocitoquímica o hibridación in situ, en los cuerpos celulares de las neuronas eferentes vestibulares y en sus proyecciones periféricas son la ACh (Warr, 1975; Goldberg y Fernández, 1980; Godfrey y cols., 1984; Schwarz y cols., 1986; Perachio y Kevetter, 1989; Ohno y cols., 1991; McLamb y Park, 1992; Usami y cols., 1995; Smith y Darlington, 1996), y el péptido CGRP (Perachio y Kevetter, 1989; Silverman y Kruger, 1989; Tanaka y cols., 1989; Ohno y cols., 1991; Wackym y cols., 1991a, 1991b; Matsubara y cols., 1995; Usami y cols., 1995; Marco y cols., 1996; Scarfone y cols., 1996; Smith y Darlington, 1996). También se ha descrito la presencia de Met-enkefalina, y el ARNm que la codifica, en las neuronas eferentes vestibulares (Perachio y Kevetter, 1989; (Ryan y cols., 1991b) (Fig. 10).



**Figura 9:** Esquema de los epitelios sensoriales del vestíbulo y de su inervación. Se distinguen dos tipos de células sensoriales: de tipo I y de tipo II. Las terminaciones aferentes que contactan con las primeras tienen forma de cáliz, mientras que las que contactan con las células de tipo II tienen forma de botón (modificado de Sans, 1993).



**Figura 10:** Esquema de los neurotransmisores localizados en el receptor vestibular. Las células sensoriales liberan glutamato (Glu), que activa las neuronas aferentes. Las fibras eferentes contienen: acetilcolina (ACh), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y Met-enkefalina (Met-Enk). El ácido gamma-aminobutírico (GABA) ha sido descrito por distintos autores en las células sensoriales, las dendritas aferentes y las fibras eferentes. Las dendritas aferentes tipo I liberan Glu y/o GABA por su zona apical como mecanismo de retrocontrol.

La localización de GABA o su enzima de síntesis en la periferia vestibular resulta mucho más confusa. En distintos mamíferos se observa inmunorreactividad positiva en las células ciliadas, los cálices aferentes o en las fibras eferentes (Usami y cols., 1987; López y cols., 1990; 1992; Matsubara y cols., 1995; Smith y Darlington, 1996) (Fig. 10).

#### **4. LAS MONOAMINAS EN EL VESTIBULO**

Los estudios inmunocitoquímicos mencionados en el apartado anterior destinados a identificar las enzimas implicadas en la síntesis de NA (Hozawa y Kimura, 1989; Ylikoski y cols., 1989; Hozawa y cols., 1991; Hozawa y Takasaka, 1993a, 1993b) permiten sugerir la presencia de este neurotransmisor en las fibras simpáticas vestibulares, sin descartar la presencia de DA. A diferencia de la NA, en el momento actual, no existe ninguna evidencia de la presencia de DA o 5-HT en el vestíbulo.

#### **5. FISILOGIA VESTIBULAR**

El vestíbulo transforma las aceleraciones a las que se encuentra sometido un organismo en un mensaje neural que es enviado al sistema nervioso central, obteniéndose información de la posición estática de la cabeza, así como de sus desplazamientos. Las aceleraciones lineales estimulan las máculas, mientras que las aceleraciones angulares estimulan las crestas.

Los movimientos de la cabeza producen el desplazamiento de la endolinfa que se encuentra en el interior del laberinto membranoso vestibular. Este desplazamiento a su vez genera el desplazamiento de las cúpulas y las membranas otoconiales arrastrando los estereocilios de las células ciliadas (Sans y Raymond, 1985; Sans, 1993). El desplazamiento de los estereocilios hacia el quinetocilio conlleva la apertura de canales iónicos en la superficie apical de las células ciliadas y su activación (Pickles y Corey, 1992). Esta activación se traduce en la liberación

de un neurotransmisor (glutamato y/o aspartato) por el polo basal de las células ciliadas (Sans y Raymond, 1985; Sans, 1993).

El neurotransmisor liberado por las células ciliadas actúa sobre receptores específicos en la membrana de las dendritas aferentes produciendo su despolarización y la transmisión del mensaje a los núcleos vestibulares (Sans y Raymond, 1985; Sans, 1993). Desde estos núcleos parten proyecciones a distintos centros nerviosos: la médula espinal, el cerebelo, la corteza cerebral a través del tálamo, los núcleos oculomotores y la formación reticular (Brodal, 1981; Sans y Raymond, 1985).

A su vez, estos centros nerviosos envían información a los núcleos vestibulares. Y al igual que en la cóclea, existe un sistema de retrocontrol procedente de los núcleos vestibulares eferentes (Brodal, 1981; Sans y Raymond, 1985). Además se ha sugerido la existencia de un segundo sistema de control local debido a la liberación de un neurotransmisor por las propias dendritas aferentes, el cual modula el estado de las células ciliadas (Sans, 1993).

## **IV. LAS MONOAMINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO**

En la presente Memoria de Tesis Doctoral se analizan tres monoaminas: dos catecolaminas, la DA y la NA, y una indolamina, la 5-HT. En este apartado se expone el metabolismo de estos compuestos y su modo de actuación en el sistema nervioso.

### **1. LAS CATECOLAMINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO**

#### **1.1. BIOSINTESIS Y SECRECIÓN**

En las neuronas dopaminérgicas la DA (3,4-dihidroxifeniletilamina) se sintetiza a partir del aminoácido tirosina circulante, el cual se obtiene de la dieta o del metabolismo hepático de la fenilalanina. La enzima TH, que es el paso limitante

sujeto a regulación, convierte la tirosina en dihidroxifenilalanina (L-DOPA), la cual es transformada en DA mediante la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AAD). En las neuronas noradrenérgicas la DA es posteriormente convertida en NA ( $\beta$ -hidroxi-3,4-dihidroxifeniletilamina) mediante la enzima DBH (Miras-Portugal, 1985a; Costentin, 1988; Alonso-Solis, 1993) (Fig. 11).

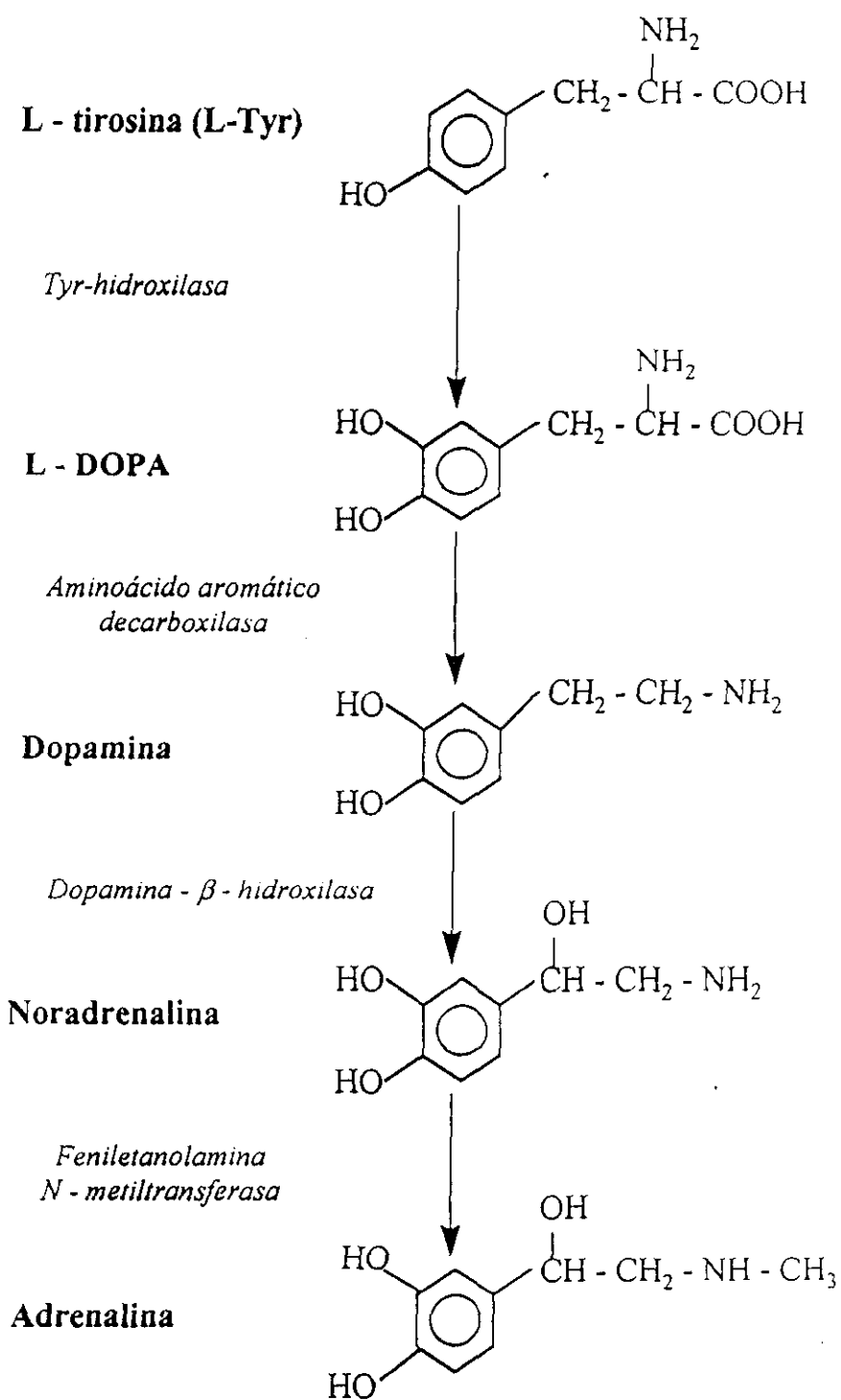
La DA es sintetizada mediante enzimas citosólicas y almacenada en vesículas sinápticas. En esas vesículas se realiza la transformación de DA en NA en las neuronas noradrenérgicas. Las vesículas sinápticas migran a lo largo de los axones hasta los botones terminales. Cuando estas neuronas son despolarizadas, las vesículas sinápticas se fusionan con la membrana plasmática y el neurotransmisor es liberado a la hendidura sináptica (Miras-Portugal, 1985a, 1985b; Alonso-Solis, 1993).

## 1.2. ACCION POSTSINAPTICA

Las catecolaminas liberadas al espacio sináptico actúan sobre receptores específicos localizados en la membrana de la neurona postsináptica. En la actualidad se distinguen cinco tipos de receptores dopaminérgicos (D1, D2<sub>S</sub> y D2<sub>L</sub>, D3, D4 y D5 o D1<sub>B</sub>) y cinco tipos de receptores adrenérgicos ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3) dentro de los cuales, a su vez, se han identificado subtipos. Estos receptores presentan diferentes estructuras, perfiles farmacológicos, localizaciones y mecanismos de acción.

Los cinco tipos de receptores dopaminérgicos identificados en la actualidad pueden agruparse en dos subfamilias según sus características estructurales y farmacológicas: receptores tipo D1 (D1 y D5) y receptores tipo D2 (D2, D3 y D4). Todos ellos parecen ser receptores acoplados a proteínas G, ya que su estructura molecular presenta siete  $\alpha$ -hélices transmembrana unidas por lazos intra y extracelulares, el extremo amino terminal extracelular y una cola carboxi-terminal intracelular (Reisine, 1992; Lefkowitz y cols., 1993; O'Dowd, 1993; Strange, 1993;





**Figura 11:** Ruta biosintética de catecolaminas. L-DOPA = L-dihidroxifenilalanina

Strader y cols., 1994). Se ha sugerido que la zona de interacción con las proteínas G implica el tercer lazo intracelular y el extremo carboxi-terminal. Los receptores tipo D1 presentan el tercer lazo intracelular corto y una cola carboxi-terminal larga, mientras que en los tipo D2 el tercer lazo intracelular es largo y la cola carboxi-terminal corta, lo cual refleja el acoplamiento a distintas proteínas G. Los receptores tipo D1 interaccionan con proteínas Gs, que activan la adenilato ciclasa produciendo un aumento de AMPc intracelular. Al contrario, los receptores D2 están acoplados a proteínas Gi, que producen una inhibición de la adenilato ciclasa y por lo tanto una disminución del AMPc intracelular. El mecanismo de transducción de los receptores D3 y D4 aún se encuentra en estudio. Además del efecto sobre la adenilato ciclasa, se han descrito otras vías alternativas de transducción intracelular de la señal que dependen del tipo de receptor (Vallar y Meldolesi, 1989; Grandy y Civelli, 1992; Reisine, 1992; Sibley y Monsma, 1992; Strange, 1993, 1994; Castro y Strange, 1993; Civelli y cols., 1993; Gingrich y Caron, 1993; O'Dowd, 1993; Seeman y Van Tol, 1994; Sokoloff y Schwartz, 1995).

Los receptores adrenérgicos también están acoplados a proteínas G: los  $\beta$ -adrenérgicos a proteínas Gs, los  $\alpha_1$  a proteínas Gq que activan la fosfolipasa C que produce diacilglicerol e inositol trifosfato como segundos mensajeros celulares, y los  $\alpha_2$  a proteínas Gi (Fisher y cols., 1992; Reisine, 1992; Lefkowitz y cols., 1993; Bloom, 1996).

### **1.3. DEGRADACION**

El mecanismo fundamental para finalizar la transmisión monoaminérgica consiste en la recaptación del neurotransmisor mediante proteínas transportadoras específicas. Esta recaptación se realiza desde el espacio sináptico hacia las neuronas presinápticas o las células gliales (Amara y Kuhar, 1993; Giros y Caron, 1993; Lester y cols., 1994). Las catecolaminas, tras ser recaptadas, pueden ser

almacenadas de nuevo en vesículas sinápticas en la neurona presináptica o degradadas obteniéndose metabolitos inactivos. El catabolismo intracelular se lleva a cabo en las mitocondrias mediante la enzima monoamino oxidasa (MAO). Existe además una segunda vía de degradación extraneuronal, que tiene lugar en el espacio sináptico, en la cual está implicada fundamentalmente la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Kopin, 1985; Miras-Portugal, 1985c; Wood y Altar, 1988).

En el catabolismo de la DA, la vía principal de degradación produce ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) como producto de la MAO mitocondrial. La segunda vía extraneuronal tiene como metabolito intermedio la 3-metoxitiramina, producto de la COMT. Ambas vías convergen en la producción de ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético u homovanílico (HVA) en el espacio extracelular (Fig. 12). La existencia de estas dos vías permite considerar la cantidad de DOPAC como un índice de la recaptación presináptica de DA, y la cantidad de HVA como un índice de la degradación total de DA (Jonason y Rutledge, 1968; Kopin, 1985; Westerink, 1985; Saligaut y cols., 1986; Wood y Altar, 1988; Cumming y cols., 1992).

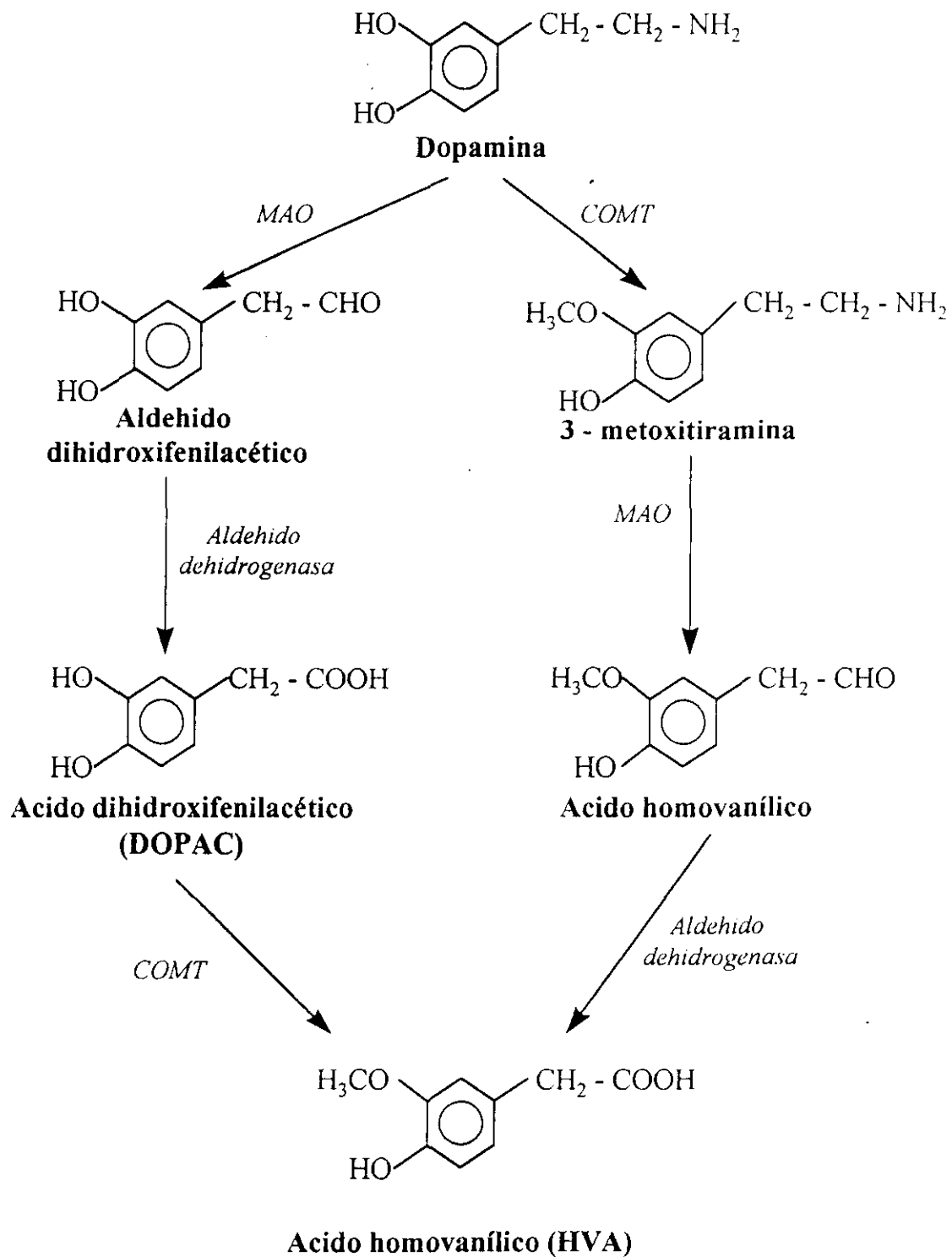
En el catabolismo de la NA, la vía mitocondrial produce como principal producto el ácido 3,4-dihidroxi mandélico (DOMA). Tras la degradación por las vías intra y extraneuronales, los metabolitos finales que se obtienen en mayor concentración a partir de NA son el ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico o ácido vanililmandélico (VMA) y el 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol (MHPG) (Jonason y Rutledge, 1968; Kopin, 1985; Miras-Portugal, 1985c) (Fig. 13).

#### **1.4. REGULACION DE LAS NEURONAS CATECOLAMINERGICAS**

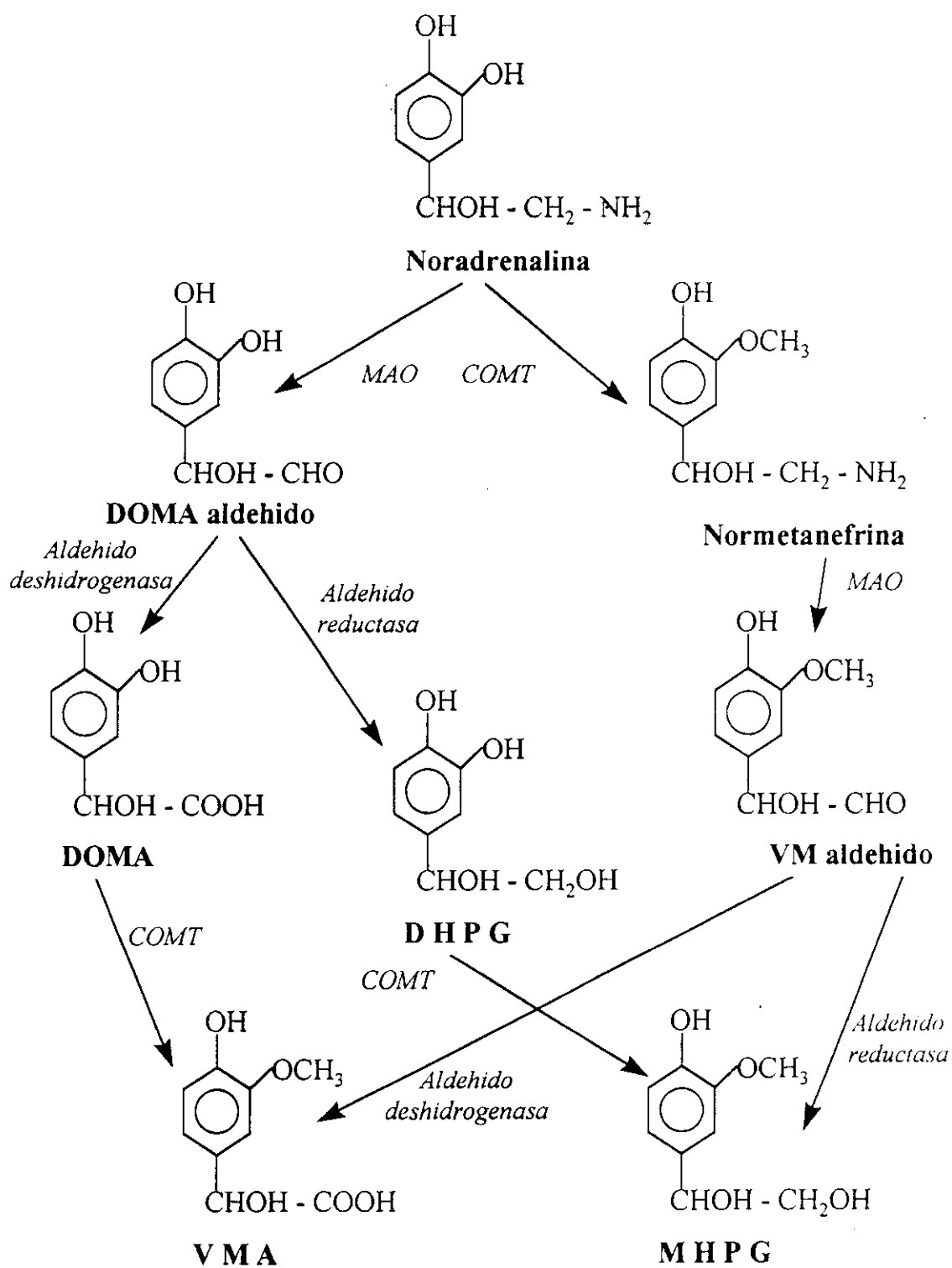
La síntesis y la liberación de catecolaminas depende diversos factores, como son la disponibilidad del precursor, la actividad de las neuronas catecolaminérgicas y las influencias hormonales, de factores de crecimiento y de otros neurotransmisores (Langer, 1981; Chesselet, 1984; Chéramy y cols., 1986; Acworth y cols., 1988; Raynaud y cols., 1988; Alonso-Solis, 1993).

Además, la DA y la NA actúan como inhibidores de la TH. Cuando la concentración de catecolaminas aumenta en el terminal sináptico, debido a una disminución en la actividad de las neuronas catecolaminérgicas y por consiguiente a una disminución en la liberación del neurotransmisor, la síntesis de nuevas moléculas disminuye (Miras-Portugal, 1985a; Alonso-Solis, 1993).

Otro mecanismo de regulación de la síntesis y la liberación de catecolaminas se debe a la existencia de autorreceptores en las membranas presinápticas. Estos autorreceptores son receptores catecolaminérgicos que cuando son activados por el neurotransmisor presente en el espacio sináptico inhiben la liberación y la síntesis de dicho neurotransmisor. Los autorreceptores que se han identificado en las membranas presinápticas de neuronas catecolaminérgicas son: D2 y D3 en las neuronas dopaminérgicas y  $\alpha_2$  en las noradrenérgicas (Farnebo y Hamberger, 1971; Langer, 1977, 1981; Skirboll y cols., 1979; Westfall y cols., 1982; Chesselet, 1984; White y Wang, 1984; Parker y Cubeddu, 1985; Illes, 1986; Galloway y cols., 1986; Altar y cols., 1987; Mayer y cols., 1988; Racké y cols., 1988; Wood y Altar, 1988; Starke y cols., 1989; Bulloch y Starke, 1990; Palij y cols., 1990; Timmerman y cols., 1990; Alonso-Solis, 1993; Civelli y cols., 1993).



**Figura 12:** Ruta catabólica de la dopamina. COMT = catecol-O-metiltransferasa, MAO = monoamino oxidasa.



**Figura 13:** Ruta catabólica de la noradrenalina. COMT = catecol-O-metiltransferasa, DHPG = 3,4-dihidroxifenilglicol, DOMA = ácido 3,4-dihidroxi mandélico, MAO = monoamino oxidasa, MHPG = 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol, VMA = ácido vanililmandélico.

## **2. LA SEROTONINA EN EL SISTEMA NERVIOSO**

### **2.1. BIOSINTESIS Y SECRECION**

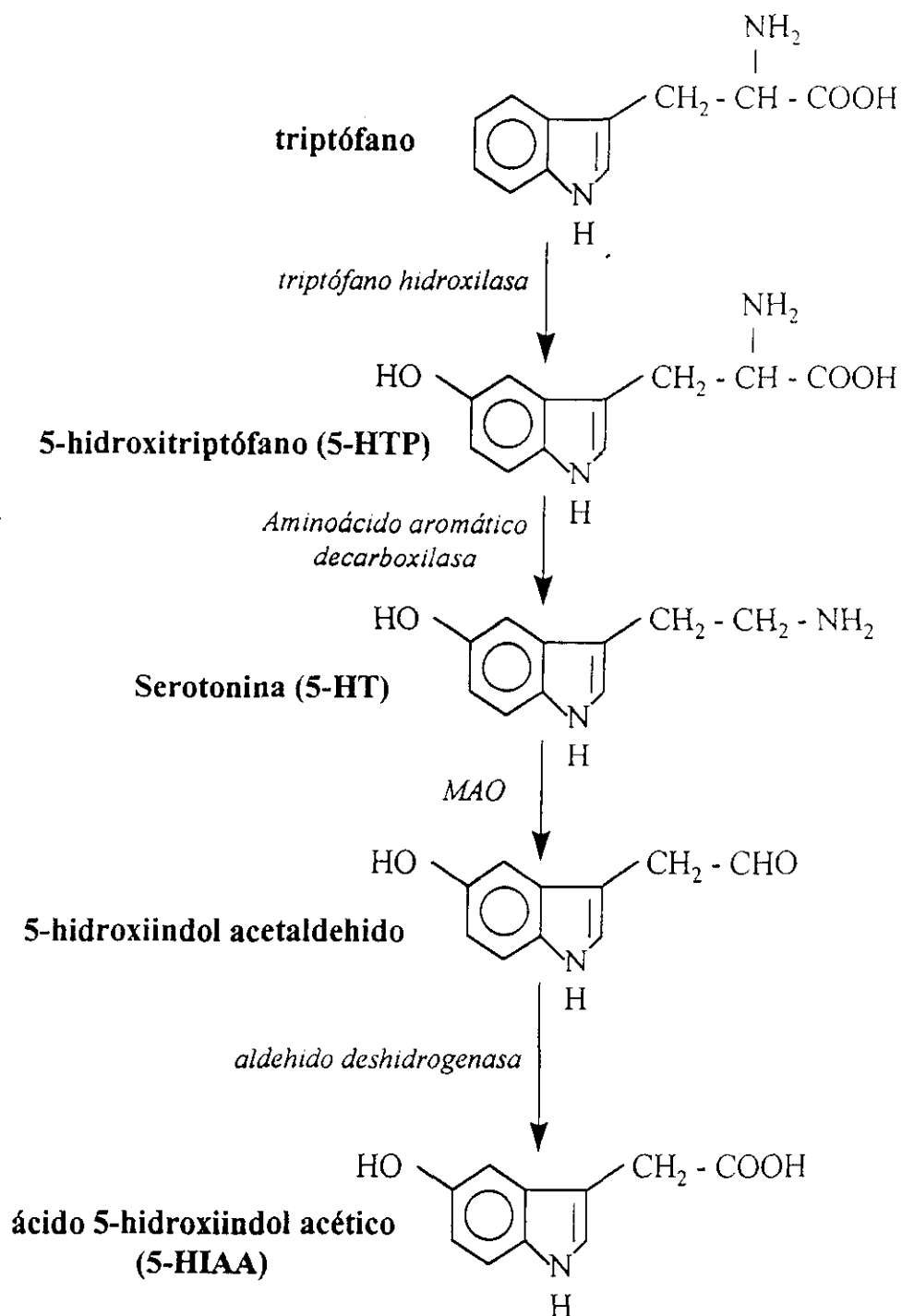
En las neuronas serotoninérgicas la 5-HT es sintetizada a partir de triptófano mediante dos reacciones enzimáticas. La enzima triptófano hidroxilasa, que es el paso limitante sujeto a regulación, transforma el triptófano en 5-hidroxitriptófano, que es descarboxilado y transformado en serotonina mediante la enzima AAD (Culebras-Poza, 1985; Alonso-Solis, 1993; Sanders-Bush y Mayer, 1996) (Fig. 14).

La 5-HT sintetizada es almacenada en vesículas sinápticas. Estas vesículas se fusionan con la membrana plasmática debido a la llegada del impulso nervioso y liberan el neurotransmisor es liberado al espacio sináptico (Culebras Poza, 1985; Alonso-Solis, 1993).

### **2.2. ACCION POSTSINAPTICA**

Como el resto de los neurotransmisores, la 5-HT tras ser liberada al espacio sináptico actúa sobre receptores específicos localizados en la membrana de la neurona postsináptica. Se han descrito varios tipos de receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub>), que a su vez presentan con varios subtipos.

Todos los receptores serotoninérgicos, excepto los 5-HT<sub>3</sub>, tienen la estructura característica de los receptores ligados a proteínas G, es decir presentan siete dominios transmembrana. Los receptores 5-HT<sub>3</sub> son ionotrópicos y presentan cuatro dominios transmembrana en cada una de sus subunidades. Los receptores 5-HT<sub>1</sub> producen una disminución del AMPc intracelular entre otros efectos, los 5-HT<sub>2</sub> utilizan como vía de transducción la formación de inositol trifosfato y diacilglicerol, los 5-HT<sub>3</sub> modifican la permeabilidad catiónica y los 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub>, producen un aumento del AMPc intracelular. Los receptores 5-HT<sub>5A</sub> parecen inhibir la adenilato ciclasa, pero el mecanismo de acción de los receptores 5-HT<sub>5</sub> se encuentra aún en estudio. (Julius, 1991; Fisher y cols., 1992; Hartig y



**Figura 14:** Rutas biosintética y catabólica de la serotonina.



cols., 1992, 1996; Oksenberg y cols., 1992; Reisine, 1992; Hope y cols., 1993; Boess y Martin, 1994; Hoyer y cols., 1994; Martin y Humprey, 1994; Baxter y cols., 1995; Sanders-Bush y Mayer, 1996; Buhot, 1997).

### **2.3. DEGRADACION**

Al igual que las catecolaminas, la mayor parte de la 5-HT liberada al espacio sináptico es captada de nuevo por el terminal presináptico o por las células gliales acompañantes. Este proceso de captación del neurotransmisor se lleva a cabo por un mecanismo activo que implica un transportador localizado en la membrana celular. (Amara y Kuhar, 1993; Giros y Caron, 1993; Lester y cols., 1994).

Tras ser recaptada, la 5-HT puede ser almacenada de nuevo en vesículas sinápticas o degradada en las mitocondrias mediante la MAO, produciéndose como metabolito final ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Se han descrito también otras vías de degradación minoritarias (Saligaut y cols., 1986; Culebras Poza, 1985; Cumming y cols., 1992; Alonso-Solis, 1993; Sanders-Bush y Mayer, 1996).

### **2.4. REGULACION DE LAS NEURONAS SEROTONERGICAS**

De forma similar a las neuronas catecolaminérgicas, la síntesis y la liberación de 5-HT está controlada por distintos mecanismos: la disponibilidad de triptófano, la actividad de las neuronas serotoninérgicas, la concentración intraneuronal de 5-HT y las influencias hormonales, de factores de crecimiento y de otros neurotransmisores (Chesselet, 1984; Culebras Poza, 1985; Alonso-Solis, 1993).

Otro importante mecanismo de regulación de la síntesis y la liberación de 5-HT se basa en la existencia de autorreceptores presinápticos, que inhiben la síntesis y la liberación de 5-HT. Solamente algunos subtipos de receptores 5-HT<sub>1</sub> han sido identificados en las membranas presinápticas funcionando como autorreceptores (Chesselet, 1984; Auerbach y cols., 1989; Starke y cols., 1989; Alonso-Solis, 1993; Starkey y Skingle, 1994; Sanders-Bush y Mayer, 1996).

# **JUSTIFICACION Y OBJETIVOS**

De la Introducción previa se deduce que son numerosos los neurotransmisores que han sido involucrados en la fisiología coclear y vestibular. Entre ellos se distinguen fundamentalmente neurotransmisores que han sido implicados en la transmisión de los mensajes auditivo y del equilibrio hasta el sistema nervioso central, y otros neurotransmisores implicados en la modulación de dichos mensajes.

Las monoaminas dopamina (DA), noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT) actúan como neurotransmisores en diversas áreas del sistema nervioso. Sin embargo los conocimientos que poseemos en la actualidad acerca del papel de estos compuestos en el oído interno son escasos.

De estas tres monoaminas, la NA ha sido la más estudiada, sobre todo mediante técnicas morfológicas, identificándose su localización coclear y vestibular. No obstante, su metabolismo y su fisiología están en fase de estudio. Concretamente, se ha sugerido que pueda participar en el control del flujo sanguíneo del oído interno y en la modulación de las fibras aferentes cocleares, aunque se desconoce si su concentración sufre modificaciones en función de la estimulación sonora.

La presencia de DA en la cóclea fue identificada por primera vez por nuestro grupo mediante técnicas de HPLC (Gil-Loyzaga y Parés-Herbuté, 1986, 1989). Posteriormente la DA ha sido localizada indirectamente, a través de las enzimas implicadas en la síntesis de catecolaminas, en las fibras eferentes cocleares. No obstante, al inicio de esta Memoria de Tesis Doctoral no se conocía ningún papel funcional para la DA, aunque se había sugerido que podía participar en la modulación auditiva.

La serotonina ha sido recientemente localizada en la cóclea por métodos inmunocitoquímicos (Gil-Loyzaga y cols., 1997). Sin embargo, su papel funcional permanece sin dilucidarse.

Por otra parte, la presencia de DA y 5-HT no ha sido descrita previamente en el receptor vestibular.

La presente Memoria pretende avanzar en el conocimiento del papel fisiológico de las monoaminas NA, DA y 5-HT en el oído interno. Sus objetivos concretos son:

1. Desarrollar un método que permita analizar las concentraciones de monoaminas cocleares excluyendo las que provienen del torrente circulatorio.
2. Analizar el efecto que produce la estimulación acústica sobre el metabolismo de estas monoaminas en la cóclea.
3. Analizar la proporción de estas monoaminas que procede del ganglio cervical superior frente a las procedentes de otras fuentes: sistema eferente olivococlear, torrente sanguíneo, ganglio estrellado, etc..
4. Cuantificar las concentraciones basales de estas monoaminas en el vestíbulo.

# **MATERIAL Y METODOS**

## 1. ANIMALES

Los estudios incluidos en la presente Memoria de Tesis Doctoral han sido realizados en dos cepas de ratas: ratas Long-Evans (pigmentadas) y ratas Wistar (albinas). Se han seleccionado dos cepas con distinta pigmentación con el fin de *identificar posibles modificaciones en las concentraciones de monoaminas en el oído interno relacionadas con la pigmentación*. De hecho, en los núcleos cocleares y los núcleos vestibulares se han observado diferencias en las concentraciones de monoaminas entre animales pigmentados y albinos (Cransac y cols., 1996), y en la cóclea estudios previos han descrito diferencias en la concentración de NA (Rarey y cols., 1982). Por otra parte, los animales albinos presentan alteraciones congénitas de la audición (Bock y Steel, 1984; Moore y Kowalchuk, 1988).

Se han empleado animales machos y hembras adultos, de aproximadamente 200 g de peso, que fueron analizados entre las 10:00h y las 12:00h, ya que las hormonas sexuales, la edad y los ritmos circadianos afectan la síntesis, liberación y recaptación de monoaminas en distintas áreas del sistema nervioso (Dluzen y Ramírez, 1985; Esquifino y cols., 1987; Arbogast y Voogt, 1991; Gayrard y cols., 1992; Castner y cols., 1993; Cerrito y cols., 1993; McDermott, 1993; Morissette y Di Paolo, 1993; Pasqualini y cols., 1993; Rastegar y cols., 1993). Asimismo, se ha descrito que la cóclea humana posee mayor longitud en los machos (Sato y cols., 1991) y que tanto el sexo como la edad afectan la actividad coclear (Jerger y Hall, 1980; Church y cols., 1984; Shaw, 1988).

Los animales se obtuvieron de Charles River (USA) o del Animalario Central de la U.C.M.. Hasta ser analizados, fueron estabulados en habitaciones con temperatura controlada ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y ciclos de luz-oscuridad de 12h (luz a partir de las 08:00h). En todo momento tuvieron libre acceso a agua y comida.

En los distintos trabajos incluidos en la presente Memoria de Tesis Doctoral se han empleado un total de 201 animales, que fueron distribuidos en varios grupos según se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Resumen de los animales y procedimientos empleados.

ESTUDIO	ANIMALES
Dopamina en la cóclea: Efecto de la estimulación acústica  Efecto del tratamiento con piribedil	20 machos LE y 20 hembras LE 5 machos y 5 hembras: silencio 5 machos y 5 hembras: 70dB SPL 5 machos y 5 hembras: 90 dB SPL 5 machos y 5 hembras: 110 dB SPL 24 machos LE tratados con piribedil y 24 machos LE tratados con el vehículo 6 tratados y 6 controles: silencio 6 tratados y 6 controles: 70 dB SPL 6 tratados y 6 controles: 90 dB SPL 6 tratados y 6 controles: 110 dB SPL
Noradrenalina en la cóclea: Efecto de la estimulación acústica	24 machos LE* y 24 machos Wistar 6 LE y 6 Wistar sin perfusión aórtica: silencio 6 LE y 6 Wistar sin perfusión aórtica: 90 dB SPL 6 LE y 6 Wistar con perfusión aórtica: silencio 6 LE y 6 Wistar con perfusión aórtica: 90 dB SPL
Dopamina y noradrenalina en la cóclea: Efecto de la GCSx	18 machos LE con GCSx y operación simulada contralateral 6 analizados 4h después de la intervención 6 analizados 24h después de la intervención 6 analizados 6 días después de la intervención 3 machos LE controles
Serotonina en la cóclea Efecto de la estimulación acústica  Efecto de la GCSx	24 machos LE* 6 sin perfusión aórtica: silencio 6 sin perfusión aórtica: 90 dB SPL 6 con perfusión aórtica: silencio 6 con perfusión aórtica: 90 dB SPL 24 machos LE con GCSx y operación simulada contralateral 12 analizados 24h después de la intervención 12 analizados 6 días después de la intervención
Monoaminas en el vestíbulo	5 machos LE, 5 hembras LE 5 machos Wistar y 5 hembras Wistar

\* indica el mismo grupo de animales

LE: Long-Evans

GCSx: ganglionectomía cervical superior

## **2. TRATAMIENTO CON PIRIBEDIL**

El tratamiento con piribedil ((metilen-dioxi-3-4-bencil)-4-piperacilil-1)-2-pirimidina) (laboratorios SERVIER, Francia) se realizó mediante una única inyección de 20mg/Kg por vía intraperitoneal. El piribedil es un agonista dopaminérgico que lleva utilizándose en clínica desde hace tiempo aunque su mecanismo de acción no está completamente dilucidado. La dosis seleccionada es relativamente baja y se ha descrito que dicha dosis probablemente sólo actúa sobre los receptores presinápticos (Corrodi y cols., 1972; Costall y Naylor, 1973; Ladinsky y cols., 1974; Kelly y Naylor, 1975).

El piribedil se disolvió en agua destilada a una concentración de 20mg/ml. El volumen de administración fue 1ml/Kg. Los animales control recibieron el mismo volumen del vehículo correspondiente.

Se comprobó que ni el piribedil, ni tres de sus metabolitos, S-584, S-3284 y S-3473 (laboratorios SERVIER, Francia), eran detectados por el sistema cromatográfico de medida.

## **3. GANGLIONECTOMIA CERVICAL SUPERIOR**

El ganglio cervical superior izquierdo fue extirpado totalmente en animales de dos meses de edad, y en el lado derecho se realizó una simulación de la operación. Las dos cócleas fueron procesadas 4h, 24h o 6 días después de la intervención. Las dos cócleas de tres animales sin intervención quirúrgica se emplearon como controles externos, sin ningún tipo de manipulación.

La intervención se llevó a cabo bajo anestesia general con tribromoetanol (25 mg/ml; 1ml/100g peso). Al ganglio se accede a través de una incisión ventral en el cuello que permite localizar las glándulas salivares. Dichas glándulas se retiran dejando al descubierto los músculos del cuello. Se realiza una incisión en dichos músculos, con control al microscopio estereoscópico, hasta observar la bifurcación de la arteria carótida común. El ganglio cervical superior se localiza entre las ramas



interna y externa de dicha arteria. En el lado izquierdo se extirpa el ganglio, y en el derecho se realizan todas las manipulaciones excepto la extirpación, para someter ambos lados al mismo tipo de stress quirúrgico (Arce, 1994).

Los animales en los que la ganglionectomía es total presentan: 1) ptosis palpebral ipsilateral en las primeras 12 horas siguientes a la intervención, 2) retracción palpebral ipsilateral entre las 12 y las 30 horas después de la operación, y 3) ptosis palpebral ipsilateral irreversible a partir de las 30 horas posteriores a la intervención (Arce, 1994). Los animales que no presentaron estos signos fueron descartados del estudio por considerar que se les había practicado solamente una ganglionectomía parcial.

#### **4. ESTIMULACION ACUSTICA**

La estimulación acústica se realizó en una cabina insonorizada diseñada específicamente para nuestro laboratorio. Dicha cabina insonorizada está construida con panel acústico Stoc ST-PA-80, formado por una chapa galvanizada de 1,2 mm, dos paneles acústicos de lana mineral de 80 mm de espesor, y terminado interiormente con una chapa galvanizada perforada. La base está formada por una chapa de 5 mm de espesor. El interior está recubierto con espuma de poliuretano en forma de pirámide de 50 mm de altura total. La puerta de acceso es una puerta acústica, con doble cierre de presión y junta para realizar un cierre hermético. La cabina se encuentra montada sobre cuatro amortiguadores de muelle de cuero para evitar la transmisión de las frecuencias graves. Esta cabina está colocada en una habitación con doble pared y aislamiento acústico entre ambas. En estas condiciones la intensidad de sonido que se detecta en su interior es menor de 20dB SPL (determinados con un sonómetro SI-131A, Promax). Esta es la situación que consideramos como silencio en nuestros estudios.

Los animales fueron sometidos a ruido blanco (ruido que incluye frecuencias desde 200 hasta 10.000Hz) de distintas intensidades: 70, 90 o 110dB SPL, o

mantenidos en silencio durante una hora. El ruido blanco fue producido por un generador de funciones Elit 815 (Italia) conectado a un amplificador Technics SU-VZ220 (Japón). Este procedimiento se llevó a cabo bajo anestesia general con uretano al 28% (p/v) por vía intraperitoneal (0,7ml / 100g peso).

Los animales a los que se extrajeron los vestíbulos fueron mantenidos en silencio durante la hora previa a la obtención de las muestras. Este proceso se realizó para evitar posibles interferencias del ruido en la fisiología vestibular, lo cual ha sido descrito previamente (Cazals, 1983; Cazals y cols., 1983, 1987).

En el estudio en que se analiza el efecto del tratamiento con piribedil, los animales fueron sometidos a silencio o estimulación acústica una hora después de la administración del fármaco. Mientras que los animales a los que se practicó la ganglionectomía fueron mantenidos en silencio durante una hora antes de la extracción de las cócleas.

## **5. PERFUSION INTRACARDIACA**

Debido a la elevada concentración de 5-HT presente en la sangre y fundamentalmente en las plaquetas (Anderson y cols., 1987; Kumar y cols., 1990; Pussard y cols., 1996) desarrollamos un método para cuantificar las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA cocleares no procedentes del torrente circulatorio, el cual consistió en someter a los animales a perfusión aórtica para eliminar la sangre que irriga la cóclea.

Se analizaron distintas condiciones de perfusión: 1) temperaturas de 37, 26 o 40°C, 2) flujos de 120, 55 o 4,5 ml/min con bomba peristáltica o caída por gravedad, 3) tiempos de 10, 8, 4 y 2 min, 4) clampado de la aorta descendente y 5) disoluciones compuestas por ácido perclórico, cloruro sódico al 0,9%, tampón fosfato salino (PBS) 0,1M (pH=7,4) o tampón citrato 0,1 M con 20g/l de glucosa (pH=7,4 o 4,8). En estas distintas condiciones se analizaron tres parámetros: 1) la presencia de sangre en las arterias estapediales, que bordean el estribo del oído

medio, y en el cerebro, 2) la existencia de alteraciones orgánicas, debidas a la perfusión (por ejemplo, edemas generalizados), en los animales y 3) las concentraciones cocleares de 5-HT y 5-HIAA. Los resultados de estos análisis se exponen y discuten en los epígrafes I de los apartados correspondientes a Resultados y Discusión respectivamente. A continuación se relata el método seleccionado tras estos análisis y que fue empleado en los trabajos que constituyen las publicaciones 5 y 6.

La perfusión se llevó a cabo bajo anestesia general con uretano al 28% (p/v) por vía intraperitoneal (0,7ml / 100g), al término de la estimulación acústica. Se realizó con una solución tamponadora compuesta por ácido cítrico-citrato sódico (Merck) 0,1M (pH=4,8) que contiene 20g/l de glucosa (Merck), preparada con agua procedente de un sistema Milli-Q 185 Plus (Millipore). Esta solución se ha empleado como anticoagulante en la recogida de muestras sanguíneas en las que se analizaron las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en los distintos compartimentos sanguíneos (Kumar y cols., 1990; Li Kam Wa y cols., 1995). La perfusión se realizó a través de la arteria aorta, con la salida del líquido por la aurícula derecha y clamando la aorta descendente. El líquido de perfusión se administró mediante una bomba peristáltica a un flujo de 4,5ml/min, durante 2 minutos, y a 26°C.

## **6. RECOGIDA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS**

Después de una hora de estimulación acústica o silencio, aún bajo anestesia general, los animales fueron sacrificados por decapitación y las dos cócleas o los dos vestíbulos fueron extraídos rápidamente (menos de 1,5 minutos las dos muestras). Las muestras se recogieron por separado en ácido perclórico (Merck) 0,2M frío (200µl para las cócleas y 400µl para los vestíbulos), y se trituraron con ayuda de una varilla metálica recubierta de plástico. El ácido perclórico produce la desnaturalización de las enzimas, congelando así las reacciones que éstas

catalizan, lo que permite disminuir el error debido al catabolismo no asociado con el experimento.

Las muestras fueron sonicadas para terminar de romper el hueso modiolar en el que se alojan las fibras nerviosas, así como las membranas celulares. De este modo conseguimos que las monoaminas y sus metabolitos pasen a la disolución. Los tubos fueron centrifugados (11.000rpm / 4°C / 10 min para las cócleas y 12.000rpm / 4°C / 15 min para los vestíbulos). En el sedimento quedan los restos membranosos y en el sobrenadante distintos compuestos entre los que se encuentran las monoaminas y sus metabolitos.

Los sobrenadantes fueron filtrados a través de membranas hidrófilas Millex GV-4 (Millipore) de 0,22 µm de tamaño de poro y congelados a -80°C, durante no más de tres días. Para llevar a cabo la determinación bioquímica, los sobrenadantes fueron descongelados a 4°C durante 30min e inyectados en el sistema *cromatográfico*.

Tanto la temperatura como la luz provocan la degradación de las monoaminas y sus metabolitos observándose en los cromatogramas la aparición de picos no identificados y la disminución del área de los picos correspondientes a los compuestos que nos interesan (Eriksson y Persson, 1982; Palazzolo y Quadri, 1990; Yi y Brown, 1990). Por lo tanto todas las manipulaciones que se realizan hasta el momento de la determinación bioquímica deben ser rápidas y las muestras deben estar en todo momento protegidas de la luz y en frío.

## **7. DETERMINACION BIOQUIMICA**

Para determinar las concentraciones de monoaminas y sus metabolitos presentes en los distintos sobrenadantes cocleares y vestibulares se ha elegido como sistema de medida la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección electroquímica (HPLC-ED). Este método fue introducido en 1973 en la determinación de monoaminas (Kissinger y cols., 1973). Y hoy en día se ha

impuesto frente a los métodos utilizados anteriormente (detección fluorimétrica, cromatografía de gases-espectrometría de masas y radioinmunoensayos) por las ventajas que presenta: mayor sensibilidad, facilidad de manejo y aplicabilidad a todas las monoaminas y sus metabolitos (Kempf y Mandel, 1981; Parés-Herbuté y cols., 1989; Matsumoto y cols., 1990).

La cromatografía es un método bioquímico que permite identificar compuestos presentes en una disolución compleja tras una separación previa de los mismos. Para una determinación cromatográfica adecuada deben por tanto ajustarse dos parámetros: las condiciones de separación y las condiciones de detección. Asimismo, cuando se emplea la cromatografía no solo con fines cualitativos sino además cuantitativos, debe establecerse un método de cuantificación adecuado. Estos tres parámetros serán analizados en los epígrafes siguientes.

## **7.1. MODO CROMATOGRÁFICO DE SEPARACION**

La separación en un sistema de HPLC se lleva a cabo en una columna. En ella los compuestos son retenidos más o menos tiempo en función de su interacción con la fase estacionaria, que constituye el relleno sólido de la columna, y con la fase móvil líquida que circula por la misma. En la HPLC, el relleno de la columna está finamente dividido y empaquetado de forma compacta, por lo tanto el sistema debe estar provisto de una bomba que ejerza una elevada presión para hacer circular la fase móvil a través de la estacionaria. Las bombas utilizadas en estos estudios fueron: 1) constaMetric R 3200, Milton Roy, USA o 2) 422 Master, Kontron Instruments, España.

El modo cromatográfico seleccionado para los estudios que componen la presente Memoria es la cromatografía de pares iónicos. Esta cromatografía constituye una modificación de la cromatografía en fase reversa. En la cromatografía en fase reversa, el relleno de la columna es apolar y la fase móvil que circula por ella es polar. Por lo tanto, los compuestos más polares son los primeros

que eluyen, quedando más tiempo retenidos en el interior de la columna los compuestos más apolares. Las fases estacionaria y móvil en la cromatografía de pares iónicos son en esencia iguales a la cromatografía en fase reversa. Pero a diferencia de ésta, la cromatografía de pares iónicos incluye en la composición de la fase móvil un compuesto, denominado contraión, que interacciona con los compuestos de la muestra que deseamos analizar constituyendo un par iónico. Asimismo el contraión interacciona con la fase estacionaria y modifica el tiempo de retención de los compuestos a analizar (Yost y cols., 1980).

La columna empleada en estos estudios tiene 150mm de longitud y 4,6mm de diámetro interno. La fase estacionaria es nucleosil 5 C18 100A (Phenomenex, USA). Esta fase está constituida por partículas esféricas de sílice, las cuales tienen un diámetro de 5µm y un tamaño de poro de 100A, con una fase enlazada formada por cadenas hidrofóbicas lineales de 18 carbonos (Kaibara y cols., 1990).

Las fases móviles utilizadas fueron soluciones tampón acetato (Merck) 0,1M / citrato (Merck) 0,1M con EDTA-4Na<sup>+</sup> (Sigma) 0,6mM y 10% (v/v) de metanol (Panreac). El pH de estas fases móviles fue fijado a 4, lo cual permite la retención de los metabolitos ácidos de las monoaminas, que tienen el grupo carboxilo protonado (Nagao y Tanimura, 1989). Como contraión se ha empleado octil sulfato sódico (Sigma). El grupo sulfato presenta carga negativa, la cual interacciona con la carga positiva de los grupos amino de las monoaminas, que se encuentran parcialmente protonados a pH 4 (Mefford y cols., 1987; Nagao y Tanimura, 1989; Husek y Malikova, 1990). La cadena lineal de 8 carbonos del contraión interacciona con las cadenas de 12 carbonos de la fase estacionaria alterando los tiempos de retención de los compuestos a analizar. Para las determinaciones de DA y sus metabolitos, la fase móvil incluye 45mg/l de octil sulfato sódico, mientras que para las determinaciones de NA, 5-HT y 5-HIAA, se utilizaron 200mg/l del contraión. Esta segunda fase móvil, con mayor concentración del contraión, permitió: 1) sacar la NA

del frente de elución al aumentar su tiempo de retención y 2) separar la 5-HT y el 5-HIAA que coelúan parcialmente con 45mg/ml de octil sulfato sódico.

El agua empleada en la preparación de las fases móviles, así como el agua que se utiliza en la preparación de disoluciones que van a ser inyectadas en el cromatógrafo, fue de calidad ultrapura (Milli-Q 185 Plus, Millipore) y fue desgasificada mediante ultrasonidos y vacío, para eliminar burbujas de aire que pueden interferir en el ensayo y dañar la columna. Asimismo el metanol fue de calidad HPLC. La pureza de los disolventes es un factor importante a tener en cuenta para evitar daños en los distintos componentes del sistema cromatográfico. La botella que contiene la fase móvil permaneció cerrada en todo momento para evitar contaminaciones bacterianas que dañarían el sistema, la disolución de gases en la fase móvil y la evaporación del metanol que alteraría los tiempos de retención (Kempf y Mandel, 1981; Eriksson y Persson, 1982).

La elución se llevó a cabo en modo isocrático, es decir sin modificar la composición de la fase móvil a lo largo de la elución. La fase móvil recirculó a la botella de origen, la cual fue cambiada tras medir aproximadamente 50 muestras. El flujo fue fijado a 1ml/min y la presión de trabajo resultante fue de aproximadamente 140 bar. La temperatura de la habitación se mantuvo constante a 20°C. La fase móvil antes de entrar en la columna de separación atraviesa un amortiguador de pulsos (Damper), ya que los detectores electroquímicos son sensibles a los cambios de presión producidos por el movimiento de los pistones de la bomba.

La inyección de las muestras se realizó mediante una válvula manual de dos posiciones (Rheodyne, USA) conectada a un lazo de 50µl. El volumen de inyección fue 150µl, tres veces el volumen del lazo, para asegurarnos de llenar dicho lazo barriendo correctamente las paredes del mismo.

## 7.2. METODO DE DETECCION

La detección de las monoaminas y metabolitos separados por la columna cromatográfica se llevó a cabo electroquímicamente. El sistema empleado se compone de dos células electroquímicas conectadas en serie a la salida de la columna y un detector que amplifica la intensidad de corriente producida en las células y la transforma en una señal eléctrica que es reconocida, en el sistema de registro (registrador, integrador u ordenador) como un pico en un cromatograma.

En las células electroquímicas se fija una diferencia de potencial constante entre el electrodo de trabajo y la fase móvil conductora, produciéndose así la oxidación o reducción de las sustancias electroactivas cuyo potencial redox es menor o igual en valor absoluto al aplicado. Se colocan tres electrodos en serie (uno en la primera célula y dos en la segunda), actuando los dos primeros como filtros, lo cual permite mejorar la selectividad de la detección. En estas células cada electrodo de trabajo lleva asociado un electrodo de referencia normal de hidrógeno (Mefford, 1981; Kilpatrick y cols., 1986).

La primera célula es una célula de acondicionamiento (modelo 5021, ESA Inc., Massachusetts, USA) con un único electrodo de trabajo, en el cual se fijó un potencial negativo (-0,40 o -0,45 V) que permite reducir todas las sustancias con un potencial de reducción menor o igual en valor absoluto a -0,40 o -0,45V respectivamente. Este potencial negativo permite asegurar que todos los compuestos de interés que alcanzan la segunda célula se encuentran en estado reducido y por lo tanto es factible su oxidación y detección.

La segunda célula es una célula analítica (modelo 5011, ESA Inc., Massachusetts, USA) con dos electrodos de trabajo colocados en serie. En el primer electrodo de esta célula se realiza una preoxidación (+0,10 V) de los compuestos que circulan disueltos en la fase móvil. De este modo podemos eliminar posibles interferencias debidas a compuestos que coeluyan con los compuestos en los que estamos interesados pero que posean un potencial redox menor o igual a +0,10V. El



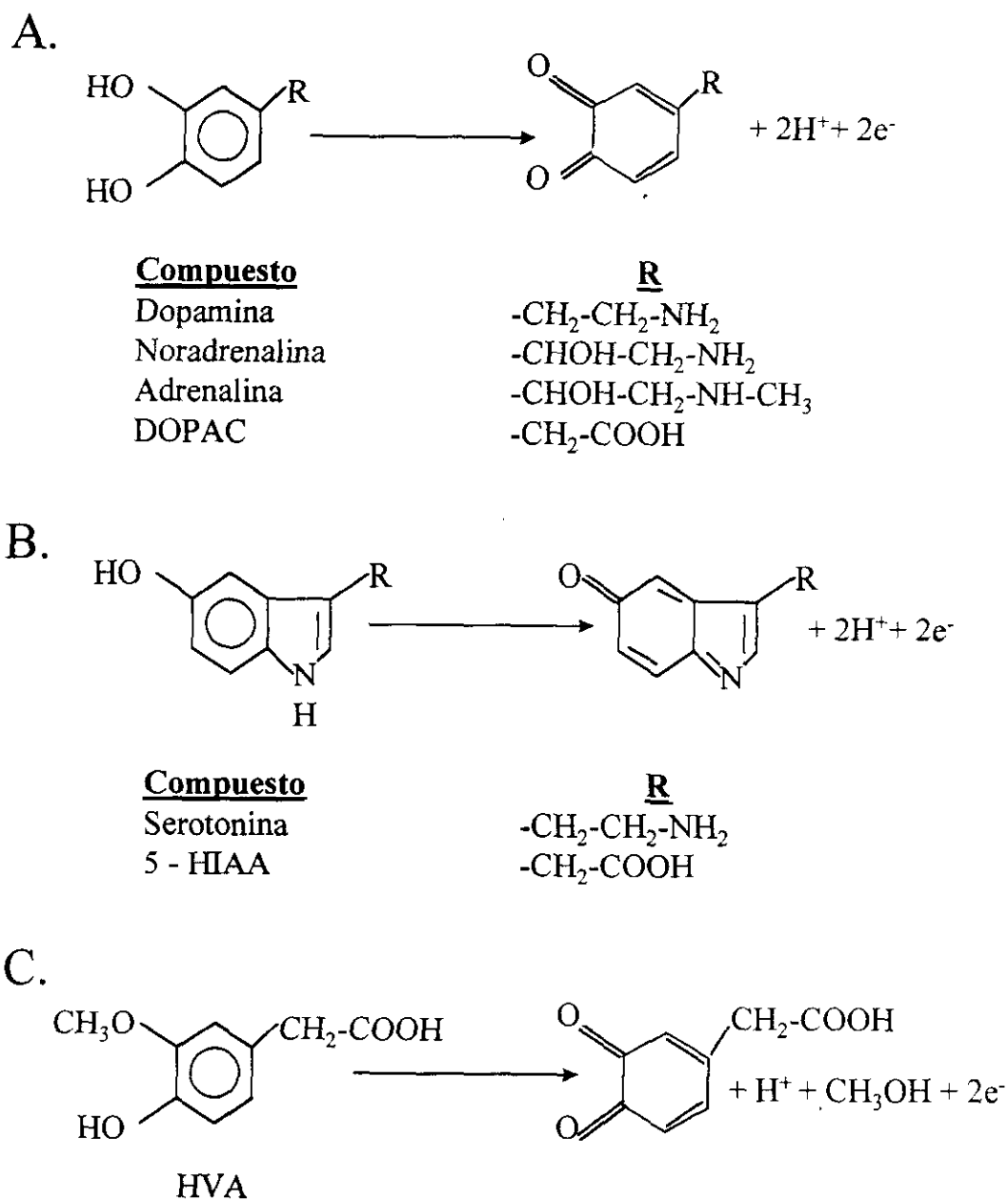
segundo electrodo de la célula analítica es realmente el electrodo de detección que da origen en última instancia al cromatograma. Los potenciales fijados en este electrodo han sido +0,35 o +0,40 V, que son potenciales adecuados para la oxidación de todos los compuestos en los que estamos interesados. En este electrodo se oxidan compuestos con un potencial de oxidación entre +0,10 y +0,35 o +0,40V respectivamente.

Las reacciones de oxidación que sufren las monoaminas y sus metabolitos implican la transferencia de dos electrones al electrodo de trabajo, al tiempo que los catecoles se oxidan a ortoquinonas y los indoles a forma quinona-imina. El producto final de los compuestos vanílicos (HVA) es también una ortoquinona, pero su potencial electroquímico es mayor que el de los catecoles porque la hidrólisis del grupo metoxi requiere mayor energía de activación (Fig. 15) (Kempf y Mandel, 1981; Mefford, 1981; Nagao y Tanimura, 1989).

La intensidad de corriente generada en las células electroquímicas y registrada en el detector es proporcional a la concentración de sustancia que experimenta el proceso redox. La ecuación que rige esta relación fue desarrollada por Levich (1962) y es la siguiente:

$$i_L = KnFVC$$

donde:  $i_L$ =corriente límite (es decir, intensidad máxima obtenible de la oxidación o reducción de una concentración determinada de una especie);  $K$ =constante de la célula, la cual depende del coeficiente de difusión de las especies de interés, de la viscosidad del disolvente y de la geometría y el área del electrodo;  $n$ =número de electrones implicados en la oxidación o reducción de una molécula de las especies implicadas;  $F$ =constante de Faraday;  $V$ =velocidad de la solución que circula por la superficie del electrodo; y  $C$ =concentración de las sustancias electroactivas presentes en la solución. Para compuestos determinados, bajo condiciones isocráticas y a flujo constante,  $n$ ,  $V$ ,  $F$  y  $K$  son constantes, y la ecuación se puede simplificar a:  $i_L = BC$  donde  $B$  es una constante que engloba todas las anteriores.



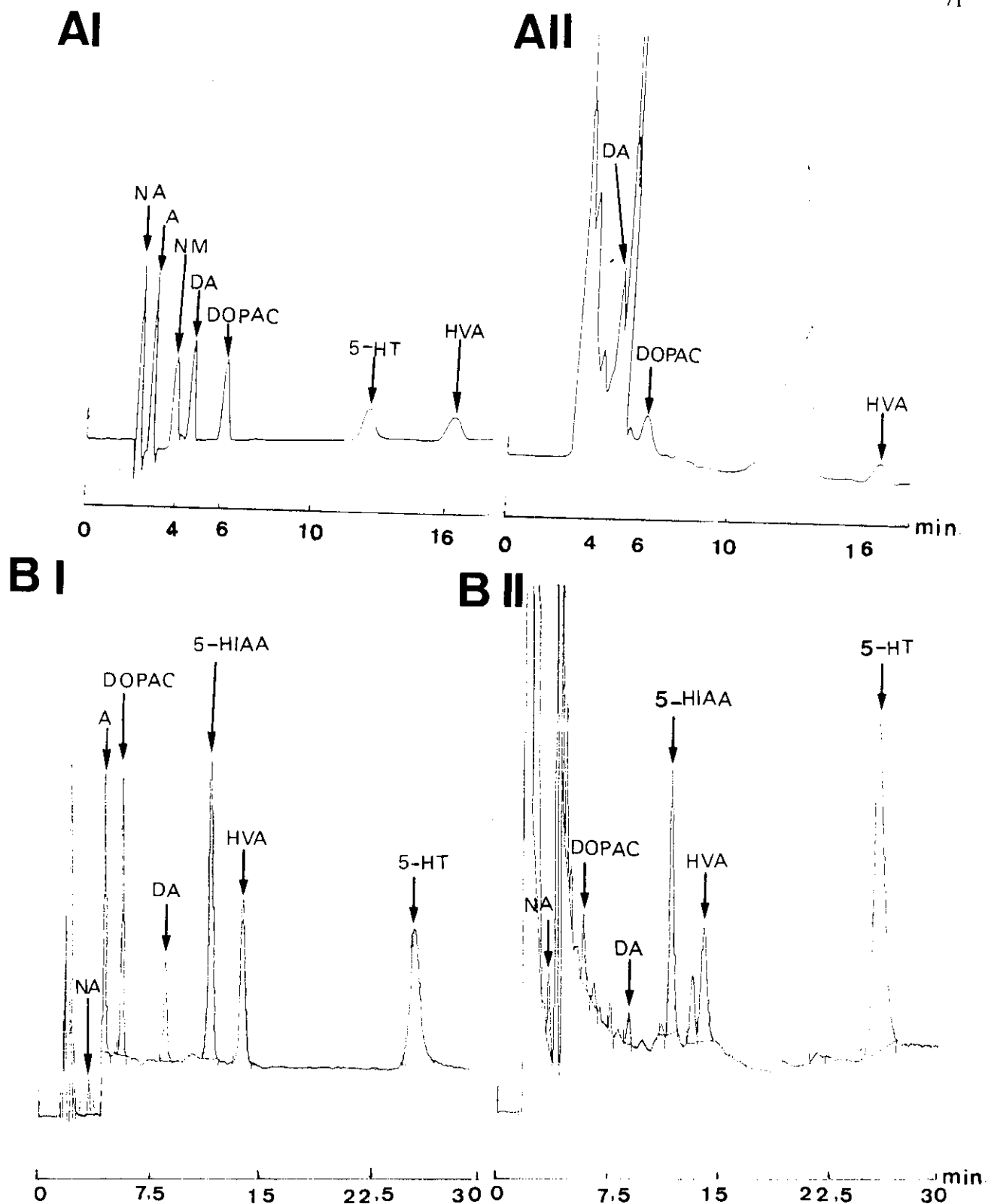
**Figura 15:** Reacciones de oxidación de las monoaminas y sus metabolitos. A) Reacciones de oxidación de los compuestos con anillos catecol. B) Reacciones de oxidación de los compuestos con anillos indol. C) Reacciones de oxidación de los compuestos con anillos catecol O-metilados.

Los detectores electroquímicos empleados en estos estudios fueron: 1) Coulochem 5100A, ESA Inc., USA, 2) Coulochem 5200, ESA Inc., USA o 3) Coulochem II, ESA Inc., USA.

### **7.3. IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE LOS PICOS CROMATOGRAFICOS**

En los distintos estudios se han empleado como sistema de registro: 1) un registrador Knauer, Alemania, 2) un integrador Spectra Physics o 3) un ordenador acoplado a un programa de integración de áreas versión 3.90 (Kontron Instruments, España). Estos sistemas de registro, que se encuentran conectados al detector, dibujan un pico por encima de la línea base cuando una sustancia experimenta un proceso redox en las células electroquímicas. El vértice del pico representa el tiempo de retención del compuesto en la columna, y la altura / área del pico es proporcional a la concentración de dicha sustancia en la solución inyectada (Fig. 16).

La identificación de los picos cromatográficos se realizó en base a su tiempo de retención. Estos tiempos de retención fueron corroborados mediante la coinyección de muestras y soluciones patrón con los compuestos en los que estamos interesados disueltos en una concentración conocida.

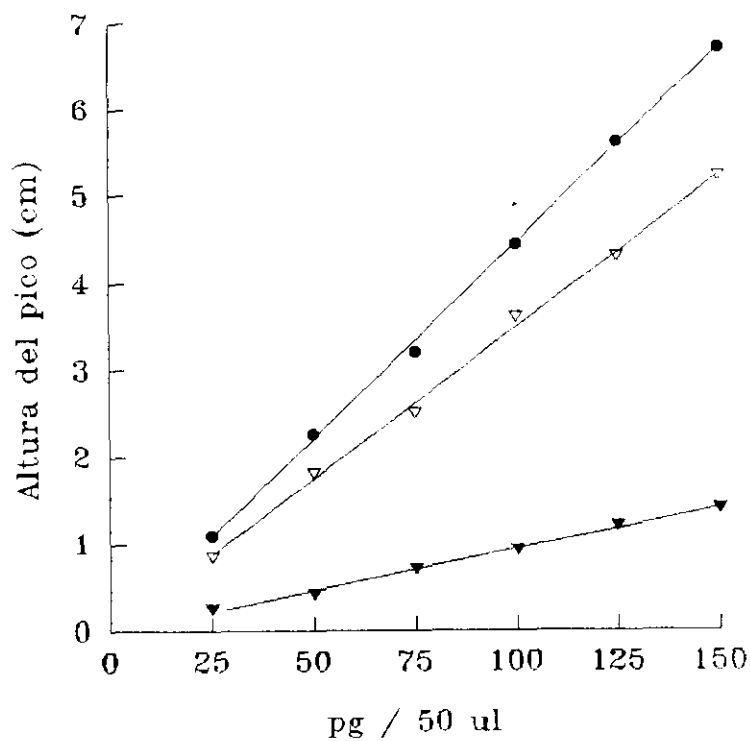
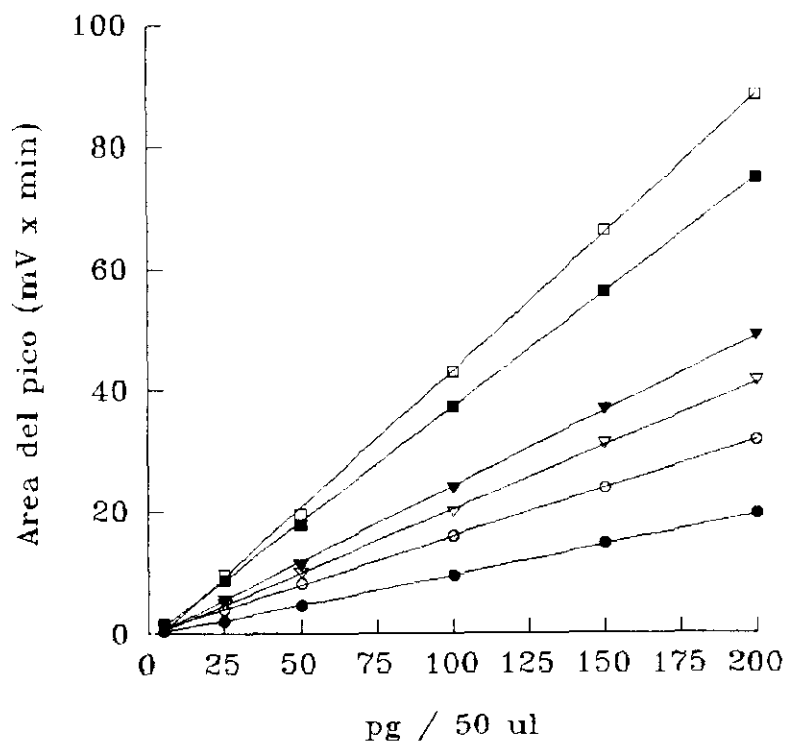


**Figura 16:** Cromatogramas correspondientes a disoluciones patrón de monoaminas (I) o a muestras de cóclea de rata adulta (II). Las fases móviles empleadas en la separación incluyeron 45 mg/l (A) o 200 mg/l (B) de octil sulfato sódico. Tanto en las disoluciones patrón como en las muestras se observa una adecuada separación y detección de las monoaminas y sus metabolitos. NA = noradrenalina, A = adrenalina, NM = normetanefrina, DA = dopamina, DOPAC = ácido 3,4-dihidroxifenilacético, 5-HT = serotonina, HVA = ácido homovanílico y 5-HIAA = ácido 5-hidroxiindolacético.

La cuantificación de las concentraciones de monoaminas presentes en las muestras se llevó a cabo en función de la altura de los picos correspondientes, cuando se empleó un registrador, o de sus áreas, cuando se emplearon un integrador o un ordenador. La cuantificación se realizó por el método del patrón externo, es decir se relacionó directamente la altura/área de un pico en el cromatograma de una muestra con la altura/área de dicho pico en el cromatograma de una solución patrón (reactivos obtenidos de Sigma, excepto HVA que procede de Merck) de concentración conocida. Se ha utilizado este método de cuantificación en lugar del método del patrón interno porque los patrones internos testados presentaron problemas de elución en las condiciones seleccionadas. De este modo, la 3,4-dihidroxibencilamina (Sigma) coelúa con un pico de las muestras no identificado, el ácido 5-hidroxiindol-2-carboxílico (Sigma) coelúa con la DA y la N-metil-5-hidroxitriptamina (Sigma) eluía con un tiempo de retención propio pero por efecto de los ultrasonidos producía metabolitos que coelúan con compuestos de las muestras.

Se han inyectado patrones al principio y al final de cada jornada, comprobándose que no existen variaciones en la señal recibida. El límite de detección de monoaminas y sus metabolitos es del orden de picogramos con este sistema, aunque se observan diferencias en los distintos compuestos analizados (Kempf y Mandel, 1981). La respuesta del detector resultó lineal para todos los compuestos analizados en el rango de concentraciones presentes en las muestras (Fig. 17).

Los resultados han sido expresados en pg de sustancia / cóclea o pg / vestíbulo, ya que tanto la cóclea como el vestíbulo son entidades bien delimitadas. Las concentraciones no se han relacionado respecto a la masa de proteínas o la masa de las muestras porque dichos parámetros se ven muy afectados por la masa de hueso presente en el oído interno, que es variable de unos animales a otros.

**A****B**

○ NE    ● DA    ▽ DOPAC    ▼ HVA    □ 5-HT    ■ 5-HIAA

**Figura 17:** Representación de la linealidad de la respuesta del detector para concentraciones en el rango de las encontradas en las muestras de oído interno. A) Linealidad en la medida de DA, DOPAC y HVA con una fase móvil que contiene 45mg/l de octil sulfato sódico. B) Linealidad en la medida de NA, DA, DOPAC, HVA, 5-HT y 5-HIAA con una fase móvil que contiene 200mg/l de octil sulfato sódico.

## 8. ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico ha sido realizado comparando media  $\pm$  error standard medio, usando el test de la "t" de Student, en los estudios incluidos en las Publicaciones 1, 2, 3, 4 y 7.

En la Publicación 5 se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de tres vías: cepa x perfusión x sonido (2 x 2 x 2). Las interacciones significativas fueron estudiadas mediante un ANOVA de una vía.

En la Publicación 6 se empleó un test de la "t" de Student para comparar las concentraciones cocleares de 5-HT y 5-HIAA presentes en las cócleas denervadas respecto a las no denervadas. Para analizar los efectos de la perfusión aórtica y de la estimulación acústica sobre dichas concentraciones se utilizó un ANOVA de dos vías de grupos independientes: perfusión x sonido (2 x 2). Las interacciones significativas fueron estudiadas mediante un ANOVA de una vía.

# RESULTADOS



# **I. METODO PARA ELIMINAR DE LA COCLEA LA SEROTONINA SANGUINEA MEDIANTE PERFUSION AORTICA**

## **1. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE PERFUSIÓN**

Cuando la disolución de perfusión se empleó a temperatura baja (4°C), fue necesario un mayor tiempo de perfusión para eliminar la sangre de las arterias estapediales y el cerebro. Sin embargo, cuando la temperatura de perfusión fue la fisiológica (37°C), se observó una disminución en la concentración coclear de 5-HT y un aumento en la concentración de su metabolito 5-HIAA, incluso con tiempos de perfusión reducidos (2 min.).

## **2. EFECTO DE LA VELOCIDAD DE PERFUSIÓN**

Cuando se emplearon velocidades de perfusión elevadas (120 ml/min) los animales mostraron edemas marcados de distintos órganos, como la lengua y el timo, y de tejidos blandos, como los músculos intercostales. Sin embargo, cuando la perfusión se realizó por gravedad, fue necesario aumentar el tiempo de perfusión (más de 10 min.) para conseguir eliminar la sangre de las arterias estapediales y el cerebro.

## **3. EFECTO DEL TIEMPO DE PERFUSIÓN**

Cuando se emplearon tiempos de perfusión elevados (8 min.), se observó una disminución en la concentración de 5-HT y un aumento en la concentración de 5-HIAA en la cóclea. Con tiempos de perfusión bajos (2 min. sin clampar la arteria aorta descendente) no se consiguió eliminar la sangre de las arterias estapediales ni del cerebro.

#### **4. EFECTO DEL CLAMPADO DE LA AORTA DESCENDENTE**

Esta maniobra supuso la reducción del tiempo necesario para eliminar la sangre de las arterias estapediales y del cerebro a 2 min.

#### **5. EFECTO DE LA DISOLUCIÓN DE PERFUSIÓN**

El ácido perclórico, como disolución única, produjo la coagulación rápida de la sangre, lo cual impidió llevar a término la perfusión. Cuando el ácido perclórico se administró tras un lavado de la sangre con cloruro sódico al 0,9% o tampón citrato 0,1 M con 20g/l de glucosa (pH=7,4) se observó una reducción en la concentración de 5-HT en la cóclea y un aumento en la de 5-HIAA.

Cuando se perfundieron los animales únicamente con cloruro sódico al 0,9%, tampón citrato 0,1 M con 20g/l de glucosa (pH=7,4) o tampón fosfato salino (PBS) 0,1M (pH=7,4) se detectó también una disminución en la concentración de 5-HT en la cóclea y un aumento en la de 5-HIAA. Sin embargo cuando se empleó en la perfusión tampón citrato 0,1 M con 20g/l de glucosa a pH ácido (4,8) no se observaron esas modificaciones.

## II. LAS CATECOLAMINAS EN LA COCLEA

### 1. EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN ACÚSTICA SOBRE EL METABOLISMO DE LAS CATECOLAMINAS EN LA CÓCLEA

#### 1.1. EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN ACÚSTICA SOBRE EL METABOLISMO DE LA DOPAMINA COCLEAR

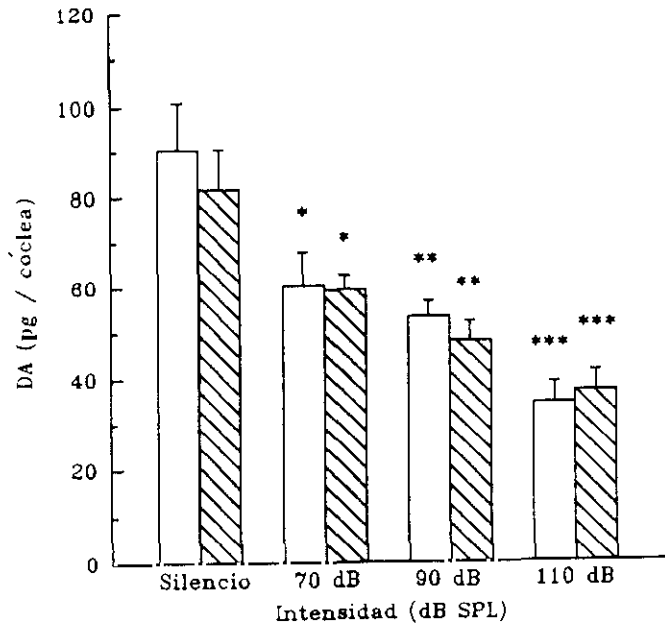
##### **Ver Anexo: Publicación 1.**

Los animales expuestos a estimulación acústica con ruido blanco durante una hora presentaron concentraciones cocleares de DA menores que los animales mantenidos en silencio, y concentraciones de DOPAC y HVA (los metabolitos de la DA estudiados) mayores.

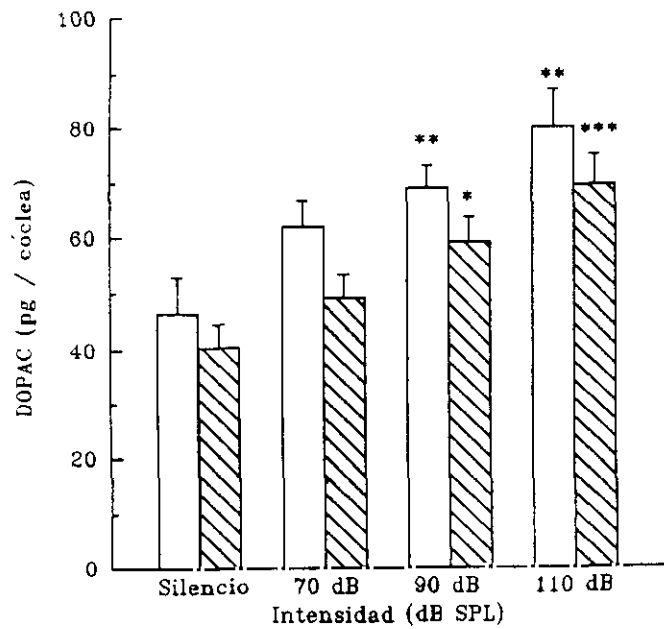
La concentración coclear de DA disminuyó a medida que aumentaba la intensidad del ruido blanco al que fueron expuestos los animales. Esta disminución fue de aproximadamente un 29%, un 38% o un 58% cuando las intensidades de la estimulación fueron 70, 90 o 110 dB SPL respectivamente (Fig. 18). Asimismo, las concentraciones de los metabolitos de la DA estudiados, DOPAC y HVA, aumentaron con la estimulación con ruido blanco (Fig. 18).

La disminución de la concentración de DA y el aumento de las concentraciones de DOPAC y HVA debidos a la exposición a ruido blanco se produjeron tanto en los animales machos como en las hembras (Fig. 18). Sin embargo, las hembras presentaron una mayor concentración de HVA que los machos en condiciones basales (silencio), y tras la estimulación acústica dicha concentración de HVA aumentó de forma más pronunciada que en los machos (Fig. 18).

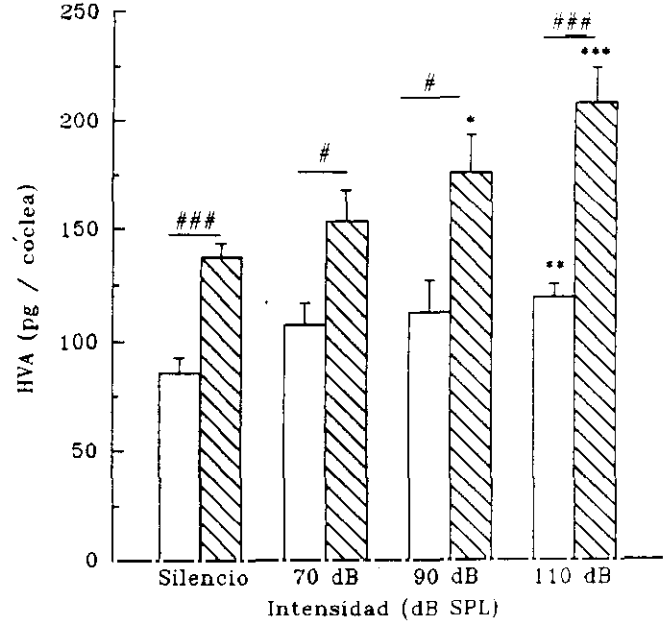
**A**



**B**



**C**



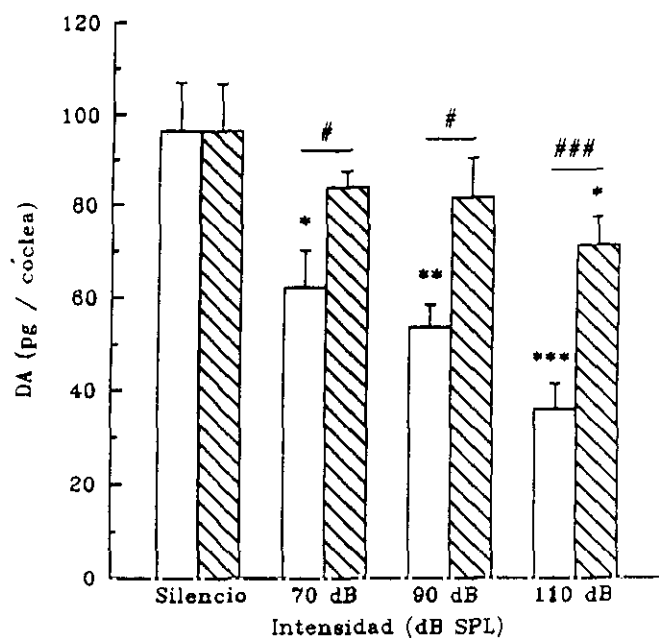
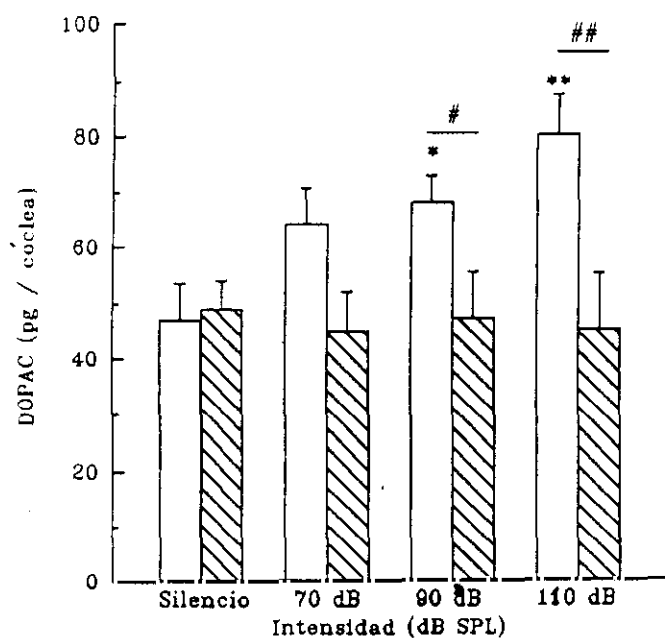
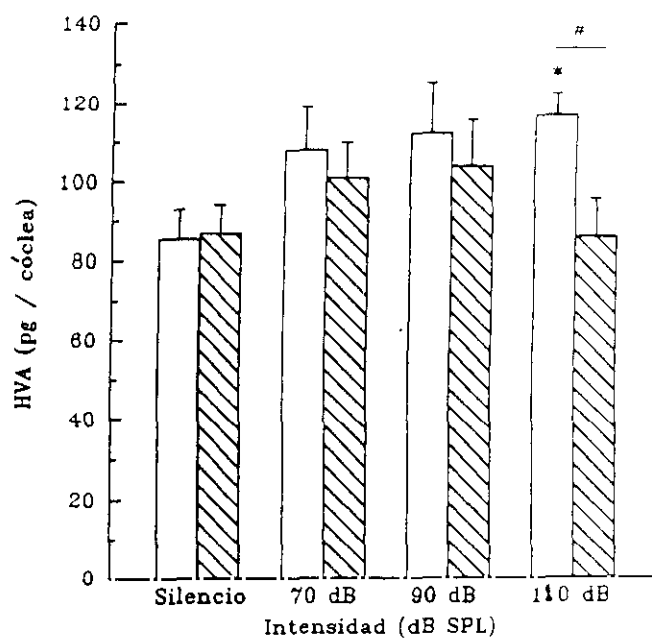
**Figura 18:** Concentraciones de dopamina (A), DOPAC (B) y HVA (C) en cócleas de animales expuestos a silencio o estimulación acústica con 70, 90 o 110 dB SPL. Las barras blancas representan los animales machos y las rayadas las hembras. Las comparaciones entre las distintas intensidades sonoras y el silencio están expresadas como \* p<0,05, \*\* p<0,01 y \*\*\* p<0,001. Las comparaciones entre los animales machos y las hembras están expresadas como # p<0,05, ### p<0,001. Los valores están representados como X ± SEM (n = 10 en cada grupo).

## 1.2. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON PIRIBEDIL SOBRE EL METABOLISMO DE LA DOPAMINA COCLEAR

**Ver Anexo: Publicación 2 y 3.**

Cuando los animales fueron pretratados con 20 mg/Kg del agonista dopaminérgico piribedil y mantenidos durante una hora en silencio no se detectaron modificaciones en las concentraciones cocleares de DA, DOPAC y HVA respecto a los controles tratados con el vehículo (Fig. 19). Sin embargo, los animales sometidos a distintas intensidades de ruido blanco presentaron concentraciones cocleares de DA superiores a las de los controles expuestos a las mismas intensidades, y concentraciones de DOPAC y HVA inferiores a las de dichos controles (Fig. 19).

En los animales control, la concentración de DA disminuyó a medida que aumentaba la intensidad de la estimulación acústica. Sin embargo, en los animales pretratados con piribedil no se observó esta reducción cuando los estímulos fueron de 70 o 90 dB SPL. Cuando la intensidad de la estimulación acústica fue de 110 dB SPL se produjo una ligera reducción en la concentración de DA coclear (aproximadamente el 25%) en comparación con la concentración de DA presente en los animales mantenidos en silencio. Las concentraciones de DOPAC y HVA aumentaron con la estimulación acústica en los controles, mientras que en los animales pretratados con piribedil no se detectaron estas modificaciones (Fig. 19).

**A****B****C**

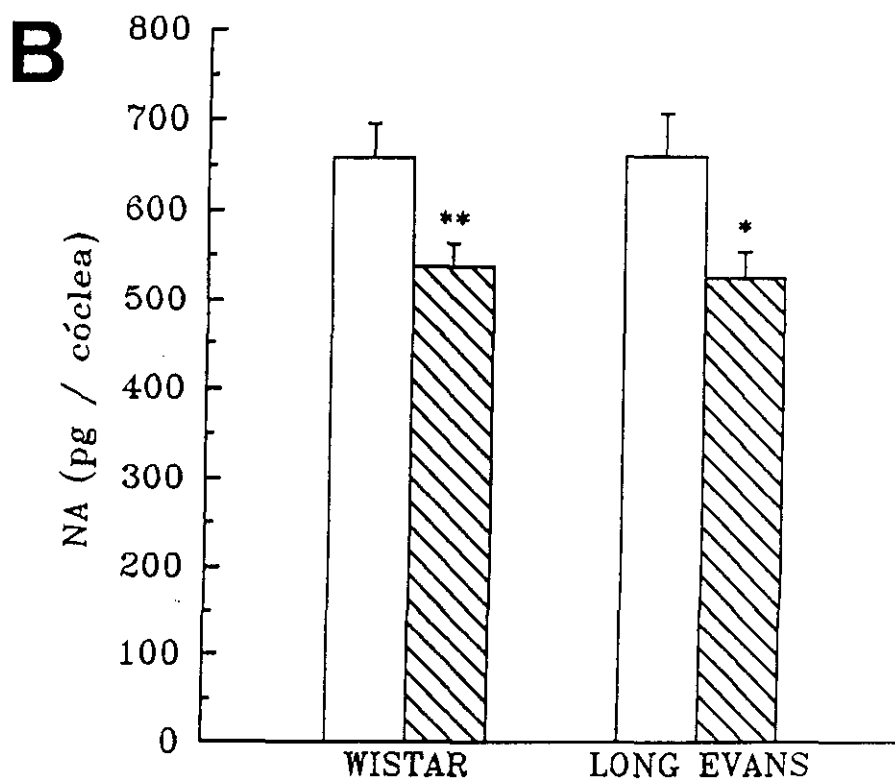
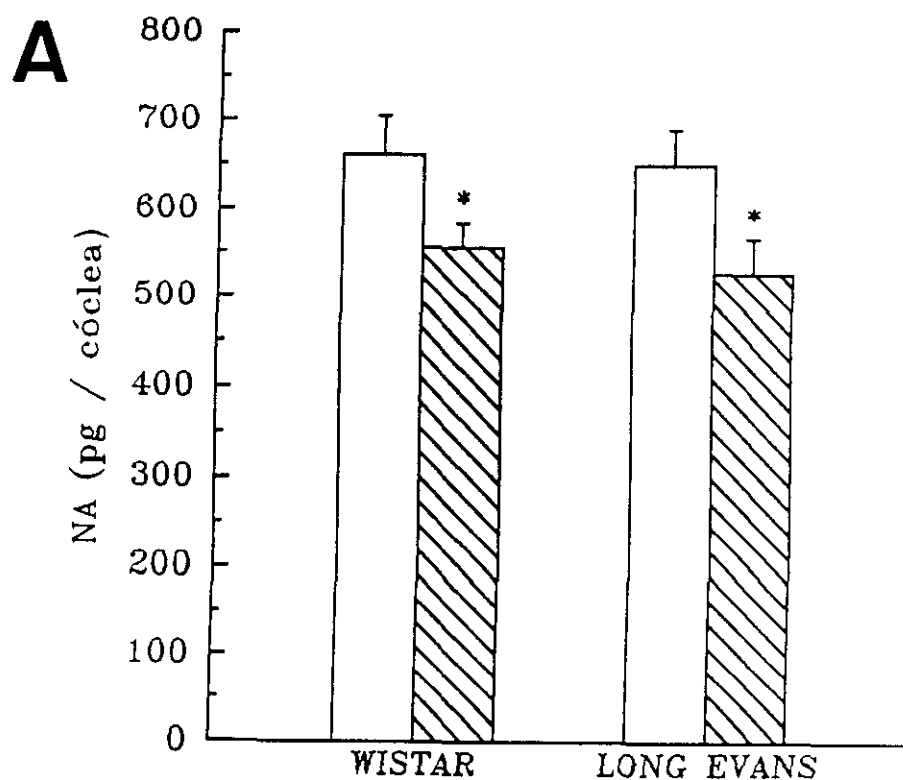
**Figura 19:** Concentraciones de dopamina (A), DOPAC (B) y HVA (C) en cócleas de animales expuestos a silencio o estimulación acústica con 70, 90 o 110 dB SPL. Las barras blancas representan los animales control y las rayadas los animales pretratados con piribedil. Las comparaciones entre las distintas intensidades sonoras y el silencio están expresadas como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ . Las comparaciones entre los controles y los animales pretratados con piribedil están expresadas como #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  y ###  $p < 0,001$ . Los valores están representados como  $X \pm SEM$  ( $n = 12$  en cada grupo).

### 1.3. EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN ACÚSTICA SOBRE EL METABOLISMO DE LA NORADRENALINA COCLEAR

#### Ver Anexo: Publicación 4.

El efecto de la estimulación acústica sobre la concentración de noradrenalina coclear se analizó estadísticamente de forma conjunta con la influencia de la perfusión por vía aórtica de una disolución anticoagulante y con la influencia de la cepa de los animales. El ANOVA de tres vías realizado (ruido x perfusión x cepa) ( $2 \times 2 \times 2$ ) detectó variabilidad debida únicamente a la variable estimulación acústica. Y no se observaron interacciones entre las tres variables (ruido, perfusión y cepa). El ANOVA de una vía para la variable estimulación acústica mostró diferencias significativas en las concentraciones cocleares de NA entre los animales mantenidos en silencio y los expuestos a 90 dB SPL de ruido blanco. Esta variabilidad resultó independiente de la eliminación de la sangre coclear mediante perfusión aórtica y de la cepa de los animales. Las diferencias en las concentraciones de noradrenalina coclear debidas a la estimulación acústica fueron  $p < 0,05$  excepto en el grupo de los animales Wistar perfundidos por vía aórtica, en el cual la diferencia resultó  $p < 0,01$  (Fig. 20).

La exposición a 90 dB SPL de ruido blanco durante una hora produjo una disminución significativa de la concentración de NA en la cóclea. La magnitud de esta disminución no fue elevada; sólo aproximadamente el 18% de la NA coclear desapareció con la intensidad sonora estudiada. Sin embargo, no se detectaron modificaciones en la concentración coclear de NA entre las distintas cepas estudiadas, ni tampoco cuando se eliminó la sangre de la cóclea mediante perfusión aórtica (Fig. 20)



**Figura 20:** (A) Concentración de noradrenalina en cócleas de ratas Long-Evans y Wistar mantenidas en silencio (barras blancas) o expuestas a 90 dB SPL de ruido blanco (barras rayadas) durante una hora. (B) Concentración de noradrenalina en cócleas de ratas perfundidas por vía aórtica con una disolución anticoagulante tras la estimulación acústica. Las comparaciones entre silencio y 90 dB SPL están expresadas como \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ . Los valores están expresados como  $\bar{X} \pm \text{SEM}$  ( $n = 12$  en cada grupo).

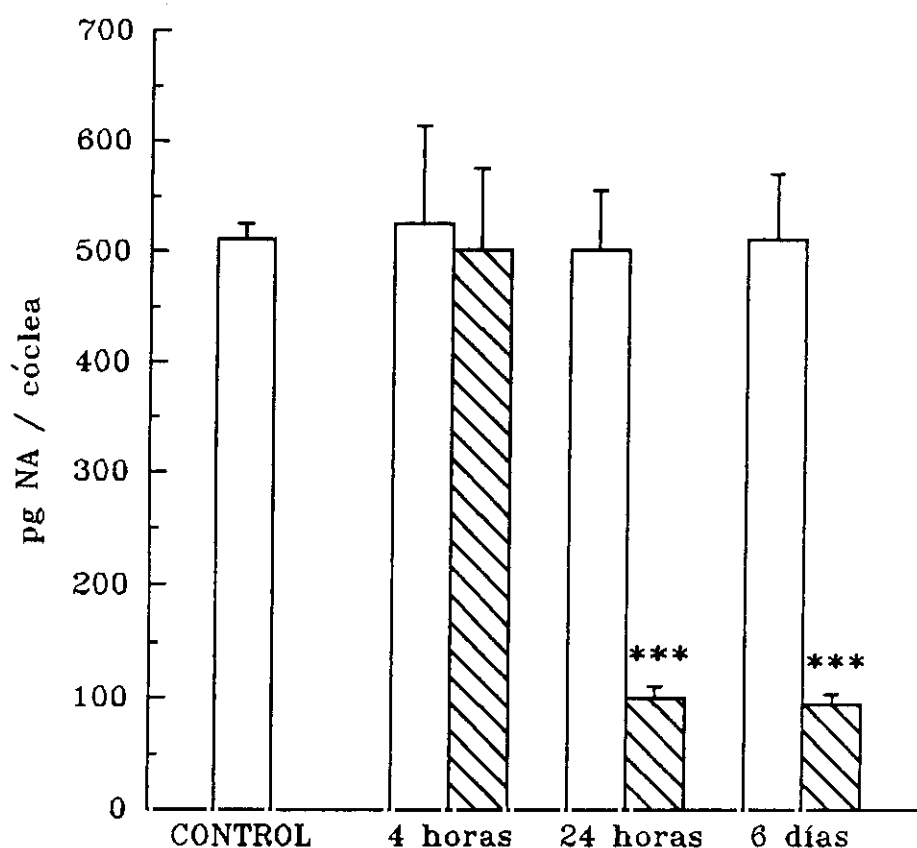


## 2. EFECTO DE LA GANGLIONECTOMÍA CERVICAL SUPERIOR SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE CATECOLAMINAS EN LA CÓCLEA

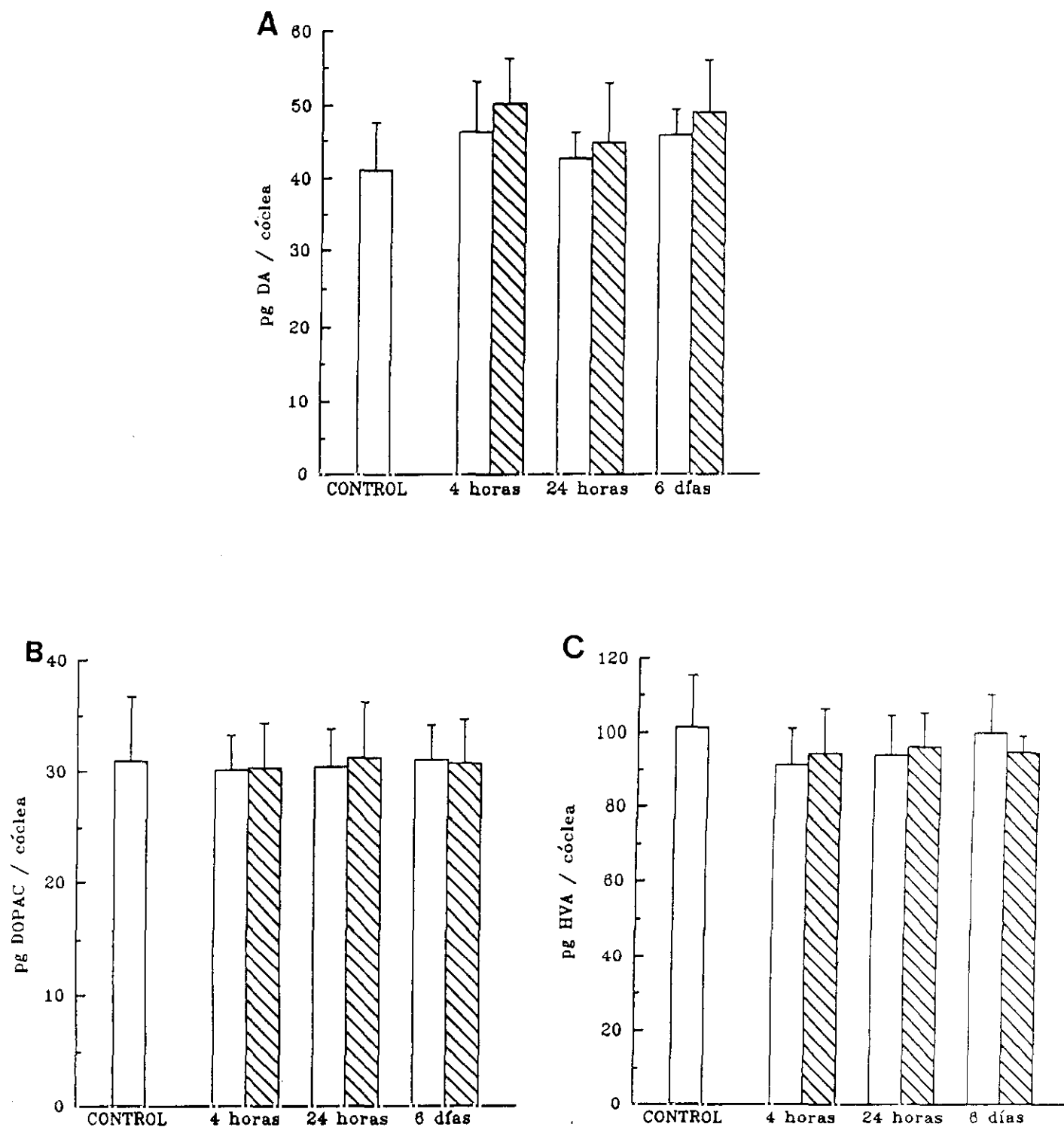
**Ver Anexo: Publicación 5.**

Cuando se llevó a cabo una operación simulada de la ganglionectomía cervical superior sin realizar la resección del ganglio, las cócleas ipsilaterales a la operación simulada no presentaron diferencias en la concentración de NA (Fig. 21), DA, DOPAC o HVA (Fig. 22) respecto a las cócleas de los controles externos, que no sufrieron ningún tipo de manipulación previa a la obtención de las muestras.

Cuando se realizó la resección del ganglio cervical superior, las cócleas ipsilaterales a la intervención que fueron analizadas 4h después de la misma no presentaron modificaciones en las concentraciones de NA respecto a las cócleas contralaterales no denervadas. Cuando el análisis de las cócleas se llevó a cabo 24h o 6 días después de la intervención, la concentración de NA coclear fue menor (aproximadamente un 82%) en las cócleas denervadas que en las no denervadas ( $p < 0,001$ ). Seis días después de la intervención, las cócleas ipsilaterales mantuvieron aproximadamente un 18% de NA (Fig. 21). Sin embargo, no se detectaron diferencias en las concentraciones de DA, DOPAC o HVA entre las cócleas denervadas y las no denervadas, ni 4h, ni 24h, ni 6 días después de la resección del ganglio cervical superior o su operación simulada (Fig. 22).



**Figura 21:** Concentración coclear de noradrenalina 4h, 24h o 6 días después de realizarse la resección del ganglio cervical superior ipsilateral (barras ralladas) o una operación simulada (barras blancas). La barra blanca localizada a la izquierda de la gráfica representa la concentración coclear de noradrenalina en los controles externos (animales no operados). Las comparaciones entre las cócleas denervadas y las no denervadas analizadas a distintos tiempos después de la intervención están expresadas como \*\*\*  $p < 0,001$ . Los valores están expresados como  $X \pm SEM$  ( $n = 6$  en cada grupo).



**Figura 22:** Concentraciones de dopamina (A), DOPAC (B) y HVA (C) en cócleas de animales a los que se practicó una ganglionectomía cervical superior ipsilateral (barras ralladas) o una operación simulada (barras blancas). Las barras blancas localizadas a la izquierda de las gráficas representan las concentraciones de DA, DOPAC y HVA en las cócleas de los controles externos (animales no operados). Las comparaciones entre las cócleas denervadas y las no denervadas analizadas a distintos tiempos después de la intervención no resultaron significativas. Los valores están expresados como  $X \pm SEM$  ( $n = 6$  en cada grupo).

### III. LA SEROTONINA EN LA CÓCLEA

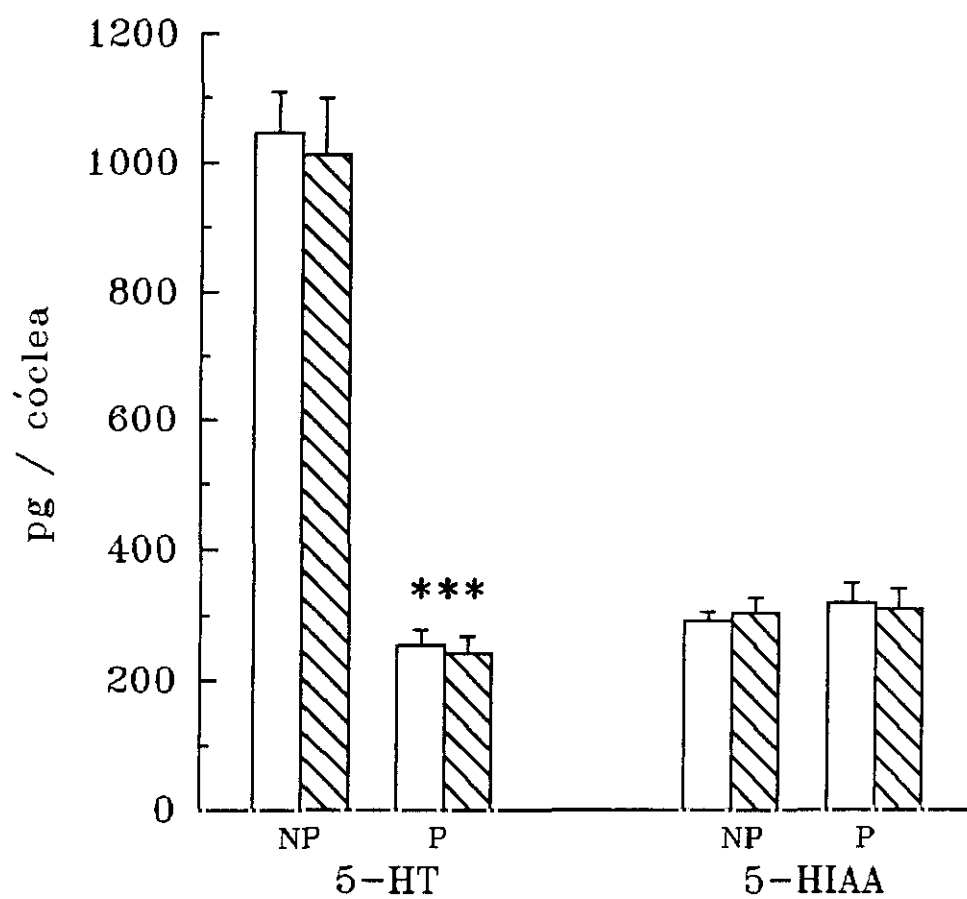
#### **Ver Anexo: Publicación 6.**

La 5-HT y el 5-HIAA fueron detectados en todas las muestras analizadas.

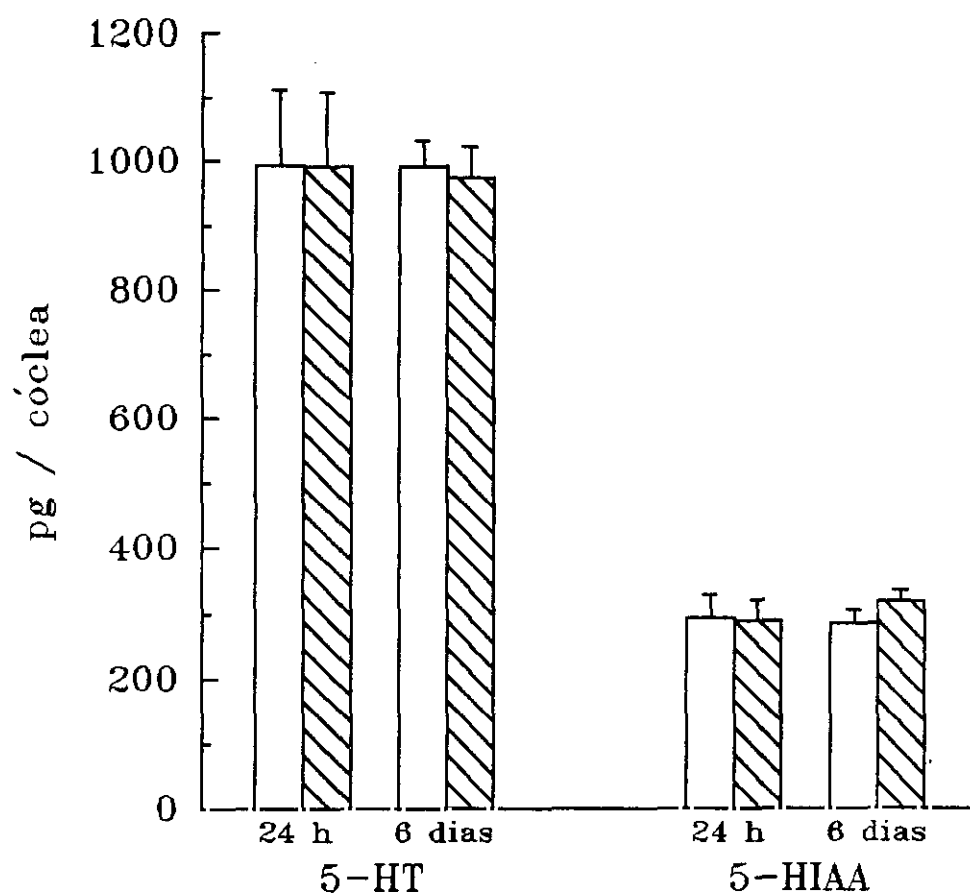
Cuando se analizó la concentración coclear de 5-HT estadísticamente mediante un ANOVA de dos vías considerando como variables la estimulación acústica y la perfusión por vía aórtica (2 x 2) se obtuvieron efectos principales altamente significativos ( $p < 0,001$ ) para la variable perfusión, y no se detectaron interacciones significativas entre las dos variables. El ANOVA de una vía para la variable perfusión mostró diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ) tanto en los animales mantenidos en silencio como en los expuestos a ruido blanco (Fig. 23). La perfusión por vía aórtica de una disolución anticoagulante produjo una disminución de aproximadamente el 76% de la concentración de 5-HT en la cóclea independientemente de la estimulación acústica (Fig. 23).

Cuando se analizó la concentración de 5-HIAA presente en la cóclea mediante un ANOVA de dos vías (ruido x perfusión; 2 x 2) no se detectó ninguna variabilidad entre los grupos estudiados, ni tampoco se observaron interacciones entre ambas variables. Por lo tanto no se realizaron ANOVAs de una vía (Fig. 23).

La resección del ganglio cervical superior no produjo ninguna modificación en la concentración de NA coclear en las cócleas ipsilaterales denervadas respecto a las contralaterales no denervadas, ni 24h ni 6 días después de la intervención (Fig. 24).



**Figura 23:** Concentraciones de serotonina y 5-HIAA en cócleas de animales perfundidos por vía aórtica con una disolución anticoagulante (P) o no perfundidos (NP), tras ser expuestos a silencio (barras blancas) o ruido blanco de 90 dB SPL (barras ralladas). Las comparaciones entre los animales perfundidos y los no perfundidos están expresadas como \*\*\*  $p < 0,001$ . La estimulación acústica no produjo diferencias significativas respecto al silencio. Los valores están expresados como  $X \pm SEM$  ( $n = 12$  en cada grupo).



**Figura 24:** Concentraciones de serotonina y 5-HIAA en cócleas tras resección del ganglio cervical superior ipsilateral (barras ralladas) o tras una operación simulada (barras blancas), 24h o 6 días después de la intervención. Las comparaciones entre las cócleas denervadas y las no denervadas no resultaron significativas ni 24h ni 6 días después de la intervención. Los valores están expresados como  $X \pm SEM$  ( $n = 12$  en cada grupo).

## IV. LAS MONOAMINAS EN EL VESTÍBULO

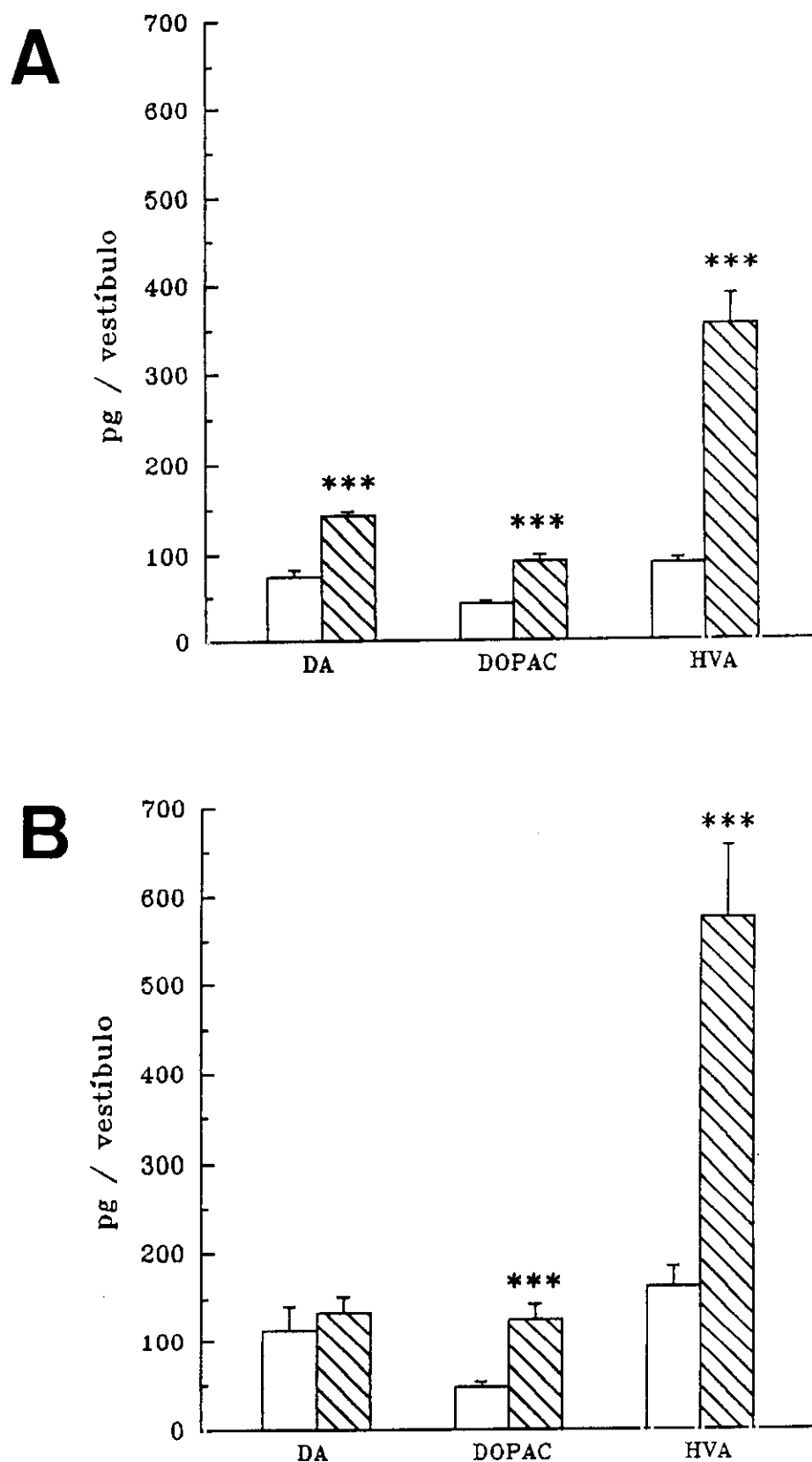
### **Ver Anexo: Publicación 7.**

Todos los compuestos analizados fueron detectados con el método elegido de HPLC-ED en todas las muestras vestibulares.

Los vestíbulos de los animales pigmentados (Long-Evans) machos presentaron concentraciones mayores de DA, DOPAC y HVA que los de los animales albinos (Wistar). Las hembras de la cepa Long-Evans también presentaron concentraciones mayores de DOPAC y HVA que los machos de dicha cepa, sin embargo las concentraciones de DA no fueron significativamente diferentes (Fig., 25). La relaciones DOPAC / DA y HVA / DA fueron mayores en la cepa pigmentada, tanto en los machos como en las hembras.

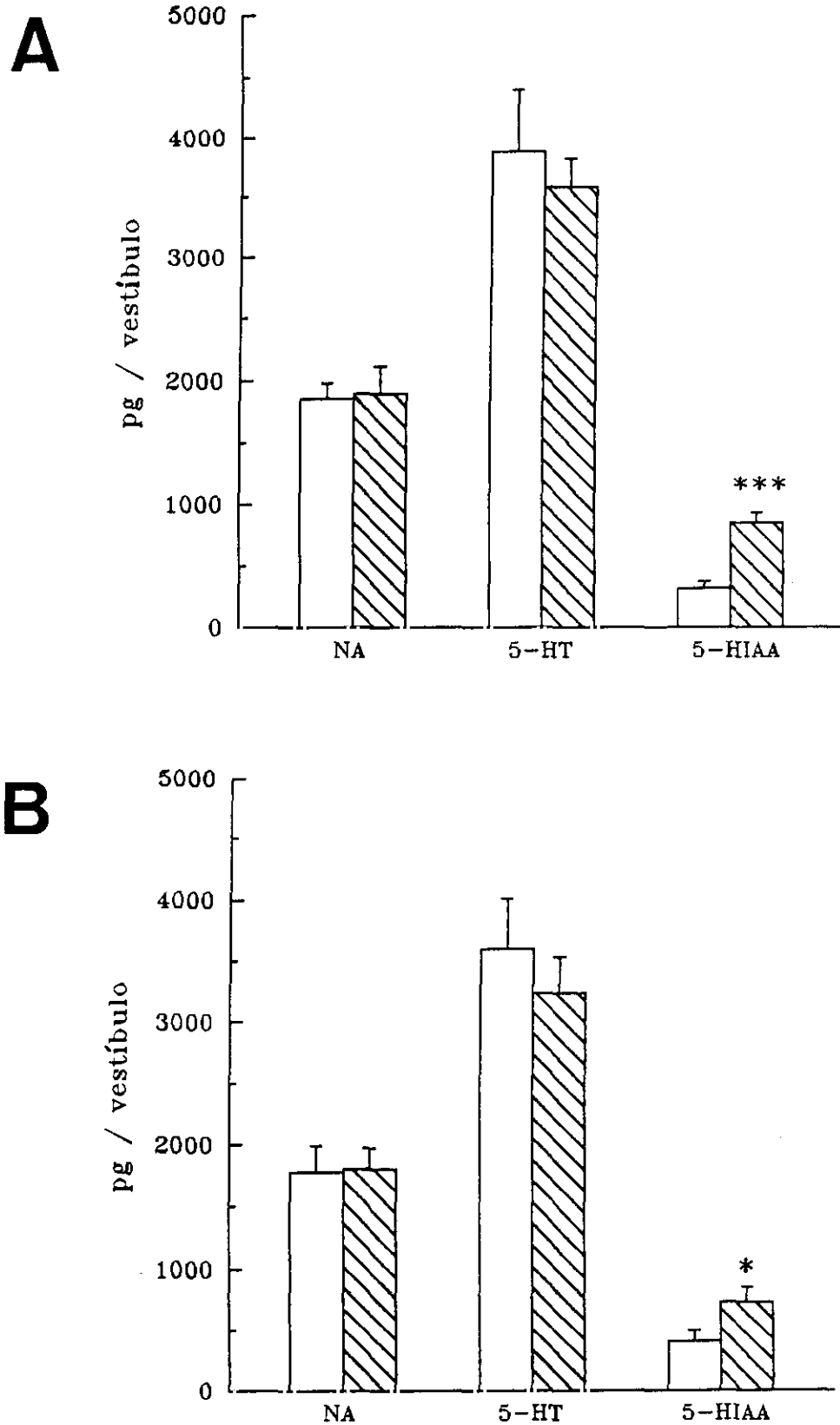
Las concentraciones vestibulares de NA y 5-HT no presentaron diferencias entre ambas cepas, ni en los animales machos ni en las hembras. Sin embargo, la concentración del metabolito de la 5-HT (5-HIAA) resultó mayor en la cepa pigmentada (Fig. 26). La relación 5-HIAA / 5-HT fue por lo tanto mayor en dicha cepa.

Las concentraciones de monoaminas o sus metabolitos presentes en machos o en hembras de la misma cepa no fueron significativamente diferentes, excepto en el caso del HVA que resultó mayor en los vestíbulos de las hembras (Figs. 25 y 26). La relación HVA / DA fue mayor en las hembras que en los machos de la misma cepa.



**Figura 25:** Concentraciones vestibulares de dopamina, DOPAC y HVA en ratas machos (A) y hembras (B). Las barras blancas representan ratas Wistar y las ralladas ratas Long-Evans. Las comparaciones entre las dos cepas se expresan como \*\*\*  $p < 0,001$ . Los valores están expresados como  $X \pm SEM$  ( $n = 10$  en cada grupo).





**Figura 26:** Concentraciones vestibulares de noradrenalina, serotonina y 5-HIAA en ratas machos (A) y hembras (B). Las barras blancas representan ratas Wistar y las ralladas ratas Long-Evans. Las comparaciones entre las dos cepas se expresan como \*  $p < 0,05$  y \*\*\*  $p < 0,001$ . Los valores están expresados como  $X \pm SEM$  ( $n = 10$  en cada grupo).

# **DISCUSSION**

# **I. METODO PARA ELIMINAR DE LA COCLEA LA SEROTONINA SANGUINEA MEDIANTE PERFUSION AORTICA**

Los parámetros que se consideraron para la selección del método de perfusión aórtica fueron: 1) carencia de sangre en las arterias estapediales y en el cerebro, lo cual permite suponer una carencia de sangre en la cóclea 2) carencia de alteraciones orgánicas, debidas a la perfusión (por ejemplo, edemas generalizados), en los animales y 3) carencia de alteraciones en el metabolismo de la 5-HT en la cóclea. Respecto al último punto, en varias de las condiciones analizadas (ver apartado de resultados) se detectó una disminución en la concentración de 5-HT que iba acompañada de un aumento en la concentración de su principal metabolito 5-HIAA. Este hecho refleja un proceso de degradación de la DA coclear debido a la perfusión, por lo tanto estas condiciones fueron desechadas.

## **1. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE PERFUSIÓN**

Tras analizar temperaturas de perfusión de 4, 26 y 37°C, se seleccionó 26°C como temperatura de trabajo. A esa temperatura no fue necesario emplear un elevado tiempo de perfusión para eliminar la sangre de las arterias estapediales y el cerebro. Además, perfundiendo a 26°C no se produjo la degradación de la 5-HT coclear.

## **2. EFECTO DE LA VELOCIDAD DE PERFUSIÓN**

Se analizaron flujos de perfusión de 120, 55 y 4,5ml/min mediante bomba peristáltica y también perfusión por gravedad. Se seleccionó el menor flujo proporcionado por la bomba peristáltica (4,5ml/min) porque no ocasionó edemas en los animales ni alteraciones en el metabolismo de la 5-HT coclear, y permitió

eliminar la sangre de las arterias estapediales y el cerebro en un tiempo menor que la perfusión por gravedad.

### **3. EFECTO DEL TIEMPO DE PERFUSIÓN Y CLAMPADO DE LA AORTA DESCENDENTE**

El tiempo de perfusión resultó ser un factor crítico en el desarrollo del método, ya que tiempos de entre 4 y 10 min provocaron la degradación de la 5-HT coclear. Sin embargo, es necesario un tiempo mínimo de circulación de la disolución de perfusión para que la sangre sea eliminada de la cóclea. Mediante el clampado de la aorta descendente fue posible disminuir el tiempo de perfusión a 2 min.

### **4. EFECTO DE LA DISOLUCIÓN DE PERFUSIÓN**

Como disolución de perfusión se seleccionó tampón citrato 0,1 M con 20g/l de glucosa a pH ácido (4,8). Esta disolución no produjo la degradación de la 5-HT coclear, a diferencia de las otras disoluciones analizadas.

En resumen, los parámetros fundamentales para llevar a cabo la eliminación la 5-HT sanguínea de la cóclea sin generar otras alteraciones son: 1) temperatura de aproximadamente 26°C, 2) flujo y duración de la perfusión mínimos pero suficientes para eliminar la sangre de la cóclea, y 3) perfusión con una disolución anticoagulante (tampón citrato) a pH ácido (4,8).

## II. LAS CATECOLAMINAS EN LA CÓCLEA

### 1. EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN ACÚSTICA SOBRE EL METABOLISMO DE LAS CATECOLAMINAS EN LA CÓCLEA

La estimulación acústica produjo una disminución de las concentraciones cocleares de los neurotransmisores catecolaminérgicos DA y NA. Asimismo en el caso de la DA, se detectó un aumento en la concentración de sus metabolitos DOPAC y HVA. Estos resultados sugieren que la estimulación acústica induce la liberación y el catabolismo de ambas catecolaminas (ver Anexo: Publicación 1)

En condiciones fisiológicas, la estimulación acústica genera la transmisión del mensaje auditivo hacia los núcleos cocleares (Aran y Harrison, 1985; Gil-Loyzaga y Pujol, 1993; Gil-Loyzaga, 1995). En la modulación de esta transmisión parecen estar implicadas la DA y la NA. De hecho, se ha mostrado en el presente trabajo que la DA es liberada con una estimulación de 70 dB SPL (intensidad conversacional). Además, la perfusión perilinfática de un agonista dopaminérgico disminuyó la amplitud del PAC del nervio auditivo (Puel y Pujol, 1993; Pujol y cols., 1993, 1995; Pujol, 1994). La NA coclear no ha sido analizada en condiciones fisiológicas de estimulación acústica. Sin embargo, la resección del ganglio cervical superior o su estimulación afectaron la actividad del nervio auditivo (Pickles, 1979; Hultcrantz y cols., 1982; Lee y Moller, 1985; Hildesheimer y cols., 1991), lo cual permite implicar la NA, como neurotransmisor simpático, en la modulación del mensaje auditivo en condiciones fisiológicas.

Cuando la estimulación acústica es de elevada intensidad o duración se observan alteraciones en la actividad del nervio auditivo, por ejemplo un aumento en el umbral de audición (Borg, 1982; Hildesheimer y cols., 1991; Puel y Pujol, 1993; Pujol, 1994; Pujol y cols., 1995; D'Aldin y cols., 1995), alteraciones vasculares (Borg, 1981) y alteraciones en la morfología de las dendritas aferentes (Puel y Pujol, 1993; Pujol, 1994; Pujol y cols., 1995; D'Aldin y cols., 1995), las cuales varían tras la

administración de agonistas dopaminérgicos, o la resección del ganglio cervical superior. La liberación de DA y NA en la cóclea debido a estimulaciones acústicas de elevada intensidad o duración (90 y 110 dB SPL durante una hora) permite asignar a ambas catecolaminas un papel protector frente a los efectos nocivos que la estimulación acústica produce sobre la cóclea, que pueden acabar generando un trauma acústico. Asimismo, se puede sugerir que estas catecolaminas o sus agonistas pueden ser útiles en el tratamiento farmacológico de patologías producidas por la exposición prolongada a ambientes ruidosos (ver Anexo: Publicaciones 1 y 4).

Tanto las fibras dopaminérgicas cocleares como las noradrenérgicas modulan la actividad de las fibras aferentes del nervio auditivo en situaciones de estimulaciones acústicas elevadas (Borg, 1982; Hildesheimer y cols., 1991; Puel y Pujol, 1993; Pujol, 1994; Pujol y cols., 1995; D'Aldin y cols., 1995). Sin embargo, la mayor movilización de DA (aproximadamente 38%) que de NA (aproximadamente 18%) en respuesta a una estimulación acústica de 90 dB SPL hace pensar que la mayor parte del papel protector frente a situaciones agresivas como el trauma acústico proviene del SEOL (ver Anexo: Publicaciones 1 y 4).

La estimulación acústica produce la movilización de otros neurotransmisores implicados en la neurotransmisión coclear. A este respecto se ha descrito la liberación Met-enkefalina y GABA a la perilinfa (Drescher y cols., 1983) y la disminución de la concentración total en la cóclea de Met-enkefalina (Eybalin y cols., 1987) con intensidades que abarcan desde las moderadas (70 dB SPL) hasta las elevadas (115 dB SPL).

La liberación de DA que presentamos en esta Memoria de Tesis Doctoral muestra un perfil semejante al de la Met-enkefalina y el GABA (Drescher y cols., 1983; Eybalin y cols., 1987), ya que los tres compuestos se liberan en la cóclea con un amplio intervalo de intensidades acústicas. Sin embargo, la NA se moviliza escasamente tras la estimulación con 90 dB SPL durante una hora. Este hecho

sugiere que la DA y la NA tienen distintos papeles funcionales en la cóclea, siendo el de la DA semejante al de la Met-enkefalina y el GABA. De hecho, presentan distintas localizaciones: mientras que la DA, la Met-enkefalina y el GABA son neurotransmisores del SEOL (revisiones en: Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga, 1995; Puel, 1995), la NA es el neurotransmisor de las fibras simpáticas cocleares (Jones y cols., 1987; Usami y cols., 1988).

La administración del agonista dopaminérgico piribedil bloqueó la liberación de DA inducida por una estimulación acústica de 70 o 90 dB SPL de forma total y lo hizo parcialmente cuando el estímulo fue de 110 dB SPL durante una hora. Este proceso podría estar mediado por dos mecanismos: 1) la activación de receptores dopaminérgicos en la membranas presinápticas de las neuronas dopaminérgicas, los cuales inhiben la liberación de DA, y/o 2) la activación de receptores dopaminérgicos postsinápticos localizados sobre las fibras aferentes primarias, los cuales modulan la actividad de dichas fibras, y mediante un circuito neural podrían afectar la actividad de las neuronas dopaminérgicas del SEOL (ver Anexo: Publicaciones 2 y 3). La disminución en la amplitud del PAC del nervio auditivo tras perfusión perilinfática de piribedil (Puel y Pujol, 1993; Pujol y cols., 1993, 1995; Pujol, 1994) y la protección de las dendritas aferentes frente a las lesiones inducidas por el trauma acústico o la hipoxia (Puel y Pujol, 1993; Pujol y cols., 1993, 1995; Pujol, 1994; D'Aldin y cols., 1995) son datos a favor del segundo mecanismo. Sin embargo, el primer mecanismo no puede ser descartado, ya que el piribedil es un fármaco que actúa sobre receptores pre- y postsinápticos, y se ha descrito en otros sistemas que la dosis empleada en el presente trabajo actúa fundamentalmente a nivel presináptico (Corrodi y cols., 1972; Costall y Naylor, 1973; Ladinsky y cols., 1974; Kelly y Naylor, 1975).

El piribedil se comercializó en los años setenta como un agonista de receptores D2 (Costall y Naylor, 1973; Butterworth y cols., 1975; Martres y cols., 1977; Hall y cols., 1983; Murrin y Roth., 1987; Timmerman y cols., 1990). En la actualidad se ha

comprobado que su afinidad por los receptores D3 es aproximadamente 20 veces mayor que por los receptores D2, y que su afinidad por los receptores D1 es muy baja (Cagnotto y cols., 1996), lo cual sugiere la existencia de receptores D3 y/o D2 en la cóclea. Sin embargo este dato no permite aclarar su mecanismo de acción en la cóclea, ya que tanto los receptores D2 como los D3 se han descrito en membranas presinápticas y postsinápticas (revisiones en: Alonso-Solis, 1993; Civelli y cols., 1993)). Tampoco resultaron más esclarecedores los experimentos de hibridación in situ en los que se reconocen los ARNm que codifican los receptores dopaminérgicos. Estos estudios mostraron la existencia en las neuronas del ganglio espiral de los ARNm que codifican los receptores D1 y D2 (Eybalin y cols., 1995; Pujol y cols., 1995; Safieddine y cols., 1997). Sin embargo no se dispone de datos acerca de la presencia de receptores D3 en la cóclea, ni acerca de la presencia de receptores D2 en las neuronas dopaminérgicas del SEOL.

En la actualidad, el origen de patologías cocleares como los acúfenos está sin aclarar. Algunos autores postulan que se relacionan con alteraciones del sistema aferente (Denk y Ehrenberger, 1998) o del eferente olivococlear (Gil-Loyzaga, 1994). El tratamiento clínico de los acúfenos y la hipoacusia con piribedil supuso una mejoría de los síntomas, fundamentalmente en el caso de los acúfenos (Cazals-Horner y cols., 1989). La actuación del fármaco sobre la liberación de DA coclear, sobre la actividad del nervio coclear y sobre la morfología de dendritas aferentes podría explicar la mencionada mejoría e implicaría el sistema dopaminérgico coclear en dichas patologías.

El turnover de la DA es ligeramente mayor en las hembras que en los machos, ya que las hembras, tanto en situación basal como tras estimulación acústica, presentan mayores concentraciones del metabolito HVA. Este hecho podría correlacionarse con las diferentes regulaciones hormonales presentes en machos y hembras. A este respecto, se ha descrito que las hormonas sexuales afectan la síntesis, liberación y recaptación de DA en distintas áreas del sistema nervioso, así



como la densidad de sus receptores y el comportamiento relacionado con el sistema dopaminérgico (Dluzen y Ramírez, 1985; Falardeau y Di Paolo, 1987; Esquifino y cols., 1987; Palermo-Neto y Dorce., 1990; Arbogast y Voogt, 1991; Gayrard y cols., 1992; Castner y cols., 1993; McDermott, 1993; Morissette y Di Paolo, 1993; Pasqualini y cols., 1993; Rastegar y cols., 1993) (ver Anexo: Publicación 1).

La concentración de NA, sin embargo, fue similar en cócleas de ratas de dos cepas distintas y con diferente pigmentación, tanto en condiciones basales como tras estimulación acústica. Este resultado contradice estudios previos en los cuales se determinó la concentración de NA coclear en ratas pigmentadas y albinas, aunque las cepas seleccionadas no fueron las mismas (Rarey y cols., 1981). Sin embargo, concuerda con los resultados obtenidos en el vestíbulo en estas mismas cepas (ver Anexo: Publicación 4).

Tampoco se modificó la concentración de NA coclear al eliminar la sangre de la cóclea mediante la perfusión por vía aórtica de una disolución anticoagulante. Este hecho, que se observó en condiciones basales y tras estimulación acústica, parece indicar que la cantidad de NA procedente de la sangre es pequeña en la cóclea (ver Anexo: Publicación 4).

## **2. EFECTO DE LA GANGLIONECTOMÍA CERVICAL SUPERIOR SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE CATECOLAMINAS EN LA CÓCLEA**

La resección del ganglio cervical superior disminuye la concentración de NA en la cóclea alrededor del 82%, lo cual indica que la mayoría de la NA coclear procede de este ganglio (ver Anexo: Publicación 5). Este resultado concuerda con los estudios morfológicos previos que describieron que el ganglio cervical superior es la fuente principal de fibras simpáticas cocleares (Terayama y cols., 1966, 1968; Densert, 1974; Spöndlin, 1981, 1984; Shibamori y cols., 1994). El ganglio cervical superior constituye un manguito perivascular para la carótida interna que acompaña a esta arteria al interior del cráneo (Pérez-Casas y Bengoechea, 1977). Este

manguito se continúa por la comunicante posterior y alcanza la fosa posterior. En esta región, un grupo de fibras se separa del manguito perivascular y alcanza el ganglio geniculado, a través del nervio petroso mayor. Y desde aquí las fibras pasan al nervio facial para alcanzar el nervio auditivo y entrar en la cóclea.

El 18% de NA que permanece en la cóclea 6 días después de la intervención quirúrgica debe tener un origen distinto del ganglio cervical superior. La sangre, como se ha comentado en el apartado anterior, no parece ser una fuente importante de NA en la cóclea. Algunos autores defienden que el ganglio cervical superior es el único origen de las fibras simpáticas cocleares (Terayama y cols., 1966, 1968; Shibamori y cols., 1994). Sin embargo, otros (Spoendlin, 1981, 1984; Laurikainen y cols., 1993, 1997; Ren y cols., 1993a) añaden el ganglio estrellado como origen de una parte de las fibras simpáticas cocleares. Este ganglio podría ser la fuente del 18% de NA remanente en la cóclea tras la simpatectomía cervical superior. Fibras procedentes de este ganglio forman un manguito perivascular que envuelve la arteria vertebral, constituyendo el denominado nervio vertebral (Pérez-Casas y Bengoechea, 1977). Este manguito penetra con la arteria en el cráneo y, desde el tronco basilar se distribuye a todas las ramas intracraneales. Así alcanza la arteria coclear donde forma un plexo perivascular que entra por la base de la cóclea alcanzando las arteriolas principales, pero sin llegar a la estría vascular o a los capilares cocleares (ver Anexo: Publicación 5).

A diferencia de la NA, las concentraciones de DA, DOPAC y HVA no sufrieron ninguna modificación tras la resección del ganglio cervical superior. Aunque las fibras noradrenérgicas deben contener DA como precursor de la NA, la cantidad de DA debe ser muy baja puesto que no es detectada con el método cromatográfico empleado en este estudio. Por lo tanto, se pueden diferenciar dos poblaciones de fibras catecolaminérgicas que inervan la cóclea: las noradrenérgicas y las dopaminérgicas, las cuales reaccionan de distinta forma a la estimulación acústica, como se comentó en el apartado anterior (ver Anexo: Publicación 5).

Se puede considerar, por lo tanto, que estos dos neurotransmisores tienen distintas localizaciones en la cóclea y distintos papeles funcionales. La NA se localiza fundamentalmente en las fibras simpáticas que proceden del ganglio cervical superior y actúa sobre el flujo sanguíneo coclear (Hultcrantz, 1979; Beausang-Linder y Hultcrantz, 1980; Laurikainen y cols., 1993, 1994, 1997; Ren y cols., 1993a, 1993b, 1994) y ligeramente sobre la actividad de las fibras aferentes (Pickles, 1979; Borg, 1982; Hultcrantz y cols., 1982; Lee y Moller, 1985; Hildesheimer y cols., 1991; Gil-Loyzaga y cols., 1998). Por otra parte, la DA se localiza en las fibras dopaminérgicas del SEOL y modula la actividad aferente actuando directamente sobre las terminaciones dendríticas aferentes (Puel y Pujol, 1993; Pujol y cols., 1993, 1995; Pujol, 1994) y las protege frente a situaciones agresivas: trauma acústico o hipoxia (Puel y Pujol, 1993; Pujol y cols., 1993, 1995; Pujol, 1994; D'Aldin y cols., 1995).

### **III. LA SEROTONINA EN LA CÓCLEA**

#### **1. PRESENCIA DE SEROTONINA EN DISTINTOS COMPARTIMENTOS COCLEARES**

Estudios previos de HPLC habían negado la existencia de 5-HT en la cóclea de distintos mamíferos (Rarey y cols., 1981). Sin embargo un trabajo reciente de nuestro grupo demostró, mediante técnicas inmunocitoquímicas, la existencia de fibras serotoninérgicas que contactan con las células ciliadas internas y externas (Gil-Loyzaga y cols., 1997). La presente Memoria de Tesis Doctoral corrobora la presencia de 5-HT en la cóclea, ya que tanto la 5-HT como su principal metabolito, el 5-HIAA, fueron cuantificados mediante HPLC-ED (ver Anexo: Publicación 6).

El ganglio cervical superior no parece ser una fuente importante de 5-HT en la cóclea, puesto que su resección no produjo modificaciones en las concentraciones totales de 5-HT ni de 5-HIAA (ver Anexo: Publicación 6). Este mismo efecto se

observó con la DA coclear: ni su concentración ni la de sus metabolitos se vieron afectadas por la resección de dicho ganglio. Mientras que la concentración de NA coclear disminuyó drásticamente tras la ganglionectomía, como corresponde al neurotransmisor contenido en las fibras simpáticas. Aunque en otras áreas del sistema nervioso se ha sugerido la presencia de 5-HT en fibras simpáticas que proceden del ganglio cervical superior (Chang y cols., 1988, 1989; Häppölä, 1988; Bonvento y cols., 1991; Cohen y cols., 1992), éste no parece ser el caso de la cóclea. Este hecho concuerda con la distribución de fibras serotoninérgicas puesta de manifiesto mediante inmunocitoquímica (Gil-Loyzaga y cols., 1997), la cual no coincide con la distribución de las fibras simpáticas en la cóclea (revisiones en: Spoendlin, 1984; Eybalin, 1993), sino que se asemeja más a la del sistema eferente olivococlear.

La eliminación de la sangre de los animales, mediante la perfusión por vía aórtica de una disolución anticoagulante, produjo una disminución drástica (aproximadamente el 76%) de la concentración de 5-HT en la cóclea, sin afectar la concentración de 5-HIAA. Este resultado (ver Anexo: Publicación 6) indica que la sangre es la principal fuente de 5-HT en la cóclea, lo cual concuerda con la elevada concentración de este compuesto presente en ella, localizada fundamentalmente en las plaquetas (Anderson y cols., 1987; Kumar y cols., 1990; Pussard y cols., 1996). El 24% de 5-HT que permanece en la cóclea tras eliminar la sangre, y el 5-HIAA, cuya concentración no se modifica por la perfusión, deben estar localizados en el tejido coclear, probablemente en relación con las fibras serotoninérgicas recientemente descritas (Gil-Loyzaga y cols., 1997).

## **2. EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN ACÚSTICA SOBRE EL METABOLISMO DE LA SEROTONINA EN LA CÓCLEA**

La estimulación con 90 dB SPL de ruido blanco durante una hora no produjo ningún efecto significativo sobre las concentraciones cocleares de 5-HT y 5-HIAA.

Con esa misma intensidad sonora, las concentraciones cocleares de las otras monoaminas analizadas en esta Memoria de Tesis Doctoral, la DA y la NA, disminuyeron en aproximadamente un 38% y un 18% respectivamente (ver Anexo: Publicaciones 1 y 4). Otros neurotransmisores del sistema eferente olivococlear (GABA y Met-enkefalina) también fueron afectados por la estimulación acústica (Drescher y cols., 1983; Eybalin y cols., 1987).

La ausencia de respuesta de las fibras serotoninérgicas cocleares a la estimulación sonora (ver Anexo: Publicación 6), podría relacionarse con la distribución especial que poseen dichas fibras en la cóclea, la cual no coincide exactamente con ninguno de los sistemas de inervación previamente descritos en la cóclea (Gil-Loyzaga y cols., 1997). De hecho, estas fibras contactan con las células ciliadas internas y externas, lo cual solamente se asemeja a la distribución de las fibras GABAérgicas en el ápex coclear, pero no en el resto de las espiras de la cóclea. La distinta respuesta al ruido, junto con la distinta distribución de las fibras parece indicar que la 5-HT posee en la cóclea un papel modulador diferente del de otros neurotransmisores, el cual por el momento no ha sido dilucidado.

#### **IV. LAS MONOAMINAS EN EL VESTÍBULO**

El estudio de la inervación vestibular se encuentra mucho menos desarrollado que el de la coclear. En el vestíbulo se han descrito menos compuestos neurotransmisores y la implicación fisiológica de la mayoría de los descritos hasta el momento permanece sin analizar. Respecto a las monoaminas, solamente la NA ha sido identificada en las fibras simpáticas que inervan el vestíbulo.

Este es el primer trabajo en el que se cuantifica la concentración de NA presente en el vestíbulo. Además se describe por primera vez la existencia de otras dos monoaminas en el vestíbulo, la DA y la 5-HT, así como la de sus principales metabolitos de degradación, DOPAC, HVA y 5-HIAA (ver Anexo: Publicación 7).

Se han encontrado diferencias en el metabolismo de la DA y la 5-HT vestibulares dependiendo de la cepa analizada. Y un metabolismo de DA más elevado en las hembras que en los machos de la misma cepa, igual que ocurre en la cóclea (Gil-Loyzaga y cols., 1993). Sin embargo la concentración de NA no se vio afectada por la cepa ni por el sexo de los animales (ver Anexo: Publicación 7).

Las localizaciones de la DA y la 5-HT en el vestíbulo no se conocen en la actualidad, y el presente trabajo no permite aclarar este punto porque fue realizado en homogeneizados de vestibulos completos. En comparación con la cóclea, podríamos hipotetizar que estos compuestos actúen como neurotransmisores de alguno de los sistemas de fibras eferentes que proyectan al vestíbulo: eferente vestibular, simpático u otro no descrito en la actualidad. En esas localizaciones podrían actuar como moduladores de las fibras aferentes vestibulares. Aunque no se debe olvidar la elevada concentración de 5-HT que se encuentra en la sangre, principalmente en las plaquetas sanguíneas (Anderson y cols., 1987; Kumar y cols., 1990; Pussard y cols., 1996).

Trabajos complementarios orientados a identificar la localización de estas monoaminas y su actividad en el vestíbulo podrían aportar información sobre el tratamiento de patologías vestibulares como el vértigo. De hecho esta alteración se ha observado que mejora cuando es tratada con agonistas dopaminérgicos (Cazals-Horner y cols., 1989), aunque el mecanismo de acción se desconoce.

# **CONCLUSIONES**

- 1.-La estimulación acústica con ruido blanco de intensidades comprendidas entre 70 y 110 dB SPL produce la disminución de la concentración de dopamina en la cóclea y el aumento de las concentraciones de sus metabolitos DOPAC y ácido homovanílico. Estos resultados indican que el ruido induce la degradación de la dopamina coclear y sugieren su liberación sináptica. El turnover basal de la dopamina coclear y el inducido por el ruido blanco son mayores en las hembras que en los machos de la misma cepa. El pretratamiento con piribedil, un agonista dopaminérgico de receptores D2/D3, disminuye las modificaciones inducidas por el ruido de las concentraciones cocleares de dopamina y sus metabolitos. Estos resultados sugieren que el piribedil bloquea la liberación de dopamina coclear inducida por la estimulación acústica.
- 2.-La perfusión por vía aórtica de una disolución anticoagulante es un método eficaz para eliminar la sangre presente en la cóclea. Su utilización conjugada con un método de HPLC permite analizar separadamente el metabolismo de la serotonina tisular de la cóclea del metabolismo global.
- 3.-La estimulación acústica con 90 dB SPL de ruido blanco disminuye la concentración de noradrenalina en la cóclea, aunque esta reducción es menor (aproximadamente un 18%) que la observada en la dopamina. Sin embargo, el metabolismo de la serotonina coclear no se modifica debido a la estimulación acústica con ruido blanco de 90 dB SPL.
- 4.-La ganglionectomía cervical superior disminuye drásticamente (aproximadamente 82%) la concentración de noradrenalina en las cócleas denervadas, sin modificar las concentraciones de dopamina, o sus metabolitos DOPAC y ácido homovanílico, o de serotonina. Este estudio permite indicar que la inervación simpática coclear proviene mayoritariamente del ganglio cervical superior y contiene fundamentalmente noradrenalina como neurotransmisor.



- 5.-**La serotonina presente en la cóclea puede provenir de dos fuentes principales: hemática y neural. La mayor parte de la serotonina coclear (aproximadamente el 76%) procede de la sangre. El 24% restante podría estar localizado en las fibras serotoninérgicas que inervan el receptor auditivo, cuyo origen y papel funcional son actualmente desconocidos.
- 6.-**Los vestíbulos de ratas pigmentadas y albinas, machos o hembras contienen dopamina y serotonina. El turnover de ambas sustancias es mayor en la cepa pigmentada, y en el caso de la dopamina en las hembras. Sin embargo, la concentración de noradrenalina en el vestíbulo es independiente del sexo de los animales y de la cepa estudiada.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Abou-Madi, L., Ponderotti, P., Tramu, G., Cupo, A. y Eybalin, M., Coexistence of putative neuroactive substances in lateral olivocochlear neurons in guinea pig and rat, *Hear. Res.*, 30 (1987) 135-146.
- Acworth, I.N., During, M.J. y Wurtman, R.J., Tyrosine: Effects on catecholamine release, *Brain Research Bulletin.*, 21 (1988) 473-477.
- Alonso-Solis, R., Neurotransmisores y neuromoduladores. En J.A.F. Tresguerres (Ed.), *Fisiología humana*, Interamericana McGraw-Hill, Madrid, 1993, pp. 63-86.
- Altar, C.A., Boyar, W.C., Oei, E. y Wood, P.L., Dopamine autoreceptors modulate the in vivo release of dopamine in the frontal, cingulate and entorhinal cortices, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242 (1987) 115-120.
- Altschuler, R.A., Fex, J., Parakkal, M.H. y Eckenstein, F., Colocalization of enkephalin-like and choline acetyltransferase-like immunoreactivities in olivocochlear neurons of the guinea pig, *J. Histochem. Cytochem.*, 32 (1984) 839-843.
- Altschuler, R.A., Hoffman, D.W., Reeks, K.A. y Fex, J., Localization of dynorphin B-like and alfa-neo-endorphin-like immunoreactivities in the guinea pig organ of Corti, *Hear. Res.*, 17 (1985b) 249-258.
- Altschuler, R.A., Reeks, K.A., Fex, J. y Hoffman, D.W., Lateral olivocochlear neurons contain both enkephalin and dinorphin immunoreactivities: immunocytochemical co-localization studies, *J. Histochem. Cytochem.*, 36 (1988) 797-802.

- Altschuler, R.A., Sheridan, C.E., Horn, J.W. y Wenthold, R.J., Immunocytochemical localization of glutamate immunoreactivity in the guinea pig cochlea, *Hear. Res.*, 42 (1989) 167-174.
- Altschuler, R.A., Kachar, B., Rubio, J.A., Parakkal, M.A. y Fex, J., Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the guinea pig cochlea, *Brain Res.*, 338 (1985a) 1-11.
- Amara, S.G. y Kuhar, M.J., Neurotransmitter transporters: recent progress, *Annu. Rev. Neurosci.*, 16 (1993) 73-93.
- Anderson, G.M., Feibel, F.C. y Cohen, D.J., Determination of serotonin in whole blood, platelet-rich plasma, platelet-poor plasma and plasma ultrafiltrate, *Life Sci.*, 40 (1987) 1063-1070.
- Aran, J.M. y Harrison R.V, Fisiología de la coclea. En Y. Guerrier y A. Uziel (Eds.), Fisiología neurosensorial en O.R.L., Masson, París, 1985, pp. 75-99.
- Arbogast, L.A. y Voogt, J.L., Hyperprolactinemia increases and hypoprolactinemia decreases tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nuclei, but not the substantia nigra or zona incerta, *Endocrinology*, 128 (1991) 997-1005.
- Arce, A., Papel de la prolactina y la inervación autonómica en los efectos de la ciclosporina sobre la respuesta inmunológica de los ganglios linfáticos submaxilares, Tesis Doctoral, Fac. Autónoma de Madrid, 1994.
- Aschoff, A. y Ostwald, J., Different origins of cochlear efferents in some bat species, rats and guinea pigs, *J. Comp. Neurol.*, 264 (1987) 56-72.

- Auerbach, S.B., Minzenberg, M.J. y Wilkinson, L.O., Extracellular serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in hypothalamus of the unanesthetized rat measured by in vivo dialysis coupled to high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: dialysate serotonin reflects neuronal release, *Brain Res.*, 499 (1989) 281-290.
- Baxter, G., Kennett, G., Blaney, F. y Blackburn, T., 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes: a family re-united?, *TIPS*, 16 (1995) 105-110.
- Beausang-Linder, M. y Hultcrantz, E., Early effects of cervical sympathetic stimulation on cerebral, ocular and cochlear blood flow, *Acta Physiol. Scand.*, 109 (1980) 433-437.
- Berglund, A.M. y Ryugo, D.K., Hair cell innervation by spiral ganglion in the mouse, *J. Comp. Neurol.*, 255 (1987) 560-570.
- Biesalski, H.K., Welker, H.A., Thalmann, R. y Vollrath, L., Melatonin and other serotonin derivatives in the guinea pig membranous cochlea, *Neurosci. Lett.*, 91 (1988) 41-46.
- Bloom, F.E., Neurotransmission and the central nervous system, En J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon y A. Goodman Gilman (Eds.), *The pharmacological basis of therapeutics*, McGraw-Hill, Nueva York, 1996, pp. 267-293.
- Bobbin, R.P. y Thompson, M.H., Effects of putative transmitters on afferent cochlear transmission, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 87 (1978) 185-190.
- Bock, R.M. y Steel, K.P., Use of albino animals for auditory research. *Hear. Res.*, 13 (1984) 201-202.

- Boess, F.G. y Martin, I.L., Molecular biology of 5-HT receptors, *Neuropharmacology*, 33 (1994) 275-317.
- Bonvento, G., Lacombe, P., MacKenzie, E.T., Fage, D., Benavides, J., Rouquier, L. y Scatton, B., Evidence for differing origins of the serotonergic innervation of major cerebral arteries and small pial vessels in the rat, *J. Neurochem.*, 56 (1991) 681-689.
- Borg, E., Physiological and pathogenic effects of sound, *Acta Otolaryngol. (Suppl.)*, 381 (1981) 1-68.
- Borg, E., Protective value of sympathectomy of the ear in noise, *Acta Physiol. Scand.*, 115 (1982) 281-282.
- Brodal, A., The cranial nerves. En A. Brodal (Ed.), *Neurological anatomy*, Oxford University Press, New York, 1981, pp. 448-577.
- Brown, M.C., Morphology of labeled afferent fibers in the guinea pig cochlea, *J. Comp. Neurol.*, 260 (1987) 591-604.
- Brown, M.C. y Ledwith, J.V., Projections of thin (type-II) and thick (type-I) auditory-nerve fibers into the cochlear nucleus of the mouse, *Hear. Res.*, 49 (1990) 105-118.
- Brown, M.C., Pierce, S. y Berglund, A.M., Cochlear nucleus branches of thick (medial) olivocochlear fibers in the mouse: A cochleotopic projection, *J. Comp. Neurol.*, 303 (1991) 300-315.
- Brown, M.C., Berglund, A. M., Kiang, N.Y.-S y Ryugo, D.K., Central trajectories of type II spiral ganglion neurons, *J. Comp. Neurol.*, 278 (1988) 581-590.
- Brownell, W.E., Bader, C.R., Bertrand, D. y De Ribaupierre, Y., Evoked mechanical responses of isolated outer hair cells, *Science*, 227 (1985) 194-196.

- Buhot, M.C., Serotonin receptors in cognitive behaviors, *Curr. Op. Neurobiol.*, 7 (1997) 243-254.
- Bulloch, J.M. y Starke, K., Presynaptic alfa2-autoinhibition in a vascular neuroeffector junction where ATP and noradrenaline act as co-transmitters, *Br. J. Pharmacol.*, 99 (1990) 279-284.
- Butterworth, R.F., Poignant, J.C. y Barbeau, A., Apomorphine and piribedil in rats: biochemical and pharmacological studies, *Adv. Neurol.*, 9 (1975) 307-326.
- Cagnotto, A., Parotti, L. y Mennini, T., In vitro affinity of piribedil for dopamine D3 receptor subtypes, an autoradiographic study, *Eur. J. Pharmacol.*, 313 (1996) 63-67.
- Campbell, J.P. y Henson, M.M., Olivocochlear neurons in the brainstem of the mouse, *Hear. Res.*, 35 (1988) 271-274.
- Cant, N.B. y Casseday, J.H., Projections from the anteroventral cochlear nucleus to the lateral and medial superior olivary nuclei, *J. Comp. Neurol.*, 247 (1986) 457-476.
- Carlisle, L., Aberdeen, J., Forge, A. y Burnstock, G., Neural basis for regulation of cochlear blood flow: peptidergic and adrenergic innervation of the spiral modiolar artery of the guinea pig, *Hear. Res.*, 43 (1990) 107-114.
- Castner, S.A., Xiao, L. y Becker, J.B., Sex differences in striatal dopamine: in vivo microdialysis and behavioral studies, *Brain Res.*, 610 (1993) 127-134.
- Castro, S.W. y Strange, P.G., Coupling of D2 and D3 dopamine receptors to G-proteins, *FEBS*, 315 (1993) 223-226.
- Cazals, Y., Reception acoustique par le saccule, *Rev. Laryngol.*, 104 (1983) 173-177.

- Cazals, Y., Erre, J.P. y Arousseau, C., Eighth nerve auditory evoked responses recorded at the base of the vestibular nucleus in the guinea pig, *Hear. Res.*, 31 (1987) 93-98.
- Cazals, Y., Aran, J.M., Erre, J.P., Guilhaume, A. y Arousseau, C., Vestibular acoustic reception in the guinea pig: a saccular function?, *Acta Otolaryngol.*, 95 (1983) 211-217.
- Cazals-Horner, K., Cazals, Y. y Arousseau C., Trivastal et oreille: études expérimentales chez le cobaye, *Arch. Otolaryngol.*, Hors-série, (1989) 37-44.
- Cerrito, F., Aloisi, G. y Arminio, P., Age-related changes in rat brain monoamines release: peculiarity of dopamine release, *J. Neurosci. Res.*, 34 (1993) 364-370.
- Chang, J.Y., Owman, C. y Steinbusch, H.W.M., Evidence for the coexistence of serotonin and noradrenaline in sympathetic nerves supplying brain vessels of guinea pig, *Brain Res.*, 438 (1988) 237-246.
- Chang, J.Y., Ekblad, E., Kannisto, P. y Owman, C., Serotonin uptake into cerebrovascular nerve fibers of rat, visualization by immunohistochemistry, disappearance following sympathectomy, and release during electrical stimulation, *Brain Res.*, 492 (1989) 79-88.
- Cheramy, A., Romo, R., Godeheu, G., Baruch, P. y Glowinski, J., In vivo presynaptic control of dopamine release in the cat caudate nucleus-II. Facilitatory or inhibitory influence of L-glutamate, *Neuroscience*, 19 (1986) 1081-1090.
- Chesselet, M.F., Presynaptic regulation of neurotransmitter release in the brain: facts and hypothesis, *Neuroscience*, 12 (1984) 347-375.



- Church, M.W., Williams, H.L. y Holloway, J.A., Brain-stem auditory evoked potentials in the rat: effects of gender, stimulus characteristics and ethanol sedation, *Electroencephalog. Clin. Neurophysiol.*, 59 (1984) 328-339.
- Civelli, O., Bunzow, J.R. y Grandy, D.K., Molecular diversity of the dopamine receptors, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32 (1993) 281-307.
- Cody, A.R. y Rusell, I.J., Outer hair cells in the mammalian cochlea and noise-induced hearing loss, *Nature Lond.*, 315 (1985) 662-664.
- Cohen, Z., Bonvento, G., Lacombe, P., Seylaz, J., MacKenzie, E.T. y Hamel, E., Cerebrovascular nerve fibers immunoreactive for triptophan-5-hydroxylase in the rat: distribution, putative origin and comparison with sympathetic noradrenergic nerves, *Brain Res.*, 598 (1992) 203-214.
- Comis, S.D. y Leng, G., Action of putative neurotransmitters in the guinea pig cochlea, *Exp. Brain Res.*, 36 (1979) 119-128.
- Corrodi, H., Farnebo, L.O., Fuxe, K., Hamburger, B. y Ungerstedt, U., ET 495 (piribedil) and brain catecholamine mechanisms: evidence for stimulation of dopamine receptors, *Eur. J. Pharmacol.*, 20 (1972) 195-204.
- Corti, A., Recherches sur l'organe de l'ouï des mammifères, *Zeitschr. Wiss. Zool.*, 3 (1851) 109-169.
- Corwin, J.T. y Warchol, M.E., Auditory hair cells: structure, function, development and regeneration, *Ann. Rev. Neurosci.*, 14 (1991) 301-333.
- Costall, B. y Naylor, R.J., The site and mode of action of ET 495 (piribedil) for the mediation of stereotyped behaviour in the rat, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 278 (1973) 117-133.

- Costentin, J., Les r,cepteurs dopaminergiques c,r,braux. En A. Picot. (Ed.), Interactions Chimie-Biologie, Bases Moléculaires-Applications I (Neuropharmacologie), Ed. INSERM, Paris, 1988, pp. 167-200.
- Cransac, H., Peyrin, L., Farhat, F., Cottet-Emard, J.M., Pequignot, J.M. y Reber, A., Effect of hemilabyrinthectomy on monoamine metabolism in the medial vestibular nucleus, locus coeruleus, and other brainstem nuclei of albino and pigmented rats, *J. Ves. Res.*, 6 (1996) 243-253.
- Culebras-Poza, J.M., Metabolismo de la serotonina en el S.N.C., En M.P. González, A.M. Pascual-Leone, M.J. López, B.Ribas, J.M. Culebras y M.T. Miras (Eds.), Curso monográfico sobre neuroquímica, Ed. Univ. Complutense, Madrid, 1985, pp. 227-250.
- Cumming, P., Brown, E., Damsma, G. y Fibiger, H., Formation and clearance of interstitial metabolites of dopamine and serotonin in the rat striatum: an in vivo microdialysis study, *J. Neurochem.*, 59 (1992) 1905-1914.
- D'Aldin, C., Puel, J.L., Leducq, R., Crambes, O., Eybalin, M. y Pujol, R., Effects of a dopaminergic agonist in the guinea pig cochlea, *Hear. Res.*, 90 (1995) 202-211.
- Dannhof, B.J. y Bruns, V., The innervation of the organ of Corti in the rat, *Hear. Res.*, 66 (1993) 8-22.
- Dechesne, C., Raymond, J. y Sans, A., The efferent vestibular system in the cat: a horseradish peroxidase and fluorescent retrograde tracers study, *Neuroscience*, 11 (1984) 893-901.

- Demèmes, D., Raymond, J. y Sans, A., Selective retrograde labeling of neurons of the cat vestibular ganglion with [3H]D-aspartate, *Brain Res.*, 304 (1984) 188-191.
- Demèmes, D., Wenthold, R.J., Moniot, B. y Sans, A., Glutamate-like immunoreactivity in the peripheral vestibular system of mammals, *Hear. Res.*, 46 (1990) 261-270.
- Denk, D.M. y Ehrenberger, K., A neuropharmacology for tinnitus, 25 Ordinary Congress of the N.E.S., Bad Kissingen, Alemania, 1998, pg. 5.
- Densert, O., Adrenergic innervation in the rabbit cochlea, *Acta Otolaryngol.*, 78 (1974) 345-356.
- Densert, O., The effect of 6-hydroxydopamine on the rabbit cochlea, *Acta Otolaryngol.*, 79 (1975a) 339-351.
- Densert, O., A fluorescence and electron microscopic study of the adrenergic innervation in the vestibular ganglion and sensory areas, *Acta Otolaryngol.*, 79 (1975b) 96-107.
- Densert, O. y Flock, A., An electron-microscopic study of adrenergic innervation in the cochlea, *Acta Otolaryngol.*, 77 (1974) 185-197.
- Dluzen, D. y Ramirez, V.D., In vitro dopamine release from the rat striatum: diurnal rhythm and its modification by the estrous cycle, *Neuroendocrinology*, 41 (1985) 97-100.
- Drescher, M.J., Drescher, D.G., y Medina, J.E. Effects of sound stimulation at several levels on concentrations of primary amines, including neurotransmitter candidates in perilymph of the guinea pig inner ear, *J. Neurochem.*, 41 (1983) 309-320.

- Dulon, D. y Aran, J.M., Aspects cellulaires et moléculaires de la transduction mécano-electrique dans l'oreille interne, *Synthèse*, 6 (1990) 744-754.
- Dulon, D. y Lenoir, M., Cholinergic responses in developing outer hair cells of the rat cochlea, *Eur. J. Neurosci.*, 8 (1996) 1945-1952.
- Eriksson, B.M. y Persson, B.A., Determination of catecholamines in rat heart tissue and plasma samples by liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr.*, 228 (1982) 143-154.
- Esquifino, A.I., Fernández, J.F., Bartke, A., Agrasal, C., Steger, R. y Cebeira, M., Prolactin increases norepinephrine and dopamine turnover in the median-eminence of hypophysectomized female rats, *Neuroendocrinol. Lett.*, 9 (1987) 5-14.
- Evans, P.H., Comis, S.D., Osborne, M.P., Pickles, J.O. y Jeffries, D.J.R., Cross-links between stereocilia in the human organ of Corti, *J. Laryngol. Otol.*, 99 (1985) 11-19.
- Eybalin, M., Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea, *Physiol. Rev.*, 73 (1993) 309-373.
- Eybalin, M. y Altschuler, R.A., Immunoelectron microscopic localization of neurotransmitters in the cochlea, *J. Electron Microsc. Tech.*, 15 (1990) 209-224.
- Eybalin, M., Cupo, A. y Pujol, R., Met-enkephalin characterization in the cochlea: high performance liquid chromatography and immunoelectron microscopy, *Brain Res.*, 305 (1984) 313-322.

- Eybalin, M., Cupo, A. y Pujol, R., Met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 in the organ of Corti: high performance liquid chromatography and immunoelectron microscopy, *Brain Res.*, 331 (1985) 389-395.
- Eybalin, M., Rebillard, G., Jarry, T.H. y Cupo, A., Effect of noise level on the Met-enkephalin content of the guinea pig cochlea, *Brain Res.* 418 (1987) 189-192.
- Eybalin, M. y Pujol, R., A radioautographic study of [3H] L-glutamate and [3H] L-glutamine uptake in the guinea pig cochlea, *Neuroscience*, 9 (1983) 863-871.
- Eybalin, M. y Pujol, R., Choline acetyltransferase (ChAT) immunoelectron microscopy distinguishes at least three types of efferent synapses in the organ of Corti, *Exp. Brain Res.*, 65 (1987) 261-270.
- Eybalin, M. y Pujol, R., Cochlear neuroactive substances, *Arch. Oto-Rhino-Laryngol.*, 246 (1989) 228-234.
- Eybalin, M., Calas, A. y Pujol, R., Radioautographic study of the sympathetic fibers in the cochlea, *Acta Otolaryngol.*, 96 (1983) 69-74.
- Eybalin, M., Charachon, G. y Renard, N., Dopaminergic lateral efferent innervation of the guinea-pig cochlea: immunoelectron microscopy of catecholamine-synthesizing enzymes and effect of 6-hydroxydopamine, *Neuroscience*, 54 (1993) 133-142.
- Eybalin, M., Parnaud, C., Geffard, M. y Pujol, R., Immunoelectron microscopy identifies several types of GABA-containing efferent synapses in the guinea-pig organ of Corti, *Neuroscience*, 24 (1988) 29-38.

- Eybalin, M., Safieddine, S., D'Aldin, C.G., Pujol, R. y Puel, J.L., Molecular mechanisms involving neurotransmitters after excitotoxicity at the inner hair cell-auditory nerve synapse. En A. Flock, D. Ottoson y M. Ulfendahl (Eds.), *Active Hearing*, Pergamon Press, Amsterdam, 1995, pp. 73-85.
- Falardeu, P y Di Paolo, T, *Regional effect of estradiol on rat caudate-putamen dopamine receptors: lateral-medial differences*, *Neurosci. Lett.*, 74 (1987) 43-48.
- Farnebo, L.O. y Hamberger, B., *Drug-induced changes in the release of 3H-monoamines from field stimulated rat brain slices*, *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 371 (1971) 35-44.
- Felix, D. y Ehrenberger, K., *The efferent modulation of mammalian inner hair cell afferents*, *Hear. Res.*, 64 (1992) 1-5.
- Fex, J. y Altschuler, R.A., *Enkephalin-like immunoreactivity of olivocochlear nerve fibers in cochlea of guinea pig and cat*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 (1981) 1255-1259.
- Fex, J. y Altschuler, R.A., *Glutamic acid decarboxylase immunoreactivity of olivocochlear neurons in the organ of Corti of guinea pig and rat*, *Hear. Res.*, 15 (1984) 123-131.
- Fex, J., Altschuler, R.A., Kachar, B., Wenthold, R.J. y Zempel, J.M., *GABA visualized by immunocytochemistry in the guinea pig cochlea in axons and endings of efferent neurons*, *Brain Res.*, 366 (1986) 106-117.
- Fisher, S.K., Heacock, A.M. y Agranoff, B.W., *Inositol lipids and signal transduction in the nervous system: an update*, *J. Neurochem.*, 58 (1992) 18-38.

- Fujita, S., Usami, S.I., Shinkawa, H., Sato, K., Kiyama, H. y Tohyama, M.,  
*Expression of NMDA receptor subunit mRNA in the vestibular ganglion of the  
rat and guinea-pig*, *NeuroReport*, 5 (1994) 862-864.
- Fuchs, P.A., *Ionic currents in cochlear hair cells*, *Prog. Neurobiol.*, 39 (1992) 493-  
505.
- Furness, D.H. y Hackney, C.M., *High-resolution scanning-electron microscopy of  
stereocilia using the osmium-thiocarbohydrazide coating technique*, *Hear. Res.*,  
21 (1986) 243-249.
- Gacek, R.R. y Lyon, M., *The localization of vestibular efferent neurons in the kitten  
with hoseradish peroxidase*, *Acta Otolaryngol.* 77 (1974) 92-101.
- Galloway, M.P., Wolf, M.E. y Roth, R.H., *Regulation of dopamine synthesis in the  
medial prefrontal cortex is mediated by release modulating autoreceptors:  
studies in vivo*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236 (1986) 689-698.
- Gayrard, V., Malpoux, B. y Thierry, J.C., *Oestradiol increases the extracellular levels  
of amine metabolites in the ewe hypothalamus during anoestrus: a  
microdialysis study*, *J. Endocrinology*, 135 (1992) 421-430.
- Gil-Loyzaga, P., *Dopamine is a putative neuromodulator in the auditory receptor*,  
1st. Inner Ear Neuropharmacology Symposium, 1994, Montpellier, Francia, pg.  
4.
- Gil-Loyzaga, P., *Neurotransmitters of the olivocochlear lateral efferent system: with  
an emphasis on dopamine*, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 115 (1995) 222-  
226.
- Gil-Loyzaga, P., *Histochemistry of glycoconjugates of the auditory receptor.  
Functional implications*, *Prog. Histochem. Cytochem.*, 32 (1997) 1-80.

- Gil-Loyzaga, P. y Parés-Herbute, N., Presence of noradrenaline and dopamine in the adult and developing rat cochlea, *Neurosci. Lett. Suppl.*, 26 (1986) 134.
- Gil-Loyzaga, P. y Parés-Herbute, N., HPLC detection of dopamine and noradrenaline in the cochlea of adult and developing rats, *Devl. Brain Res.*, 48 (1989) 157-160.
- Gil-Loyzaga, P. y Pujol, R., Kainic acid toxicity on cochlear type I neurons, *Otorhinolaryngol. Head Neck Surgery*, (1990) 37-39.
- Gil-Loyzaga, P. y Pujol, R., Fisiología de la audición. En J.A.F. Tresguerres (Ed.), *Fisiología humana*, Interamericana McGraw-Hill, Madrid, 1993, pp. 294-314.
- Gil-Loyzaga, P., Bartolomé, M.V. y Vicente-Torres, M.A., Serotonergic innervation of the organ of Corti of the cat cochlea, *NeuroReport*, 8 (1997) 3519-3522.
- Gil-Loyzaga, P., Cupo, A. y Eybalin, M., Met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 immunofluorescence in the developing guinea pig organ of Corti, *Dev. Brain Res.*, 42 (1988) 142-145.
- Gil-Loyzaga, P., Gabrion, J. y Uziel, A., Lectins demonstrate the presence of carbohydrates in the tectorial membrane of mammalian cochlea, *Hear. Res.*, 20 (1985) 1-8.
- Gil-Loyzaga, P., Merchán, M. y Collia, F.P., The ultrastructure of the spiral ligament of the rodent cochlea, *Acta Microscopica*, 10 (1987) 399-408.
- Gil-Loyzaga, P., Raymond, J. y Gabrion J., Carbohydrates detected by lectins in the vestibular organ, *Hear. Res.*, 18 (1985) 269-272.



- Gil-Loyzaga, P., Hernández-Ortiz, M.J., Rodríguez-Benito, T. y Lasso de la Vega, M., Diltiazem protects against neurotoxicity induced by excitotoxic amino acids on cochlear afferent fibers, *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, 55 (1993) 211-215.
- Gil-Loyzaga, P., Gabrion, J., Remezal, M., Nguyen-Thao-Dao, B. y Uziel, A., Incorporation of D-[3H]-glucosamine and L-[3H]-fucose into the developing rat cochlea, *Hear. Res.*, 57 (1991) 38-44.
- Gil-Loyzaga, P., Poch-Broto, J., Vicente-Torres, M.A., Bartolomé, M.V., Carricondo, F., San Román, J. y Jiménez, L., GABA, dopamine and serotonin in the cochlear innervation. Models of protection against neurotoxicity, *Proceedings of the cochlear pharmacology and noise trauma Symposium, The Novartis Foundation, Londres, 1998*, pp. 1-30 (en prensa).
- Gingrich, J.A. y Caron, M.G., Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors, *Annu. Rev. Neurosci.*, 16 (1993) 299-321.
- Ginzberg, R.D. y Morest, D.K., Fine structure of cochlear innervation in the cat, *Hear. Res.*, 14 (1984) 109-127.
- Giros, B. y Caron, M.G., Molecular characterization of the dopamine transporter, *TIPS*, 14 (1993) 43-49.
- Gitter, A.H. y Zenner, H.P., Gamma aminobutyric acid receptor activation of outer hair cells in the guinea pig cochlea, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 249 (1992) 62-65.
- Godfrey, D.A. y Ross, C.D., Enzymes of acetylcholine metabolism in the rat cochlea, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 94 (1985) 409-414.

- Godfrey, D.A., Park, J.L. y Ross, C.D., Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in centrifugal labyrinthine bundles of rats, *Hear. Res.*, 14 (1984) 93-106.
- Godfrey, D.A., Park-Hellendal, J.L., Dunn, J.D. y Ross, C.D., Effect of olivocochlear bundle transection on choline acetyltransferase activity in the rat cochlear nucleus, *Hear. Res.* 28 (1987a) 237-251.
- Godfrey, D.A., Park-Hellendal, J.L., Dunn, J.D. y Ross, C.D., Effects of trapezoid body and superior olive lesions on choline acetyltransferase activity in the rat cochlear nucleus, *Hear. Res.* 28 (1987b) 253-270.
- Goldberg, J.M. y Fernández, C., Efferent vestibular system in the squirrel monkey: anatomical location and influence on afferent activity, *J. Neurophysiol.*, 43 (1980) 986-1025.
- Grandy, D.K. y Civelli, O., G-protein-coupled receptors: the new dopamine receptor subtypes, *Current Op. Neurobiol.*, 2 (1992) 275-281.
- Guinan, J.J., Barr, W.B. y Norris, B.E., Differential olivocochlear projections from lateral versus medial zones of the superior olivary complex, *J. Comp. Neurol.*, 221 (1983) 358-370.
- Guinan, J.J., Barr, W.B. y Norris, B.E., Topographic organization of the olivocochlear projections from the lateral and medial zones of the superior olivary complex, *J. Comp. Neurol.*, 226 (1984) 21-27.
- Hall, M.D., Jenner, P. y Marsden, C.D., Differential labelling of dopamine receptors in rat brain in vivo: comparison of 3H-piribedil, 3H-S3608 y 3H-N,n-propylnorapomorphine, *Eur. J. Pharmacol.*, 87 (1983) 85-94.

- Häppölä, O., 5-hydroxytryptamine-immunoreactive neurons and nerve fibers in the superior cervical ganglion of the rat, *Neuroscience*, 27 (1988) 301-307.
- Harper, A., Blythe, W.R., Grossman, G., Petrusz, P., Prazma, J. y Pillsbury, H.C., Immunocytochemical localization of aspartate and glutamate in the peripheral vestibular system, *Hear. Res.*, 86 (1995) 171-182.
- Hartig, P.R., Branchek, T.A. y Weinshank, R.L., A subfamily of 5-HT<sub>1D</sub> receptor genes, *TIPS*, 113 (1992) 152-159.
- Hartig, P.R., Hoyer, D., Humphrey, P.P.A. y Martin, G.R., Alignment of receptor nomenclature with the human genome: classification of 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptor subtypes, *TIPS*, 17 (1996) 103-105.
- Helfert, R.H., Wenthold, R.J., Altschuler, R.A. y Bonneau, J.M., GABA and glycine immunoreactivity in the quinea pig superior olivary complex, *Brain Res.*, 501 (1989) 269-286.
- Hildesheimer, M., Sharon, R., Muchnik, C., Sahartov, E. y Rubinstein, M., The effect of bilateral sympathectomy on noise induced temporary threshold shift, *Hear. Res.*, 51, (1991) 49-54.
- Hope, A.G., Downie, D.L., Sutherland, L., Lambert, J.J., Peters, J.A. y Burchell, B., Cloning and functional expression of an apparent splice variant of the murine 5-HT<sub>3</sub> receptor A subunit, *Eur. J. Pharmacol.-Mol. Pharmacol. Sect.*, 245 (1993) 187-192.
- Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R. y Humphrey, P.P.A., International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin), *Pharmacol. Rev.*, 46 (1994) 157-203.

- Hozawa, K. y Kimura, R.S., Vestibular sympathetic nervous system in guinea pig, *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 107 (1989) 171-181.
- Hozawa, K. y Kimura, R.S., Cholinergic and noradrenergic nervous systems in the cynomolgus monkey cochlea, *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 110 (1990) 46-55.
- Hozawa, K. y Takasaka, T., Catecholaminergic innervation in the vestibular labyrinth and vestibular nucleus of guinea pigs, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 503 (1993a) 111-113.
- Hozawa, K. y Takasaka, T., Sympathetic and CGRP-positive nerve supply to the endolymphatic sac of guinea pig, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 506 (1993b) 14-17.
- Hozawa, K., Takasaka, T. y Kimura, R.S., Vestibular sympathetic nervous system in guinea pig, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 481 (1991) 95-96.
- Hultcrantz, E., The effect of noise on cochlear blood flow in the conscious rabbit, *Acta Physiol. Scand.*, 106 (1979) 29-37.
- Hultcrantz, E., Nuttall, A.L., Brown, M.C. y Lawrence, M., The effect of cervical sympathectomy on cochlear electrophysiology, *Acta Otolaryngol.*, 94 (1982) 439-444.
- Hunter, C., Doi, K. y Wenthold, R.J., Neurotransmission in the auditory system, *Mol. Biol. Gen.*, 25 (1992) 1027-1052.
- Husek, P. y Malikova, J., The influence of mobile phase acidity and counterion type and concentration on the retention behaviour of urinary catecholamines and sample impurities in ion-pair reversed-phase liquid chromatography, *J. Liquid Chromatog.*, (1990) 3351-3361.

- Ibáñez, A., Rodríguez-Ramos, A., Bartolomé, M., Valderrama, F., Remezal, M., Micó, C., Dargallo, J. y Salmeán, J., Glycoconjugates as components of the tectorial membrane of the human fetal cochlea. En S. Iurato y J.E. Veldman (Eds.), *Progress in human auditory and vestibular histopathology*, Kugler Publications, Amsterdam, 1997, pp. 153-156.
- Illes, P., Mechanisms of receptor-mediated modulation of transmitter release in noradrenergic, cholinergic and sensory neurones, *Neuroscience*, 17 (1986) 909-928.
- Irvine, D.R.F., The auditory brainstem. En H. Autrum, D. Ottoson, E.R. Perl, R.F. Schmidt, H. Shimazu y W.D. Willis (Eds.), *Progress in sensory physiology*, Springer-Verlag, Berlin, 1986.
- Iurato, S., Electron optical structure of the inner ear membranes in reference to their suitability for metabolic interchange, *Arch. Klin. Exp. Ohren Nasen Kehlkopfheilkd*, 189 (1967) 113-126.
- Iurato, S., Luciano, L., Panesse, E. y Reale, E., Histochemical localization of acetylcholinesterase (AChE) activity in the inner ear, *Acta Otolaryngol. Suppl.*, 279 (1971) 1-50.
- Jerger, J. y Hall, J., Effects of age and sex on auditory brainstem response, *Arch. Otolaryngol.*, 106 (1980) 387-391.
- Johnson, D.S. y Heinemann, S.F., Embryonic expression of the 5-HT<sub>3</sub> receptor subunit, 5-HT<sub>3R-A</sub>, in the rat: an in situ hybridization study, *Mol. Cell. Neurosci.*, 6 (1995) 122-138.

- Jonason, J. y Rutledge, C.O., The effect of protriptyline on the metabolism of dopamine and noradrenaline in rabbit brain in vitro, *Acta Physiol. Scand.*, 73 (1968) 161-175.
- Jones, B.E. y Beaudet, A., Distribution of acetylcholine and catecholamine neurons in the cat brainstem: A choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase immunohistochemical study, *J. Comp. Neurol.*, 261 (1987) 15-32.
- Jones, N., Fex, J. y Altschuler, R.A., Tyrosine hydroxylase immunoreactivity identifies possible catecholaminergic fibers in the organ of Corti, *Hear. Res.*, 30 (1987) 33-38.
- Juiz, J.M., Rueda, J., Merchán, J.A. y Sala, M.L., The effects of kainic acid on the cochlear ganglion of the rat, *Hear. Res.*, 40 (1989) 65-74.
- Julius, D., Molecular biology of serotonin receptors, *Annu. Rev. Neurosci.*, 14 (1991) 335-360.
- Kahle, W., Organos de la audición y del equilibrio. En W. Kahle, H. Leonhardt y W. Platzer (Eds.), *Atlas de Anatomía. Tomo 3: Sistema nervioso y órganos de los sentidos*, Ediciones Omega, Barcelona, 1995, pp. 334-355.
- Kaibara, A., Hohda, C., Hirata, N., Hirose, M. y Nakagawa, T., Evaluation of solute hydrophobicity by reversed-phase high performance liquid chromatography using aqueous binary mobile phases, *Chromatographia*, 29 (1990) 275-288.
- Kelly, D.M. y Naylor, R.J., The importance of extrapyramidal function for the induction and antagonism of harmine tremor, *Eur. J. Pharmacol.*, 32 (1975) 76-86.
- Kempf, E. y Mandel, P., Reverse-phase high performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of norepinephrine, dopamine, serotonin, and related major metabolites, *Anal. Biochem.*, 112 (1981) 223-231.

- Kiang, N.Y.S., Rho, J.M., Northrop, C.C., Liberman, M.C. y Ryugo, D.K., Hair-cell innervation by spiral ganglion cells in adult cat, *Science Wash. DC.*, 217 (1982) 175-177.
- Kilpatrick, I.C., Jones, M.W. y Phillipson, O.T., A semiautomated analysis method for catecholamines, indoleamines, and some prominent metabolites in microdissected regions of the nervous system: an isocratic HPLC technique employing coulometric detection and minimal sample preparation, *J. Neurochem.*, 46 (1986) 1865-1876.
- Kimura, R., Hairs of the cochlear sensory cells and their attachment to the tectorial membrane, *Acta Otolaryngol.*, 61 (1965) 55-72.
- Kissinger, P.T., Refshauge, C., Dreiling, R. y Adams, R.N., An electrochemical detector for liquid chromatography with picogram sensitivity, *Anal. Lett.*, 6 (1973) 465-477.
- Klinke, R., Neurotransmitters in the cochlea and the cochlear nucleus, *Acta Otolaryngol.*, 91 (1981) 541-554.
- Kopin, I.J., Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance, *Pharmacol. Rev.*, 37 (1985) 333-364.
- Kujawa, S.G., Glatke, T.J., Fallon, M. y Bobbin, R.P., Intracochlear application of acetylcholine alters sound-induced mechanical events within the cochlear partition, *Hear. Res.*, 61 (1992) 106-116.
- Kumar, A.M., Kumar, M., Deepika, K., Fernandez, J.B. y Eisdorfer, C., A modified HPLC technique for simultaneous measurement of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid, platelet and plasma, *Life Sci.*, 47 (1990) 1751-1759.

- Kuriyama, H., Albin, R.L. y Altschuler, R.A., Expression of NMDA-receptor messenger RNA in the rat cochlea, *Hear. Res.*, 69 (1993) 215-220.
- Kuriyama, H., Shiosaka, S., Sekitani, M., Tohyama, Y., Kitajiri, M., Yamashita, T., Kumazawa, T. y Tohyama, M., Electron microscopic observation of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the organ of Corti of the rat, *Brain Res.*, 517 (1990) 76-80.
- Ladinsky, H., Consolo, S. y Garatini, S., Increase in striatal acetylcholine levels "in vivo" by piribedil: a new dopamine receptor stimulant, *Life Sci.*, 14 (1974) 251-260.
- Langer, S.Z., Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release, *Br. J. Pharmacol.*, 60 (1977) 481-497.
- Langer, S.Z., Presynaptic regulation of the release of catecholamines, *Pharmacol. Rev.*, 32 (1981) 337-362.
- Laurikainen, E.A., Ren, T., Miller, J.M., Nuttall, A.L. y Quirk, W.S., The tonic sympathetic input to the cochlear vasculature in guinea pig, *Hear. Res.*, 105 (1997) 141-145.
- Laurikainen, E.A., Kim, D., Didier, A., Ren, T., Miller, J.M., Quirk, W.S. y Nuttall, A.L., Stellate ganglion drives sympathetic regulation of the cochlear blood flow, *Hear. Res.*, 64 (1993) 199-204.
- Laurikainen, E.A., Costa, O., Miller, J.M., Nuttall, A.L., Ren, T.Y., Masta, R., Quirk, W.S. y Robinson, P.J., Neuronal regulation of cochlear blood flow in the guinea-pig, *J. Physiol.*, 480 (1994) 563-573.
- Lee, A.H. y Moller A.R., Effects of sympathetic stimulation on the round window compound action potential in the rat, *Hear. Res.*, 19 (1985) 127-134.



- Lefkowitz, R.J., Cotecchia, S., Samama, P. y Costa, T., Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins, *TIPS*, 14 (1993) 303-307.
- Le Page, E.L., Functional role of the olivo-cochlear bundle: A motor unit control system in the mammalian cochlea, *Hear. Res.*, 38 (1989) 177-198.
- Lester, H.A., Mager, S., Quick, M.W. y Corey, J.L., Permeation properties of neurotransmitter transporters, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34 (1994) 219-249.
- Levich, V.G., *Physicochemical hydrodynamics*, Prentice Hall, Nueva York, 1962.
- Li Kam Wa, T.C., Burns, N.J.T., Williams, B.C., Freestone, S. y Lee, M.R., Blood and urine 5-hydroxytryptophan and 5-hydroxytryptamine levels after administration of two 5-hydroxytryptamine precursors in normal man, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 39 (1995) 327-329.
- Liberman, M.C., Auditory-nerve responses from cats raised in low noise chamber, *J. Acoust. Soc. Am.*, 63 (1978) 442-445.
- Liberman, M.C., Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: An electron microscopic study of serial sections, *Hear. Res.*, 3 (1980a) 45-63.
- Liberman, M.C. Efferent synapses in the inner hair cell area of the cat cochlea: an electron microscopic study of serial section, *Hear. Res.*, 3 (1980b) 189-204.
- Liberman, M.C., Single-neuron labelling in the cat auditory nerve, *Science Wash. DC.*, 216 (1982a) 1239-1241.

- Lieberman, M.C., The cochlear frequency map for the cat: Labelling auditory nerve fibers of known characteristic frequency, *J. Acoust. Soc. Am.*, 72 (1982b) 1441-1449.
- Lieberman, M.C. y Oliver, M.E., Morphometry of intracellularly labeled neurons of the auditory nerve: Correlation with functional properties, *J. Comp. Neurol.*, 223 (1984) 163-176.
- Lieberman, M.C., Dodds, L.W. y Pierce, S., Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: Quantitative analysis with light and electron microscopy, *J. Comp. Neurol.*, 301 (1990) 443-460.
- López, I., Juiz, J.M., Altshuler, R.A. y Meza, G., Distribution of GABA-like immunoreactivity in guinea pig vestibular cristae ampullaris, *Brain Res.*, 530 (1990) 170-175.
- López, I., Wu, J.Y. y Meza, G., Immunocytochemical evidence for an afferent GABAergic neurotransmission in the guinea pig vestibular system, *Brain Res.*, 589 (1992) 341-348.
- Lu, S.M., Schweitzer, L., Cant, N.B. y Dawbarn N.B., Immunoreactivity to calcitonin gene-related peptide in the superior olivary complex and cochlea of cat and rat, *Hear. Res.*, 31 (1987) 137-146.
- Lysakowski, A. y Goldberg, J.M., A regional ultrastructural analysis of the cellular and synaptic architecture in the chinchilla cristae ampullares, *J. Comp. Neurol.*, 389 (1997) 419-443.
- MacKinnon, P.C.B. y Morris, J.F., El oído, En P.C.B. MacKinnon y J.F. Morris (Eds.), *Anatomía funcional. Volumen III: Cabeza y cuello*, Panamericana, Colombia, 1993, pp. 131-139.

- Marco, R.A.W., Hoffman, L.F., Wackym, P.A., Micevych, P.E. y Popper, P.,  
*Distribution of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in vestibular efferent neurons of the chinchilla*, *Hear. Res.*, 97 (1996) 95-101.
- Matsubara, A., Usami, S.I., Fujita, S. y Shinkawa, H., *Expression of substance P, CGRP, and GABA in the vestibular periphery, with special reference to species differences*, *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 519 (1995) 248-252.
- Mayer, A., Limberger, N. y Starke, K., *Transmitter release patterns of noradrenergic, dopaminergic and cholinergic axons in rabbit brain slices during short pulse trains, and the operation of presynaptic autoreceptors*, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 338 (1988) 632-643.
- Martin, G.R. y Humphrey, P.P.A., *Receptors for 5-hydroxytryptamine: current perspectives on classification and nomenclature*, *Neuropharmacology*, 33 (1994) 261-273.
- Martres, M.P., Costentin, J., Baudry, M., Marcais, H., Protais, P. y Schwartz, J.C., *Long-term changes in the sensitivity of pre- and post-synaptic dopamine receptors in mouse striatum evidenced by behavioural and biochemical studies*, *Brain Res.*, 136 (1977) 319-337.
- Matsumoto, M., Togashi, H., Yoshioka, M., Hirokami, M., Morii, K. y Saito, H., *Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of norepinephrine, serotonin, acetylcholine and their metabolites in the cerebrospinal fluid of anaesthetized normotensive rats*, *J. Chromatog.*, 526 (1990) 1-10.
- McDermott, J.L., *Effects of estrogen upon dopamine release from the corpus striatum of young and aged female rats*, *Brain Res.*, 606 (1993) 118-125.

- McLamb, W.T. y Park, J.C., Cholinesterase activity in vestibular organs of young and old mice, *Hear. Res.*, 58 (1992) 193-199.
- Mefford, I.N., Application of high performance liquid chromatography with electrochemical detection to neurochemical analysis: measurements of catecholamines, serotonin and metabolites in rat brain, *J. Neurosci. Meth.*, 3 (1981) 207-224.
- Mefford, I.N., Ota, M., Stipetic, M. y Singleton, W., Application of a novel cation-exchange reagent, Igepon T-77 (N-methyl oleoyl taurate), to microbore separations of alumina extracts of catecholamines from cerebrospinal fluid, plasma, urine and brain tissue with amperometric detection, *J. Chromatog.*, 420 (1987) 241-251.
- Merchán, M.A. y Ludeña, M.D., Ultraestructura del oído interno, En M.A. Merchán (Ed.), *El oído interno. Ultraestructura, embriogénesis y algunos aspectos patológicos*, Ed. Univ. de Salamanca-Univ. de Alicante, Salamanca, 1983, pp. 21-83.
- Merchán, M., Ludeña, M.D., Merchan, J. y Gil-Loyzaga, P., Ultraestructura de las células de soporte de la papila auditiva: Pilares, *Morf. Normal y Patolog.*, 6 (1982) 219-238.
- Merchán-Pérez, A. y Liberman, M.C., Ultrastructural differences among afferent synapses on cochlear hair cells: correlations with spontaneous discharge rate, *J. Comp. Neurol.*, 371 (1996) 208-221.
- Merchán-Pérez, A., Gil-Loyzaga, P. y Eybalin, M., Ontogeny of glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyric acid immunoreactivities in the rat cochlea, *Eur.Arch. Otorhinolaryngol.*, 248 (1990a) 4-7.

- Merchán-Pérez, A., Gil-Loyzaga, P. y Eybalin, M., Immunocytochemical detection of glutamate decarboxylase in the postnatal developing rat organ of Corti, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 8 (1990b) 613-620.
- Merchán-Pérez, A., Gil-Loyzaga, P. y Eybalin, M., Immunocytochemical detection of calcitonin gene-related peptide in the postnatal developing rat cochlea, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 8 (1990c) 603-612.
- Merchán-Pérez, A., Gil-Loyzaga, P. y Eybalin, M., Postnatal development of CGRP-immunoreactive fibers in the rat cochlea, *Otorhinolaryngol. Head Neck Surg.*, (1990d) 81-83.
- Merchán-Pérez, A., Gil-Loyzaga, P., Eybalin, M., Fernández-Mateos, P. y Bartolomé, M.V., Choline-acetyltransferase-like immunoreactivity in the organ of Corti of the rat during postnatal development, *Dev. Brain Res.*, 82 (1994) 29-34.
- Merchán-Pérez, A., Gil-Loyzaga, P., López-Sánchez J., Eybalin, M. y Valderrama, F.J., Ontogeny of gamma-aminobutyric acid in efferent fibers to the rat cochlea, *Dev. Brain Res.*, 76 (1993) 33-41.
- Miras-Portugal, M.T., Catecolaminas: localización y síntesis, En M.P. González, A.M. Pascual-Leone, M.J. López, B.Ribas, J.M. Culebras y M.T. Miras (Eds.), *Curso monográfico sobre neuroquímica*, Ed. Univ. Complutense, Madrid, 1985a, pp. 155-176.
- Miras-Portugal, M.T., Almacenamiento, transporte y liberación de las catecolaminas, En M.P. González, A.M. Pascual-Leone, M.J. López, B.Ribas, J.M. Culebras y M.T. Miras (Eds.), *Curso monográfico sobre neuroquímica*, Ed. Univ. Complutense, Madrid, 1985b, pp. 177-200.

- Miras-Portugal, M.T., Catecolaminas: incorporación, receptores y catabolismo, En M.P. González, A.M. Pascual-Leone, M.J. López, B. Ribas, J.M. Culebras y M.T. Miras (Eds.), *Curso monográfico sobre neuroquímica*, Ed. Univ. Complutense, Madrid, 1985c, pp. 201-226.
- Moore, K.L., El oído, En K.L. Moore (Ed.), *Anatomía con orientación clínica*, Panamericana, Madrid, 1993, pp. 791-810.
- Moore, D.R. y Kowalchuk, N., An anomaly in the auditory brainstem projections of hypopigmented ferrets, *Hear. Res.*, 35 (1988) 275-278.
- Moore, J.K. y Moore, R.Y., Glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in brainstem auditory nuclei of the rat, *J. Comp. Neurol.*, 260 (1987) 157-174.
- Morissette, M. y Di Paolo, T., Effect of chronic estradiol and progesterone treatments of ovariectomized rats on brain dopamine uptake sites, *J. Neurochem.*, 60 (1993) 1876-1883.
- Murrin, L.C. y Roth, R.H., Nigrostriatal dopamine neurons: modulation of impulse-induced activation of tyrosine hydroxylation by dopamine autoreceptors, *Neuropharmacol.*, 26 (1987) 591-595.
- Nagao, T. y Tanimura, T., Simultaneous determination of biogenic amines, their precursors and metabolites in a single brain of the cricket using high-performance liquid chromatography with amperometric detection, *J. Chromatog.*, 496 (1989) 39-53.
- Nakagawa, T., Komune, S., Uemura, T. y Akaike, N., Excitatory amino acid response in isolated spiral ganglion cells of guinea pig cochlea, *J. Neurophysiol.*, 65 (1991) 715-723.

- Nitecka, L.M. y Sobkowicz, H.M., The GABA/GAD innervation within the inner spiral bundle in the mouse cochlea, *Hear. Res.*, 99 (1996) 91-105.
- O'Dowd, B.F., Structures of dopamine receptors, *J. Neurochem.*, 60 (1993) 804-816.
- Ohno, K., Takeda, N., Yamano, M., Matsunaga, T. y Tohyama, M., Coexistence of acetylcholine and calcitonin gene-related peptide in the vestibular efferent neurons in the rat, *Brain Res.*, 566 (1991) 103-107.
- Oksenberg, D., Marsters, S.A., O'Dowd, B.F., Jin, H., Havlik, S., Peroutka, S.J. y Ashkenazi, A., A single amino-acid difference confers major pharmacological variation between human and rodent 5-HT<sub>1B</sub> receptors, *Nature*, 360 (1992) 161-163.
- Palazzolo, D.L. y Quadri, K., Optimal conditions for long-term storage of biogenic amines for subsequent analysis by column chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatog.*, 518 (1990) 258-263.
- Palermo-Neto, J. y Dorce, V.A.C., Influences of estrogen and/or progesterone on some dopamine related behavior in rats, *Gen. Pharmacol.*, 21 (1990) 83-87.
- Palij, P., Bull, D.R., Sheehan, M.J., Millar, J., Stamford, J., Kruk, Z.L. y Humphrey, P.P.A., Presynaptic regulation of dopamine release in corpus striatum monitored in vitro in real time by fast cyclic voltammetry, *Brain. Res.*, 509 (1990) 172-174.
- Par,s-Herbut, N., Tapia-Arancibia, L. y Astier, H., Ontogeny of the metencephalic, mesencephalic and diencephalic content of catecholamines as measured by high performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Int. J. Devl. Neurosci.*, 7 (1989) 73-79.

- Parker, E.M. y Cubeddu, L.X., Evidence for autoreceptor modulation of endogenous dopamine release from rabbit caudate nucleus in vitro, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 232 (1985) 492-500.
- Parker, M.J., Lyon, M.J. y Gacek, R.R., Ultrastructure of contralaterally projecting vestibular efferent neurons in the cat, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 114 (1988) 545-549.
- Pasqualini, C., Guibert, B. y Leviel, V., Short-term inhibitory effect of estradiol on tyrosine hydroxylase activity in tuberoinfundibular dopaminergic neurons in vitro, *J. Neurochem.*, 60 (1993) 1707-1713.
- Perachio, A.A. y Kevetter, G.A., Identification of vestibular efferent neurons in the gerbil: histochemical and retrograde labelling, *Exp. Brain Res.*, 78 (1989) 315-326.
- Pérez-Casas, A. y Bengoechea, M.E., *Morfología, estructura y función de los centros nerviosos*, Ed. Paz Montalvo, 1977.
- Pickles, J.O., An investigation of sympathetic effects on hearing, *Acta Otolaryngol.*, 87 (1979) 69-71.
- Pickles, J.O. y Corey, D.P., Mechano-electrical transduction by hair cells, *Trends Neurosci.*, 15 (1992) 254-259.
- Plinkert, P.K., Möhler, H. y Zenner, H.P., A subpopulation of outer hair cells possessing GABA receptors with tonotopic organization, *Arch. Oto-Rhino-Laryngol.*, 246 (1989) 417-422.
- Plinkert, P.K., Gitter, A.H., Zimmermann, U., Kirchner, T., Tzartos, S. y Zenner, H.P., Visualization and functional testing of acetylcholine receptor-like molecules in cochlear outer hair cells, *Hear. Res.*, 44 (1990) 25-34.



- Puel, J.L., *Chemical synaptic transmission in the cochlea*, *Prog. Neurobiol.*, 47 (1995) 449-476.
- Puel, J.L. y Pujol, R., *Recent advances in cochlear neurobiology: cochlear efferents and acoustic trauma*. En M. Vallet (Ed.), *Noise and man*, INRETS Actes no 34 ter, 1993, p.p. 136-145.
- Puel, J.L., Pujol, R., Ladrech, S. y Eybalin, M., *alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid electrophysiological and neurotoxic effects in the guinea pig cochlea*, *Neuroscience*, 45 (1991a) 63-72.
- Puel, J.L., Ladrech, S., Chabert, R., Pujol, R. y Eybalin, M., *Electrophysiological evidence for the presence of NMDA receptors in the guinea pig cochlea*, *Hear. Res.*, 51 (1991b) 255-264.
- Pujol, R., *Lateral and medial efferents: a double neurochemical mechanism to protect and regulate inner and outer hair cell function in the cochlea*, *Br. J. Audiol.*, 28 (1994) 185-191.
- Pujol, R. y Lenoir, M., *The four types of synapses in the organ of Corti*. En R.A. Altschuler, R.P. Bobbin y D.W. Hoffmann (Eds.), *Neurobiology of hearing: The cochlea*, Raven Press, Nueva York, 1986, p.p. 161-172.
- Pujol, R., Eybalin, M. y Puel, J.L., *Recent advances in cochlear neurotransmission: physiology and pathophysiology*, *News Physiol. Sci.*, 10 (1995) 178-183.
- Pujol, R., Puel, J.L. y Eybalin, M., *Implication of non-NMDA and NMDA receptors in cochlear ischemia*, *NeuroReport*, 3 (1992) 299-302.
- Pujol, R., Puel, J.L., Gervais d'Aldin, C. y Eybalin, M., *Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea*, *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 113 (1993) 330-334.

- Pujol, R., Lenoir, M., Robertson, D., Eybalin, M. y Johnstone, B.M., Kainic acid selectively alters auditory dendrites connected with cochlear inner hair cells, *Hear. Res.*, 18 (1985) 145-151.
- Pujol, R., Rebillard, G., Puel, J.L., Lenoir, M., Eybalin, M. y Recasens, M., Glutamate neurotoxicity in the cochlea: a possible consequence of ischaemic or anoxic conditions occurring in ageing, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 476 (1991) 32-36.
- Pussard, E., Guigueno, N., Adam, O. y Giudicelli, J.F., Validation of HPLC-amperometric detection to measure serotonin in plasma, platelets, whole blood and urine, *Clin. Chem.*, 42 (1996) 1086-1091.
- Rack, K., Grosshans, A., Sirrenberg, S. y Ziegler, K., Presynaptic regulation of the electrically evoked release of endogenous dopamine from the isolated neurointermediate lobe or isolated neural lobe of the rat pituitary gland in vitro, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 337 (1988) 504-511.
- Rarey, K.E., Ross, M.D. y Smith, C.B., Quantitative evidence for cochlear non-neuronal norepinephrine, *Hear. Res.*, 5 (1981) 101-108.
- Rarey, K.E., Ross, M.D. y Smith, C.B., Distribution and significance of norepinephrine in the lateral wall of pigmented and albino rats, *Hear. Res.*, 6 (1982) 15-23.
- Rastegar, A., Ciesielski, L., Simler, S., Messripour, M. y Mandel, P., Brain monoamines following castration of aggressive muricidal rats, *Neurochem. Res.*, 18 (1993) 471-477.

- Raynaud, B., Faucon-Biguet, N., Vidal, S., Mallet, J. y Weber, M.J., Regulation of neurotransmitter metabolic enzymes and tyrosine hydroxylase mRNA level by nerve growth factor in cultured sympathetic neurones, *Development*, 102 (1988) 361-368.
- Reisine, T., Molecular biology of neurotransmitter receptors, *FESN*, 8 (1992) 1-56.
- Remezal, M. y Gil-Loyzaga, P., Incorporation of D-[3H]-glucosamine to the adult and developing cochlear tectorial membrane of normal and hypothyroid rats, *Hear. Res.*, 66 (1993) 23-30.
- Remezal, M., Gil-Loyzaga, P. y Oriol, R., Ultrastructural localization of H human-blood-group immunoreactivity rat cochlear hair cells, *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, 55 (1993) 205-207.
- Ren, T., Laurikainen, E., Quirk, W.S., Miller, J.M. y Nuttall, A.L., Effects of stellate ganglion stimulation on bilateral cochlear blood flow, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 102 (1993a) 378-384.
- Ren, T., Laurikainen, E., Quirk, W.S., Miller, J.M. y Nuttall, A.L., Effects of electrical stimulation of the superior cervical ganglion on cochlear blood flow in guinea pig, *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 113 (1993b) 146-151.
- Ren, T., Avinash, G.B., Nuttall, A.L., Miller, J.M., Laurikainen, E.A. y Quirk, W.S., Dynamic response of cochlear blood flow to occlusion of anterior inferior cerebellar artery in guinea pigs, *J. Appl. Physiol.*, 76 (1994) 212-217.
- Robertson, D., Horseradish peroxidase injection of physiologically characterized afferent and efferent neurones in the guinea pig spiral ganglion, *Hear. Res.*, 15 (1984) 113-121.

- Robertson, D., Anderson, C.J. y Cole, K.S., Segregation of efferent projections to different turns of the guinea pig cochlea, *Hear. Res.* 25 (1987) 69-76.
- Rosbe, K.W., Burgess, B.J., Glynn, R.J. y Nadol, J.B., Morphologic evidence for three cell types in the human spiral ganglion, *Hear. Res.*, 93 (1996) 120-127.
- Ross, M.D., Fluorescence and electron microscopic observations of the general visceral, efferent innervation of the inner ear, *Acta Oto-laryngol. Suppl.*, 286 (1971) 1-18.
- Ross, M.D., Morphological evidence for local microcircuits in rat vestibular maculae, *J. Comp. Neurol.*, 379 (1997) 333-346.
- Rouvière, H. y Delmas, A., Organo del oído. En H. Rouvière y A. Delmas (Eds.), *Anatomía humana. Descriptiva, topográfica y funcional. Tomo I: Cabeza y cuello*, Masson, Barcelona, 1987, pp. 396-440.
- Ryan, A.F., Brumm, D. y Kraft, M., Occurrence and distribution of non-NMDA glutamate receptor mRNAs in the cochlea, *NeuroReport*, 2 (1991a) 643-646.
- Ryan, A.F., Simmons, D.M., Watts, A.G. y Swanson, L.W., Enkephalin mRNA production by cochlear and vestibular efferent neurons in the gerbil brainstem, *Exp. Brain Res.*, 87 (1991b) 259-267.
- Ryan, A.F., Keithley, E.M., Wang, Z.X. y Schwartz, I.R., Collaterals from the lateral and medial olivocochlear neurons innervate different regions of the cochlear nucleus and adjacent brainstem, *J. Comp. Neurol.*, 300 (1990) 572-582.
- Ryan, A.F., Schwartz, I.R., Helfert, R.H., Keithley, E. y Wang, Z.X., Selective retrograde labeling of lateral olivocochlear neurons in the brainstem based on preferential uptake of <sup>3</sup>H-D-aspartic acid in the cochlea, *J. Comp. Neurol.*, 255 (1987) 606-616.

- Ryugo, D.K. y Rouiller, E.M., Central projections of intracellularly labeled auditory nerve fibers in cats: Morphometric correlations with physiological properties, *J. Comp. Neurol.*, 271 (1988) 130-142.
- Safieddine, S. y Eybalin, M., Co-expression of NMDA and AMPA/kainate receptor mRNAs in cochlear neurons, *NeuroReport*, 3 (1992a) 1145-1148.
- Safieddine, S. y Eybalin, M., Triple immunofluorescence evidence for the coexistence of acetylcholine, enkephalins and calcitonin gene-related peptide within efferent (olivocochlear) neurons of rats and guinea-pigs, *Eur. J. Neurosci.*, 4 (1992b) 981-992.
- Safieddine, S. y Eybalin, M., Expression of mGluR1 mRNA receptor in rat and guinea pig cochlear neurons, *NeuroReport*, 7 (1995) 193-196.
- Safieddine, S., Soto Prior, A.M. y Eybalin, M., Choline acetyltransferase, glutamate decarboxylase, tyrosine hydroxylase, calcitonin gene-related peptide and opioid peptides coexist in lateral efferent neurons of rat and guinea pig, *Eur. J. Neurosci.*, 9 (1997) 356-367.
- Safieddine, S., Bartolami, S., Wenthold, R.J. y Eybalin, M., Pre- and postsynaptic M3 muscarinic receptor mRNAs in the rodent peripheral auditory system, *Mol. Brain Res.*, 40 (1996) 127-135.
- Sahley, T., Kalish, R.B., Musiek, F.E. y Hoffmann, D.W., Effects of opioid drugs on auditory evoked potentials suggest a role of lateral olivocochlear dynorphins in auditory function, *Hear. Res.*, 55 (1991) 133-142.

- Saligaut, C., Chretien, P., Daoust, M., Moore, N. y Boismare, F., Dynamic characteristics of dopamine, norepinephrine and serotonin metabolism in axonal endings of the rat hypothalamus and striatum during hypoxia: a study using HPLC with electrochemical detection, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 8 (1986) 343-349.
- Salt, A.N. y Konishi, T., The cochlea fluids: Perilymph and endolymph. En R.A. Altschuler, D.W. Hoffman y R.P. Bobbin (Eds.), *Neurobiology of hearing: the cochlea*, Raven Press, New York, 1986, pp. 109-122.
- Sanders-Bush, E. y Mayer, S.E., 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor agonists and antagonists, En J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon y A. Goodman Gilman (Eds.), *The pharmacological basis of therapeutics*, McGraw-Hill, Nueva York, 1996, pp. 249-263.
- Sans, A., Sistema vestibular y equilibrio. En J.A.F. Tresguerres (Ed.), *Fisiología humana*, Interamericana McGraw-Hill, Madrid, 1993, pp. 315-327.
- Sans, A. y Raymond, J., Función vestibular y equilibración. En Y. Guerrier y A. Uziel (Eds.), *Fisiología neurosensorial en O.R.L.*, Masson, París, 1985, pp. 137-174.
- Satake, M. y Liberman, M.C., Morphological subclasses of lateral olivocochlear terminals? Ultrastructural analysis of inner spiral bundle in cat and guinea pig, *J. Comp. Neurol.*, 371 (1996) 621-632.
- Sato, H., Sando, I. y Takahashi, H., Sexual dimorphism and development of the human cochlea, *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 111 (1991) 1037-1040.

- Scarfone, E., Ulfendahl, M. y Lundeberg, T., The cellular localization of the neuropeptides substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide and neuropeptide Y in guinea-pig vestibular sensory organs: a high-resolution confocal microscopy study, *Neuroscience*, 75 (1996) 587-600.
- Schrott-Fischer, A., Egg, G., Kong, W.J., Renard, N. y Eybalin, M., Immunocytochemical detection of choline acetyltransferase in the human organ of Corti, *Hear. Res.*, 78 (1994) 149-157.
- Schwarz, D.W.F., Satoh, K., Schwarz, I.E., Hu, K. y Fibiger, H.C., Cholinergic innervation of the rat's labyrinth, *Exp. Brain Res.*, 64 (1986) 19-26.
- Seeman, P. y Van Tol, H.H.M., Dopamine receptor pharmacology, *TIPS*, 15 (1994) 264-270.
- Shaw, N.A., The auditory evoked potential in the rat. A review, *Prog. Neurobiol.*, 31 (1988) 19-45.
- Shore, S.E.; Helfert, R.H.; Bledsoe, S.C.; Altschuler, R.A. y Godfrey, D.A., Descending projections to the dorsal and ventral divisions of the cochlear nucleus in guinea pig, *Hear. Res.*, 52 (1991) 255-268.
- Shibamori, Y., Tamamaki, N., Saito, H. y Nojyo, Y., The trajectory of the sympathetic nerve fibers to the rat cochlea as revealed by anterograde and retrograde WGA-HRP tracing, *Brain Res.*, 646 (1994) 223-229.
- Shumilina, V.F., Preobrazhenskii, N.N. y Maiskii, V.A., Efferent vestibular neurons in the guinea pig by horseradish peroxidase and fluorochrome labeling techniques, *Neurophysiology*, 18 (1986) 513-520.
- Sibley, D.R. y Monsma, F.J., Molecular biology of dopamine receptors, *TIPS*, 13 (1992) 61-69.

- Silverman, J.D. y Kruger, L., Calcitonin-gene-related-peptide-immunoreactive innervation of the rat head with emphasis on specialized sensory structures, *J. Comp. Neurol.*, 280 (1989) 303-330.
- Simmons, D.D. y Liberman, M.C., Afferent innervation of outer hair cells in adult cats: I. Light microscopic analysis of fibers labeled with horseradish peroxidase, *J. Comp. Neurol.*, 270 (1988) 132-144.
- Simmons, D.D. y Raji-Kubba, J., Postnatal calcitonin gene-related peptide in the superior olivary complex, *J. Chem. Neuroanat.*, 6 (1993) 407-418.
- Skirboll, L.R., Grace, A.A. y Bunney, B.S., Dopamine auto- and postsynaptic receptors: electrophysiological evidence for differential sensitivity to dopamine agonists, *Science*, 206 (1979) 80-82.
- Slepecky, N., Ulfendahl, M. y Flock, A., Shortening and elongation of isolated outer hair cells in response to application of potassium gluconate, acetylcholine and cationized ferritin, *Hear. Res.*, 34 (1988) 119-126.
- Sliwinska-kowalska, M., Parakkal, M. Schneider, M.E. y Fex, J., CGRP-like immunoreactivity in the guinea pig organ of Corti: a light and electron microscopic study, *Hear. Res.*, 42 (1989) 83-96.
- Smith, P.F. y Darlington, C.L., Recent advances in the pharmacology of the vestibulo-ocular reflex system, *Trends Pharmacol.*, 17 (1996) 421-427.
- Sobkowicz, H.M. y Emmerling, M., Development of acetylcholinesterase-positive neuronal pathways in the cochlea of the mouse, *J. Neurocytol.*, 18 (1989) 209-224.
- Sokoloff, P. y Schwartz, J.C., Novel dopamine receptors half a decade later, *TIPS*, 16 (1995) 270-275.



- Spoendlin, H., Innervation patterns of the organ of Corti of the cat, *Acta Otolaryngol.*, 67 (1969) 239-254.
- Spoendlin, H., Autonomic innervation of the inner ear, *Adv. Oto-Rhino-Laryng.*, 27 (1981) 1-13.
- Spoendlin, H., Primary neurons and synapses. En I. Friedmann y J. Ballantyne (Eds.), *Ultrastructural atlas of the inner ear*, Butterworths, London, 1984, pp. 133-164.
- Spoendlin, H. y Lichtensteiger, W., The adrenergic innervation of the labyrinth, *Acta Oto-laryngol.*, 61 (1966) 423-434.
- Starke, K., Göthert, M. y Kilbinger, H., Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors, *Physiol. Rev.*, 69 (1989) 864-989.
- Starkey, S.J. y Skingle, M., 5-HT<sub>1D</sub> as well as 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors modulate 5-HT release in the guinea-pig dorsal raph, nucleus, *Neuropharmacology*, 33 (1994) 393-402.
- Strader, C.D., Ming Fong, T., Tota, M.R. y Underwood, D., Structure and function of G protein-coupled receptors, *Annu. Rev. Biochem.*, 63 (1994) 101-132.
- Strange, P.G., New insights into dopamine receptors in the central nervous system, *Neurochem. Int.*, 22 (1993) 223-236.
- Strange, P.G., Dopamine D<sub>4</sub> receptors: curioser and curioser, *TIPS*, 15 (1994) 317-319.
- Suga, F., Neural control of the cochlear blood flow, *Acta Otolaryngol.*, 81 (1976) 26-35.
- Suga, F. y Snow, J.B., Adrenergic control of the cochlear blood flow, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 78 (1969) 358-374.

- Sziklai, I., He, D.Z.Z. y Dallos, P., Effect of acetylcholine and GABA on the transfer function of electromotility in isolated outer hair cells, *Hear. Res.*, 95 (1996) 87-99.
- Takeda, N., Kitajiri, M., Girgis, S., Hillyard, C.J., Macintyre, I., Emson, P.C., Shiosaka, S., Tohyama, M. y Matsunaga, T., The presence of calcitonin gene-related peptide in the olivocochlear bundle in rat, *Exp. Brain Res.*, 61 (1986) 575-578.
- Tanaka, M., Takeda, N., Senba, E., Tohyama, M., Kubo, T. y Matsunaga, T., Localization, origin and fine structure of calcitonin gene-related peptide-containing fibers in the vestibular end-organs of the rat, *Brain Res.*, 504 (1989) 31-35.
- Terayama, Y., Holz, E. y Beck, C., Adrenergic innervation of the cochlea, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 75 (1966) 69-86.
- Terayama, Y., Shige, E. y Sakamoto, T., Distribution and origin of adrenergic nerve fibers in the vestibular apparatus and their arterial supply in the guinea pig, *Acta Otolaryngol.*, 76 (1973) 244-253.
- Terayama, Y., Yamamoto, K. y Sakamoto, T., Electron microscopic observations on the postganglionic sympathetic fibers in the guinea pig cochlea, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 77 (1968) 1152-1170.
- Thalmann, I., Machiki, K., Calabro, A., Hascall, V.C. y Thalmann, R., Uronic acid-containing glycosaminoglycans and keratan sulfate are present in the tectorial membrane of the inner ear: functional implications, *Arch. Biochem. Biophys.*, 307 (1993) 391-396.

- Thompson, G.C. y Thompson, A.M., Olivocochlear neurons in the squirrel monkey brainstem, *J. Comp. Neurol.*, 254 (1986) 246-258.
- Thompson, A.M. y Thompson, G.C., Projections from the posteroventral cochlear nucleus to the superior olivary complex in guinea pig: light and EM observations with the PHA-L method, *J. Comp. Neurol.*, 311 (1991) 495-508.
- Timmerman, W., De Vries, J.B. y Westerink, H.C., Effects of D-2 agonists on the release of dopamine: localization of the mechanism of action, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 342 (1990) 650-654.
- Usami, S.I. y Ottersen, O.P., Aspartate is enriched in sensory cells and subpopulations of non-neuronal cells in the guinea pig inner ear: a quantitative immunoelectron microscopic analysis, *Brain Res.*, 742 (1996) 43-49.
- Usami, S.I., Igarashi, M. y Thompson, G.C., GABA-like immunoreactivity in the squirrel monkey vestibular endorgans, *Brain Res.* 417 (1987) 367-370.
- Usami, S.I., Igarashi, M. y Thompson, G.C., Light- and electron-microscopic study of gamma-aminobutyric-acid-like immunoreactivity in the guinea pig organ of Corti, *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, 50 (1988) 162-169.
- Usami, S.H., Osen, K.K., Zhang, N. y Ottersen, O.P., Distribution of glutamate-like and glutamine-like immunoreactivities in the rat organ of Corti: a light microscopic and semiquantitative electron microscopic analysis with a note on the localization of aspartate, *Exp. Brain Res.*, 91 (1992) 1-11.
- Usami, S.I., Matsubara, A., Shinkawa, H., Matsunaga, T. y Kanzaki, J., Neuroactive substances in the human vestibular end organs, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.* 520 (1995) 160-163.

- Usami, S.I., Hozawa, J., Tazawa, M., Yoshihara, T., Igarashi, M. y Thompson, G.C., Immunocytochemical study of catecholaminergic innervation in the guinea pig cochlea, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 447 (1988) 36-45.
- Uziel, A., El oído externo y el oído medio. En Y. Guerrier y A. Uziel (Eds.), *Fisiología neurosensorial en O.R.L.*, Masson, París, 1985a, pp. 66-74.
- Uziel, A., Estructura del oído interno. En Y. Guerrier y A. Uziel (Eds.), *Fisiología neurosensorial en O.R.L.*, Masson, París, 1985b, pp. 55-65.
- Uziel, A., El sistema auditivo central. En Y. Guerrier y A. Uziel (Eds.), *Fisiología neurosensorial en O.R.L.*, Masson, París, 1985c, pp. 103-118.
- Vallar, L. y Meldolesi, J., Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor, *TIPS*, 10 (1989) 74-77.
- Vetter, D.E., Adams, J.C. y Mugnaini, E., Chemically distinct rat olivocochlear neurons, *Synapse*, 7 (1991) 21-43.
- Vincent, S.R., Distribution of tyrosine hydroxylase-, dopamine á-hydroxylase- and phenylethanolamine-N-methyltransferase-immunoreactive neurons in the brain of the hamster *Mesocricetus auratus*, *J. Comp. Neurol.* 268 (1988) 584-599.
- Vinnikov, Y.A., Govyrin, V.A., Leonteva, G.R. y Anichin, V.F., The adrenergic innervation of the organ of Corti, *Dokl. Akad. Nauk.*, 171 (1966) 835-838.
- Wackym, P.A., Popper, P., Ward, P.H. y Micevych, P.E., Cell and molecular anatomy of nicotinic acetylcholine receptor subunits and calcitonin gene-related peptide in the rat vestibular system, *Otolaryngol. head Neck Surg.*, 105 (1991a) 493-510.

- Wackym, P.A., Popper, P., Abelson, L.A., Ward, P.H. y Micevych, P.E., Molecular biology of the vestibular system, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 481 (1991b) 141-149.
- Warr, W.B., Olivocochlear and vestibular efferent neurons of the feline brainstem: their location, morphology and number determined by retrograde axonal transport and acetylcholinesterase histochemistry, *J. Comp. Neurol.*, 161 (1975) 159-182.
- Warr, W.B., Organization of olivocochlear efferent systems in mammals. En D.B. Webster y cols. (Eds.), *Mammalian auditory pathway: neuroanatomy*, Springer, 1992, pp. 410-448.
- Warr, W.B. y Guinan, J.J., Efferent innervation of the organ of Corti: two separate systems, *Brain Res.*, 173 (1979) 152-155.
- Westerink, B.H.C., Sequence and significance of dopamine metabolism in the rat brain, *Neurochem. Int.*, 7 (1985) 221-227.
- Westfall, T.C., Naes, L. y Paul C., Relative potency of dopamine agonists on autoreceptor function in various brain regions of the rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 224 (1982) 199-205.
- White, J.S. y Warr, W.B., The dual origins of the olivo-cochlear bundle in the albino rat, *J. Comp. Neurol.*, 219 (1983) 203-214.
- White, F.J. y Wang, R.Y., Pharmacological characterization of dopamine autoreceptors in the rat ventral tegmental area: microiontophoretic studies, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 231 (1984) 275-280.
- Wilson, J.L., Henson, M.M. y Henson, O.W., Course and distribution of efferent fibers in the cochlea of the mouse, *Hear. Res.*, 55 (1991) 98-108.

- Winter, I.M., Robertson, D. y Cole, K.S., Descending projections from auditory brainstem nuclei to the cochlea and cochlear nucleus of the guinea pig, *J. Comp. Neurol.*, 280 (1989) 143-157.
- Wood, P.L. y Altar, C.A., Dopamine release in vivo from nigrostriatal, mesolimbic, and mesocortical neurons: utility of 3-methoxytyramine measurements, *Pharmacol. Rev.*, 40 (1988) 163-187.
- Yi, Z. y Brown, P.R., Analysis of biogenic amines and their acidic metabolites by reversed-phase liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Liquid Chromatog.*, 13 (1990) 2161-2177.
- Ylikoski, J., Pirlova, U., Huppil, O., Panula, P. y Virtanen, I., Immunohistochemical demonstration of neuroactive substances in the inner ear of rat and guinea pig, *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 107 (1989) 417-423.
- Yost, R.W., Ettre, L.S. y Conlon, R.D., La técnica de la cromatografía líquida. En R.W. Yost, L.S. Ettre y R.D. Conlon (Eds.), *Introducción a la cromatografía líquida práctica*, Perkin-Elmer, Norwalk, 1981, pp. 35-145.

# **ANEXO 1**

## **Publicaciones**

## **PUBLICACION 1**

*Efectos de la estimulación acústica sobre el metabolismo de la dopamina coclear*

Gil-Loyzaga, P., Fernández-Mateos, P., **Vicente-Torres, M.A.**, Remezal, M., Cousillas, H., Arce, A. y Esquifino, A. Effects of noise stimulation on cochlear dopamine metabolism. *Brain Res.*, 623 (1993) 177-180.



BRES 25804

## Effects of noise stimulation on cochlear dopamine metabolism

Pablo Gil-Loyzaga<sup>a</sup>, Pilar Fernández-Mateos<sup>a</sup>, M<sup>a</sup> Angeles Vicente-Torres<sup>a</sup>,  
Manuel Remezal<sup>a</sup>, Hugo Cousillas<sup>a</sup>, Agustín Arce<sup>b</sup> and Ana Esquifino<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Neurobiología del Oído Interno, Departamento de Ciencias Morfológicas, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid (Spain) and <sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid (Spain)

(Accepted 8 June 1993)

**Key words:** Dopamine; Lateral olivocochlear system; Noise stimulus; Cochlea; High-performance liquid chromatography; Electrochemical detection; Rat

Dopamine (DA) appears to be one of the putative neurotransmitters of the lateral efferent olivocochlear fibers. However, its role in the cochlear physiology remains unknown. In this study, animals were exposed for 1 h to white noise at 70, 90 or 110 dB SPL or were kept in silence conditions. Afterwards, the cochlear content of DA and its metabolites dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) were analyzed using HPLC coupled to electrochemical detection. Cochlear DA concentration decreased with the noise intensity, while cochlear DOPAC and HVA concentrations increased. Males presented higher cochlear DOPAC contents and lower HVA contents than females. This sexual dimorphism could be related to the link between DA and gonadal steroids. Present results show that DA, as other lateral efferent neurotransmitters, is released and metabolized in relationship with the noise stimulation, and suggest that DA could be involved in the modulation of the type I afferent fiber activity.

Dopamine (DA) was first detected in the rat cochlea using high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection (HPLC-ED)<sup>9,10</sup>. The presence of tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity and the absence of dopamine- $\beta$ -hydroxylase-like immunoreactivity within the lateral olivocochlear (LOC) system suggested that DA was located in these fibers<sup>12,18</sup>. Immunoelectron microscopy using anti-tyrosine hydroxylase antibodies, together with depletion studies after 6-hydroxydopamine (6-OHDA) administration also supported that some LOC fibers could be dopaminergic<sup>2</sup>. Moreover, it has been recently reported that the dopaminergic agonist pibedil protects the primary afferent dendrites against ischemia<sup>16</sup>.

Although the localization of cochlear DA seems clarified, its physiological role remains controversial. In fact, previous intracochlear DA perfusions had no effect on cochlear potentials<sup>1</sup>, while recent studies showed that the intracochlear administration of pibedil modified the compound action potential (CAP) recording<sup>15</sup>.

Noise stimulation resulted in an increase of the

cochlear turnover of GABA and Met-enkephalin, other putative neurotransmitters of the LOC efferent system, suggesting that they could be involved in the modulation of the afferent fiber activity<sup>5,6</sup>. However, effects of noise stimulation on cochlear DA content have never been previously analyzed.

The aim of the present work was to study the effect of noise stimulation on the cochlear DA turnover to provide information on the participation of this neurotransmitter in the peripheral auditory process. For that purpose, the cochlear contents of DA and its metabolites dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) were examined using a HPLC-ED system. Both metabolites were monitored since DOPAC is an intracellular metabolite of monoamine oxidase, while HVA is the final metabolite arising from both intracellular and extracellular DA degrading pathways<sup>4,11,13,19,20</sup>. Therefore, DOPAC levels could inform over the DA uptake and over the main DA degradation pathway, while HVA levels could inform over the global DA degradation. Both males and females were independently analyzed because cochlear

morphological differences were previously reported<sup>17</sup>. Moreover, recordings of cochlear microphonics (CM) and brainstem auditory evoked potentials (BAEP) showed sex-dependent differences<sup>3</sup>.

Forty Long-Evans adult rats (20 males and 20 females), about 200 g body weight, were used under deep general anesthesia (urethane). Animals were divided into eight experimental groups of five animals. Each of these groups was independently exposed to white noise at 70, 90 or 110 dB SPL or kept in silence during an hour. Noise stimulation was carried out in an anechoic chamber which filters noise from the outside of less than 30 dB SPL. These intensities were previously used to study the effect of noise stimulus on the cochlear content of Met-enkephalin<sup>6</sup>.

After 1 h of noise exposure, cochleas were rapidly removed and scratched independently in 200  $\mu$ l of chilled 0.2 M perchloric acid, then they were sonicated and centrifugated (11,000 rpm, 10 min, +4°C). Supernatants were quickly frozen at -80°C, stored for no more than 3 days, and used for catecholamine determination.

Cochlear supernatants were injected into a HPLC-ED system to measure DA, DOPAC and HVA concentrations. Catecholamines were separated using a reversed phase column (Nucleosil 5 C18 100A, 150  $\times$  4.6 mm). The mobile phase was a 0.1 M acetate/0.1 M citrate buffer (pH 4) containing 228 mg/l of EDTA, 45 mg/l of sodium octyl sulphate and 10% (v/v) of methanol. The flow rate was set at 1 ml/min. Electrochemical detection was achieved with a coulometric detector (Coulchem 5100A, ESA) utilizing three electrodes (conditioning electrode = -0.40 V, preoxidation

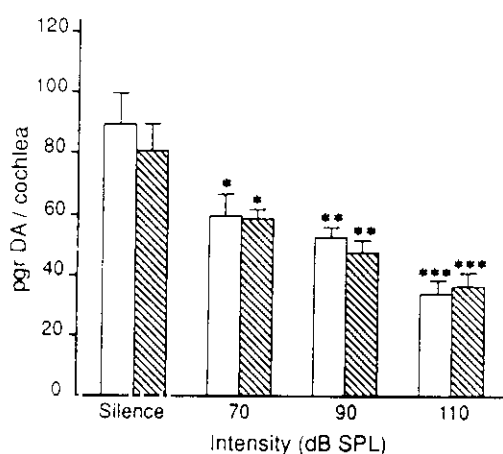


Fig. 1. Cochlear DA concentration after silence or noise stimulation at 70, 90 or 110 dB SPL. Comparisons between silence conditions and noise stimulation are given as \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Comparison between males and females was not significant under any noise intensity. Values are given as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 10$  in each group). Open bars, males; striped bars, females.

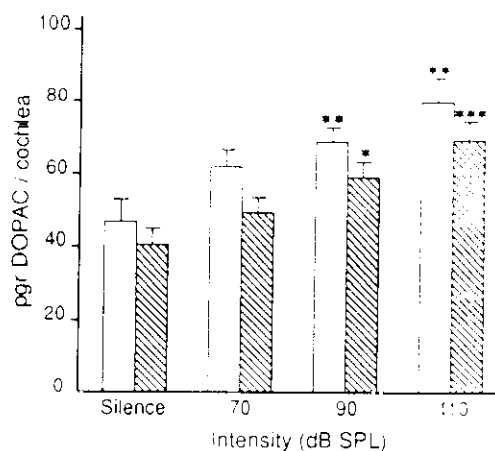


Fig. 2. Cochlear DOPAC concentration after silence or noise stimulation at 70, 90 or 110 dB SPL. Comparisons between silence conditions and noise stimulation are given as \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Comparison between males and females was not significant under any noise intensity. Values are given as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 10$  in each group). Open bars, males; striped bars, females.

electrode = +0.10 V and working electrode = +0.35 V, all vs.  $H_2/H^+$  reference electrodes). Catecholamine concentrations were quantified from the chromatographic peak heights using external standards (DA and DOPAC from Sigma and HVA from Merck). The linearity of the detector response for DA, DOPAC and HVA was tested within the concentration ranges detected in the cochlear supernatants.

Statistical analysis was carried out by comparison of mean  $\pm$  standard deviation using the Student's  $t$ -test.

For all noise intensities, the mean values of the cochlear DA concentrations in the stimulated cochleas were lower than in those cochleas kept in silence (equivalent to 30 dB SPL). Moreover, as noise intensities increased, lower cochlear DA concentrations were found. Differences from exposed animals with respect to those kept in silence were statistically more significant from 70 dB SPL on (Fig. 1). Males and females presented slight differences in their cochlear DA concentration, which were not significant at any intensity level (Fig. 1).

Cochlear DOPAC concentrations were higher in noise-exposed animals than in those kept in silence. When noise intensity increased, cochlear DOPAC concentration also increased, and a significant difference from 90 dB SPL on was found (Fig. 2), when compared to animals kept in silence. Although statistical comparison between males and females was not significant, Fig. 2 shows slightly higher concentrations of DOPAC in males than in females for all levels of noise stimulation and for silence conditions.

As was for DOPAC, cochlear HVA concentrations detected in silence conditions were lower than those

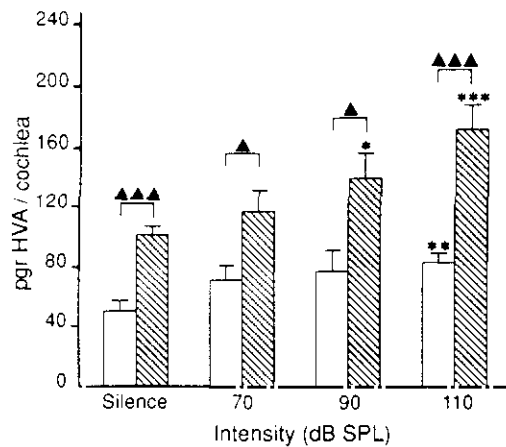


Fig. 3. Cochlear HVA concentration after silence or noise stimulation at 70, 90 or 110 dB SPL. Comparisons between silence conditions and noise stimulation are given as \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Comparison between males and females is given as ▲  $P < 0.05$ , ▲▲▲  $P < 0.001$ . Values are given as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 10$  in each group). Open bars, males; striped bars, females. NS, not significant. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

detected in animals exposed to noise stimulation, and cochlear HVA values increased with noise intensity (Fig. 3). But, in contrast to cochlear DOPAC concentrations, females showed a higher cochlear HVA content in silence conditions than males. Moreover, the increase of cochlear HVA concentration with the noise level was more pronounced in females than in males. Sex-dependent differences in cochlear HVA concentrations were significant at all levels of stimulation and highly significant at silence and under 110 dB SPL stimulation (Fig. 3).

Both in males and females, noise exposure produced a decrease in the cochlear DA content and an increase in the cochlear content of its metabolites DOPAC and HVA, which suggested an increase of the cochlear DA turnover. These modifications seem to indicate that noise induces the release of DA from the LOC fibers and its degradation. Thus, an increase is observed either in the DA intracellular catabolite (DOPAC) or in the final metabolite of DA (HVA)<sup>4,11,13,19,20</sup>. These results are in agreement with data obtained for Met-enkephalin and GABA, other putative LOC neurotransmitters, when animals were exposed to white noise<sup>5,6</sup>, suggesting that noise stimulation resulted in the release of efferent neurotransmitters. Also, all these data could indirectly support the localization of DA in fibers of the LOC system, and suggest that DA could participate in the regulation of primary afferent fiber activity. The mechanism to induce the release of DA could be a neuronal circuit. It would include fibers from superior auditory pathways, that would reach the lateral nucleus of the superior olivary complex.

Males showed slightly higher cochlear DOPAC contents and markedly lower cochlear HVA contents, either under silence conditions or after noise stimulation. These differences suggest a sexual dimorphism to regulate DA turnover in the cochlea. This sexual dimorphism could be related to the link between DA and gonadal steroids. In this way, it has been reported that either ovariectomy or estrogens and/or progesterone treatment modify the DA-related behavior, the DA receptor density and the levels of DA metabolites in some areas of the nervous system<sup>7,8,14</sup>. However, further investigations are needed to find an explanation to these sex-dependent differences.

This work has been supported by grants from Spanish DGICYT (PB91-0361) and FISss (92/141), and from CEE SCIENCE Plan (ERBSCCT9).

- 1 Bobbin, R.P. and Thompson, M.H., Effects of putative transmitters on afferent cochlear transmission. *Annu. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 87 (1978) 185-190.
- 2 Charachon, G. and Eybalin, M., Putative dopaminergic efferent (olivocochlear) innervation of the cochlea: immunoelectron microscopy and effects of 6-OHDA. *Eur. J. Neurosci.*, Suppl. 3 (1990) 152.
- 3 Church, M.W., Williams, H.L. and Holloway, J.A., Brain-stem auditory evoked potentials in the rat: effects of gender, stimulus characteristics and ethanol sedation. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 59 (1984) 328-339.
- 4 Cumming, P., Brown, E., Damsma, G. and Fibiger, H., Formation and clearance of interstitial metabolites of dopamine and serotonin in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.*, 59 (1992) 1905-1914.
- 5 Drescher, D.G. and Drescher, M.J., HPLC analysis of presumptive neurotransmitters in perilymph. In D.G. Drescher (Ed.), *Auditory Biochemistry*, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Ill, 1985, pp. 50-67.
- 6 Eybalin, M., Rebillard, G., Jarry, T.H. and Cupo, A., Effect of noise level on the Met-enkephalin content of the guinea pig cochlea. *Brain Res.*, 418 (1987) 189-192.
- 7 Falardeau, P. and Di Paolo, T., Regional effect of estradiol on rat caudate-putamen dopamine receptors: lateral-medial differences. *Neurosci. Lett.*, 74 (1987) 43-48.
- 8 Gayraud, V., Malpoux, B. and Thiéry, J.C., Oestradiol increases the extracellular levels of amine metabolites in the ewe hypothalamus during anoestrus: a microdialysis study. *J. Endocrinol.*, 135 (1992) 421-430.
- 9 Gil-Loyzaga, P. and Parés-Herbuté, N., Presence of noradrenaline and dopamine in the adult and developing rat cochlea. *Neurosci. Lett.*, Suppl. 26 (1986) 134.
- 10 Gil-Loyzaga, P. and Parés-Herbuté, N., HPLC detection of dopamine and noradrenaline in the cochlea of adult and developing rats. *Dev. Brain Res.*, 48 (1989) 157-160.
- 11 Jonason, J. and Rutledge, C.O., The effect of protriptyline on the metabolism of dopamine and noradrenaline in rabbit brain in vitro. *Acta Physiol. Scand.*, 73 (1968) 161-175.
- 12 Jones, N., Fex, J. and Altschuler, R.A., Tyrosine hydroxylase immunoreactivity identifies possible catecholaminergic fibers in the organ of Corti. *Hearing Res.*, 30 (1987) 33-38.
- 13 Kopin, I.J., Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol. Rev.*, 37 (1985) 333-364.
- 14 Palermo-Neto, J. and Dorce, V.A.C., Influences of estrogen and/or progesterone on some dopamine related behavior in rats. *Gen. Pharmacol.*, 21 (1990) 83-87.
- 15 Puel, J.L., Gervais d'Aldin, C., Pujol, R., Ladrech, S. and Eybalin, M., *Electrophysiological Effect of a Dopaminergic D2 Ago-*

- nist (*piribedil*) in the Guinea Pig Cochlea, 29th Inner Ear Biology Workshop, 1992, pp. 57.
- 16 Pujol, R., Gervais d'Aldin, C., Eybalin, M., Tripillac, F. and Puel J.L.. *Effect of a Dopaminergic D2 Agonist (piribedil) upon Ischemia-induced Neurotoxicity in the Cochlea Guinea Pig*, 29th Inner Ear Biology Workshop, 1992, pp. 58.
  - 17 Sato, H., Sando, I. and Takahashi H., *Sexual dimorphism and development of the human cochlea. Computer 3-D measurement*, *Acta Otolaryngol.*, 111 (1991) 1037-1040.
  - 18 Usami, S.I., Hozawa, J., Tazawa, M., Yoshihara, T., Igarashi, M. and Thompson, G.C., *Immunocytochemical study of catecholaminergic innervation in the guinea pig cochlea*. *Acta Otolaryngol.*, Suppl. 447 (1988) 36-45.
  - 19 Westerink, B.H.C., *Sequence and significance of dopamine metabolism in the rat brain*, *Neurochem. Int.*, 7 (1985) 221-227.
  - 20 Wood, P.L. and Altar, C.A., *Dopamine release in vivo from nigrostriatal, mesolimbic, and mesocortical neurons: utility of 3-methoxytyramine measurements*, *Pharmacol. Rev.*, 40 (1988) 163-187.

## **PUBLICACION 2**

*El piribedil podría modificar el turnover de la dopamina en las cócleas expuestas a estimulación acústica*

**Vicente-Torres, M.A.**, Gil-Loyzaga, P., Fernández, P., Arce, A. y Esquifino, A.  
Piribedil could modify dopamine turnover in cochleas under noise stimulation.  
*ORL J. Otorhinolaryngol. Rel. Spec.*, 55 (1993) 322-324.

## Apparatus

Publisher: S. Karger AG, Basel  
Printed in Switzerland

## Original Paper

ORL 1993;55:322-324

# Piribedil Could Modify Dopamine Turnover in Cochleas Under Noise Stimulation

M.A. Vicente-Torres<sup>a</sup>P. Gil-Loyzaga<sup>a</sup>P. Fernández<sup>a</sup>A. Arce<sup>b</sup>A. Esquifino<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Neurobiología del Oído Interno, Departamento de Ciencias Morfológicas, y

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España

**Key Words**

Piribedil  
D<sub>2</sub> agonist  
Dopamine  
Cochlea  
HPLC-ED  
Rat

**Abstract**

Dopamine (DA) is one of the putative neurotransmitters of the lateral efferent olivocochlear fibers. The cochlear DA content after noise exposure was analyzed using high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. Animals were exposed for 1 h to white noise at 70, 90 or 110 dB SPL or were kept in conditions of silence. Half of the animals were pretreated with piribedil, a D<sub>2</sub> agonist, and the other half served as controls. In control (untreated) animals, noise stimulation resulted in a progressive decrease of cochlear DA concentration. This decrease was scarcely detected when animals were pretreated with piribedil. Present findings indicate that piribedil modifies cochlear DA turnover under noise stimulation

**Introduction**

The presence of dopamine (DA) in the rat cochlea was first detected using high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection (HPLC-ED) [1, 2]. Immunohistochemical studies demonstrated the presence of tyrosine hydroxylase and the absence of DA β-hydroxylase within the lateral efferent olivocochlear system, suggesting that DA could be present in these fibers [3-5].

The role of DA in the cochlea remains unknown. Efferent dopaminergic fibers could be involved in the control and/or protection of primary afferent nerve fibers. However, the intracochlear perfusion of DA produced no effect on cochlear potentials [6-8]. Recently, it has been shown that acoustic stimulation modifies the turnover of cochlear DA [9], indicating that it could be involved in the auditory neurotransmission process.

Piribedil is a dopaminergic agonist of type D<sub>2</sub> receptors, which has been used in the treatment of pathologies related to a decrease of endogenous DA, such as in Parkinson's disease [10]. A decrease of DA could be also involved in the physiopathology of some inner ear diseases, such as vertigo, tinnitus or hypacusia. Thus, the study of the effect of piribedil in animals exposed to noise stimulation can provide more information on both cochlear DA turnover and the role of D<sub>2</sub> agonists (i.e. piribedil) on this turnover.

**Material and Methods**

Both cochleas from 48 Long-Evans adult male rats (about 200 g body weight) were used. Half of the animals were intraperitoneally injected with 20 mg/kg of piribedil 1 h before the noise stimulation. The other half served as control, receiving an injection with distilled water. Both groups of animals were exposed, under general

**Table 1.** Cochlear DA concentration in control animals after 1 h in silence or under white noise exposure (n = 12)

Acoustic stimulation	pg DA/cochlea
Silence	96.33 ± 10.77
70 dB SPL	62.17 ± 7.99*
90 dB SPL	53.83 ± 4.74**
110 dB SPL	35.92 ± 5.42***

Data are expressed as mean ± medium standard error. NS = Not significant.

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Table 2.** Cochlear DA concentration in piribedil-treated animals after 1 h in silence or under white noise exposure (n = 12)

Acoustic stimulation	pg DA/cochlea
Silence	96.50 ± 10.31
70 dB SPL	83.83 ± 3.67 NS
90 dB SPL	81.54 ± 8.95 NS
110 dB SPL	71.21 ± 5.96*

Data are expressed as mean ± medium standard error. NS = Not significant.

\*  $p < 0.05$ .

anesthesia (urethane), to white noise at 70, 90 or 110 dB SPL or kept in silence during 1 h in an anechoic chamber. After noise stimulation, while still under general anesthesia, the animals were immediately sacrificed. Both cochleas were rapidly removed and scratched independently in 200 µl of chilled 0.2 M perchloric acid. They were then sonicated and centrifugated at 4 °C.

The DA concentration in each individual cochlea was analyzed using HPLC-ED. The mobile phase was an acetate-citrate buffer (pH 4) containing 228 mg/l EDTA, 45 mg/l sodium octyl sulfate and 10% (vol/vol) methanol. The flow rate was set at 1 ml/min. Detection was achieved with a coulometric detector (Coulchem 5100A, ESA) and two electrochemical cells with H<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> reference electrodes (analytical cell, model 5011, and conditioning cell, model 5021, both ESA). Potentials chosen were -0.40 V in the conditioning cell, +0.10 V in the first electrode of the analytical cell and +0.35 V in the detection electrode. Catecholamine concentrations were quantified from the chromatographic peak heights. Neither piribedil nor its three metabolites that were studied were detected in our HPLC-ED conditions.

Statistical analysis was carried out by the comparison of the means ± standard deviation using Student's t test.

## Results

Control animals exposed to white noise showed a lower cochlear DA concentration than animals kept in silence (table 1). The cochlear DA concentration decreased progressively with the noise level. Thus, cochlear DA concentration decreased 35.5% when animals were exposed to 70 dB SPL ( $p < 0.05$ ), 44% ( $p < 0.01$ ) when animals were exposed to 90 dB SPL and 63% ( $p < 0.001$ ) after an exposure of 110 dB SPL.

Piribedil-treated animals presented scarcely lower cochlear DA concentrations after white noise stimulation than those in silence conditions (table 2). Thus, after 70 dB SPL exposure, cochlear DA concentration was 87% of that in silence, after 90 dB SPL 84%, and after 110 dB

**Table 3.** Comparison between cochlear DA concentrations in control and piribedil-treated animals

Control/treated	Silence	70 dB	90 dB	110 dB
Silence	NS			
70 dB		<0.05		
90 dB			<0.05	
110 dB				<0.001

Statistical analysis performed with Student's t test.

SPL 75%. This decrease was of no significance at 70 and 90 dB SPL. Only those animals exposed to 110 dB SPL showed a slightly significant decrease in cochlear DA concentration ( $p < 0.05$ ).

The statistical comparison between cochlear DA concentrations in control and piribedil-treated animals is shown in table 3. Differences were observed only in noise-exposed animals. Thus, cochlear DA concentrations were significantly different at 70 dB SPL and higher, being highly significant at 110 dB SPL ( $p < 0.001$ ).

## Discussion

The findings of the present paper indicate that cochlear DA concentration is dependent on sound stimulation. This finding obtained from pigmented rats fits well with previously reported data obtained from albino rats [9]. Thus, DA, a putative efferent neurotransmitter, could be involved in the auditory process. Met-enkephalin,

another putative neurotransmitter from the cochlear efferent system, showed a turnover increase during sound stimulation [11]. Moreover, met-enkephalin and GABA concentrations increased in the perilymph during noise exposure [12]. The present results indicate that DA has a similar turnover to that of other putative lateral efferent system neurotransmitters (e.g. met-enkephalin or GABA) and could participate in the regulation of the activity of primary afferent fibers. As met-enkephalin did [11], the cochlear DA concentration strongly decreased (35.5%) after 1h of a 70-dB exposure, suggesting that the dopaminergic lateral olivocochlear fibers may discharge even with moderate noise stimuli.

Animals pretreated with piribedil, a dopaminergic D<sub>2</sub> agonist, and exposed to white noise exhibited a different cochlear DA turnover from that of control (untreated) animals. In fact, in piribedil-treated animals, the cochlear DA concentration did not decrease with noise level. Only those animals exposed to 110 dB after piribedil treatment showed a slight significant decrease in cochlear DA concentration (26%; *p* < 0.05). This finding shows that piribedil diminished the cochlear DA turnover in animals exposed to white noise.

Piribedil, as a D<sub>2</sub> agonist, might act directly on D<sub>2</sub> cochlear receptors. But, within the cochlea, the presence of dopaminergic receptors, and their types, remains unknown. They could be located on afferent dendrites (post-synaptic), on efferent dopaminergic ends (presynaptic autoreceptors) and on cochlear blood vessels, as in other parts of neural system [13–15]. Present results show that piribedil produces a decrease in cochlear DA turnover when the auditory system is stimulated. This suggests that piribedil could act on D<sub>2</sub> receptors located on cochlear nerve fibers, although we cannot exclude the presence of D<sub>2</sub> receptors on cochlear blood vessels.

Acting on cochlear dopaminergic receptors, piribedil could mimic the effects of endogenous DA in physiological and/or pathological conditions and, therefore, could protect auditory receptors in pathologies affecting the cochlear dopaminergic system.

### Acknowledgements

This work has been supported by I.R.I.S. Servier, Courbevoie, France.

### References

- Gil-Loyzaga P, Parés-Herbuté N: Presence of noradrenaline and dopamine in the adult and developing rat cochlea. *Neurosci Lett* 1986; 26(suppl):134.
- Gil-Loyzaga P, Parés-Herbuté N: HPLC detection of dopamine and noradrenaline in the cochlea of adult and developing rats. *Brain Res [Devl Brain Res]* 1989;48:157–160.
- Jones N, Fex J, Altschuler RA: Tyrosine hydroxylase immunoreactivity identifies possible catecholaminergic fibers in the organ of Corti. *Hear Res* 1987;30:33–38.
- Usami SI, Hozawa J, Tazawa M, Yoshihara T, Igarashi M, Thompson GC: Immunocytochemical study of catecholaminergic innervation in the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1988;447(suppl):36–45.
- Charachon G, Eybalin M: Putative dopaminergic efferent (olivocochlear) innervation of the cochlea: Immunoelectron microscopy and effects of 6-OHDA. *Eur J Neurosci* 1990; 3(suppl):152.
- Klinke R, Evans EF: Evidence that catecholamines are not the afferent transmitter in the cochlea. *Exp Brain Res* 1977;28:315–324.
- Bobbin RP, Thompson MH: Effects of putative transmitters on afferent cochlear transmission. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1978;87:185–190.
- Comis SD, Leng G: Action of putative neurotransmitters in guinea pig cochlea. *Exp Brain Res* 1979;36:119–128.
- Gil-Loyzaga P, Cousillas H, Esquifino A, Remezal M, Arce A, Moreno LI: Evidence for dopamine release during sound stimulation. 28th Workshop on Inner Ear Biology, Tübingen, 1991, p 37.
- Engel J, Granerus A, Svanborg A: Piribedil in Parkinson's syndrome: A clinical study. *Eur J Clin Pharmacol* 1975;8:223–226.
- Eybalin M, Rebillard G, Jarry TH, Cupo A: Effect of noise level on the met-enkephalin content of the guinea pig cochlea. *Brain Res* 1987; 418:189–192.
- Drescher MJ, Drescher DG, Medina JE: Effects of sound stimulation at several levels on concentrations of primary amines, including neurotransmitters candidates in perilymph of the guinea pig inner ear. *J Neurochem* 1983;41: 309–320.
- Mac Culloch J, Edvinsson L: Cerebral circulatory and metabolic effects of piribedil. *Eur J Pharmacol* 1980;66:327–337.
- Dubocovich ML, Weiner N: Modulation of the stimulation-evoked release of <sup>3</sup>H-dopamine in the rabbit retina. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 219:701–707.
- Timmerman W, De Vries JB, Westerink BHC: Effects of D-2 agonists on the release of dopamine: Localization of the mechanism of action. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1990; 342:650–654.



### **PUBLICACION 3**

*El piribedil afecta el turnover de la dopamina en las cócleas estimuladas con ruido blanco.*

Gil-Loyzaga, P., **Vicente-Torres, M.A.**, Fernández-Mateos, P., Arce, A. y Esquifino, A. Piribedil affects dopamine turnover in cochleas stimulated by white noise. *Hear. Res.*, 79 (1994) 178-182.

## Piribedil affects dopamine turnover in cochleas stimulated by white noise

Pablo Gil-Loyzaga <sup>a,\*</sup>, Maria Angeles Vicente-Torres <sup>a</sup>, Pilar Fernández-Mateos <sup>a</sup>, Agustín Arce <sup>b</sup>, Ana Esquifino <sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Laboratorio de Neurobiología Sensorial y Audiología, Departamento de Ciencias Morfológicas, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Apartado de Correos 60075, 28080 Madrid, Spain*

<sup>b</sup> *Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain*

(Received 14 August 1993; revision received 18 March 1994; accepted 1 June 1994)

### Abstract

The presence of dopamine (DA) within the cochlea has been previously reported, indicating that its turnover increases under noise stimulation. In the present report, piribedil, a dopaminergic D<sub>2</sub> agonist, was used in order to provide evidence of the activity of D<sub>2</sub> receptors in the turnover of DA under noise stimulation. Long-Evans rats were intraperitoneally injected with distilled water or with a solution of piribedil one hour previously to either noise or silence exposure. Noise stimulation was performed in an anechoic chamber at 70, 90 or 110 dB SPL for one hour. The animals were then sacrificed and the cochlear contents of DA and its metabolites dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) were quantified by HPLC with electrochemical detection. The administration of piribedil to animals kept in silence did not modify the cochlear DA, DOPAC and HVA content. Noise stimulation resulted in a decrease of the cochlear DA content and an increase of the cochlear DOPAC and HVA contents in vehicle treated animals. The administration of piribedil resulted in a blockade of this noise induced cochlear DA turnover. These results suggest that piribedil stimulates cochlear D<sub>2</sub> receptors controlling the cochlear DA release. Piribedil action on D<sub>2</sub> receptors could explain the improvement observed in some cochleo-vestibular diseases signs after piribedil treatment.

*Key words:* Dopamine release; White noise; HPLC; D<sub>2</sub> agonist; Piribedil; Olivocochlear efferent system; Cochlea

### 1. Introduction

Catecholaminergic systems projecting to the cochlea were described earlier by using the Falk-Hillarp fluorescence method (Terayama et al., 1966; Vinnikov et al., 1966; Spöndlin and Lichtensteiger, 1966, 1967; Ross, 1971; Densert, 1974; Ylikowski et al., 1979a,b) and electronmicroscopy (Terayama et al., 1968; Ross, 1971; Densert and Flock, 1974). Two of these catecholaminergic systems, from the stellate and the superior cervical ganglions, were found respectively projecting around the blood vessels, and independently of them, in the vicinity of the habenula perforata (Vinnikov et al., 1966; Spöndlin and Lichtensteiger, 1966, 1967; Terayama et al., 1966, 1968; Ross, 1971; Densert,

1974; Densert and Flock, 1974). A third system, earlier only observed by Vinnikov et al. (1966), was found within the inner spiral bundle.

The presence of catecholamines within these three neural bundles has been analyzed using immunocytochemistry, 6-hydroxydopamine toxicity and autoradiography. In fact, the presence of tyrosine hydroxylase (TH)-like immunoreactivity, and the absence of dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH)-like and phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT)-like immunoreactivities on fibers belonging to the inner and the tunnel spiral bundles, could suggest that they contain dopamine (DA) (Jones et al., 1987; Usami et al., 1988). Immunoelectronmicroscopic studies of TH expression indicated that TH-like immunoreactive fibers located within the organ of Corti could correspond to the olivocochlear lateral efferent system (Charachon and Eybalin, 1990; Eybalin et al., 1993). This result fits

\* Corresponding author. Fax: +34 (1) 394-1374.

well with the presence of TH, and the absence of DBH, within the lateral superior oliva (Jones and Beaudet 1987; Jones et al., 1987; Vincent, 1988). Moreover, nerve fibers distributed outside of the organ of Corti, associated or not to blood vessels, exhibited TH-like and DBH-like immunoreactivity, this being negative DBH-like immunoreactivity, which probably suggests that they contain noradrenaline (NA) (Jones et al., 1987; Usami et al., 1988), without excluding the presence of DA within them.

Results obtained by 6-hydroxydopamine induced toxicity or autoradiography were consistent with those observed using immunocytochemistry. The 6-hydroxydopamine is a catecholaminergic isomer of NA selectively taken up by either noradrenergic or dopaminergic fibers. The *intra-cochlear* (Charachon and Eybalin 1990; Eybalin et al., 1993) or systemic (Densert, 1975) administration of 6-hydroxydopamine resulted in the degeneration of sympathetic nerve fibers projecting to the cochlea, independently or not of blood vessels, and also of some fibers belonging to the inner spiral and tunnel olivocochlear efferent bundles (Densert, 1975; Charachon and Eybalin 1990; Eybalin et al., 1993).

However, the uptake of  $^3\text{H}$ -NA was only reported on sympathetic terminals, but not on fibers belonging to the inner spiral and tunnel bundles (Eybalin et al., 1983). Dopaminergic fibers can also take up  $^3\text{H}$ -NA, however, as was indicated by Eybalin et al. (1983), their experiments avoided this uptake because of the method that they used. All these results strongly support the hypothesis that, in the cochlea, dopaminergic fibers could be mainly located in the olivocochlear lateral system, while blood vessel- and non blood vessel-associated sympathetic fibers could be mainly noradrenergic (Eybalin, 1993).

Cochlear catecholamine concentrations have been analyzed using high-performance liquid chromatography coupled to electrochemical detection (HPLC-ED) (Rarey et al., 1981, 1982; Gil-Loyzaga and Parés-Herbuté, 1986, 1989). Earlier studies (Rarey et al., 1981, 1982) detected only NA, while more recent studies also showed the presence of DA (Gil-Loyzaga and Parés-Herbuté, 1986, 1989) and its metabolites (Gil-Loyzaga et al., 1993). This later report has also indicated that noise stimulation increases the turnover of cochlear DA (Gil-Loyzaga et al., 1993). This result could be explained by a general effect of noise on all nerve fibers projecting on the cochlea. However, the narrow relationship between noise level and the cochlear content of dopamine, and its metabolites, most probably indicates a direct effect of noise on fibers involved in the auditory reception or modulation, as could be the case of olivocochlear fibers containing DA (Gil-Loyzaga et al., 1993).

Clinical studies using piribedil, a  $\text{D}_2$  agonist, showed an improvement of some symptoms (vertigo, tinnitus,

hypoacusia and sudden hearing loss) associated to cochleo-vestibular diseases. These effects were at first related to the vasodilator power of piribedil (Greiner et al., 1975; Bille et al., 1986). Recent related studies have suggested that piribedil might act on cochlear dopaminergic receptors (Gallet and Ané, 1989). All these data suggest that the before mentioned diseases might be associated with lower cochlear levels of DA.

The aim of the present experimental work was to analyze the effect of piribedil on the cochlear DA metabolism under noise stimulation, trying to add information to the aforementioned clinical results. For that purpose, the cochlear contents of DA and its metabolites dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) were quantified after white noise stimulation, under piribedil or vehicle treatment. Preliminary results of the present manuscript were reported in a short form (Vicente-Torres et al., 1993).

## 2. Materials and methods

Forty eight Long-Evans adult male rats (body weight approx. 200 g) were used. Half of the animals were intraperitoneally injected with 20 mg/kg of piribedil (Servier Laboratories, France) one hour before the beginning of the noise stimulation. The other half remained as control being injected with distilled water. Animals were divided in several groups and, under general anesthesia (Urethane), exposed to white noise at 70, 90 or 110 dB SPL or kept in silence for one hour. Noise stimulation was carried out in an anechoic chamber which allowed a maximum of 30 dB SPL of exterior noise to pass. After noise stimulation, still under general anesthesia, the animals were immediately decapitated. Both cochleas were removed in less than ninety seconds. Each whole cochlea was independently crushed in 200  $\mu\text{l}$  of chilled 0.2 M perchloric acid, then they were sonicated and centrifugated (11000 rpm, 10 min, + 4°C). Supernatants were quickly frozen at - 80°C and stored for no more than three days.

Cochlear supernatants were injected into a HPLC-ED system for quantifying DA, DOPAC and HVA concentrations. The separation of catecholamines was achieved by a reverse phase column (Nucleosil 5 C18 100A, 150  $\times$  4.6 mm) using a 0.1 M acetate-0.1 M citrate buffer (pH 4) (containing 228 mg/l of EDTA, 45 mg/l of sodium octyl sulphate) with 10% of methanol, as the mobile phase. The flow rate was set at 1 ml/min. Detection was carried out with a coulometric detector (Coulchem 5100A, ESA). Fixed potentials vs  $\text{H}_2/\text{H}^+$  reference electrodes were: conditioning electrode = -0.40 V, preoxidation electrode = +0.10 V and working electrode = +0.35 V. Catecholamine concentrations were quantified from the chromatographic peak heights using external standards (DA and

DOPAC from Sigma and HVA from Merck). The linearity of the detector response for DA, DOPAC and HVA was tested within the concentration ranges detected in the cochlear supernatants. Neither piribedil nor three of its metabolites were detected in our HPLC-ED conditions.

Statistical analysis was carried out by comparison of mean  $\pm$  standard deviation using the Student's *t*-test.

### 3. Results

White noise stimulation induced a decrease of the cochlear DA concentration in control animals, being more evident under the highest noise intensities (Fig. 1). In piribedil treated animals, cochlear DA content did not change at 70 or 90 dB SPL as compared to animals kept in silence, although at 110 dB SPL a scarcely significant decrease in cochlear DA content with respect to the silence content was found (Fig. 1). Significant differences between the cochlear DA content in piribedil and vehicle treated animals were found when animals had been exposed to noise, but not after silence conditions (Fig. 1).

Cochlear DOPAC concentration in control animals progressively increased with noise intensity. The difference from silence conditions resulted significant from 90 dB SPL on. In animals under piribedil treatment, cochlear DOPAC concentrations were similar in noise exposed animals as compared to those kept in silence

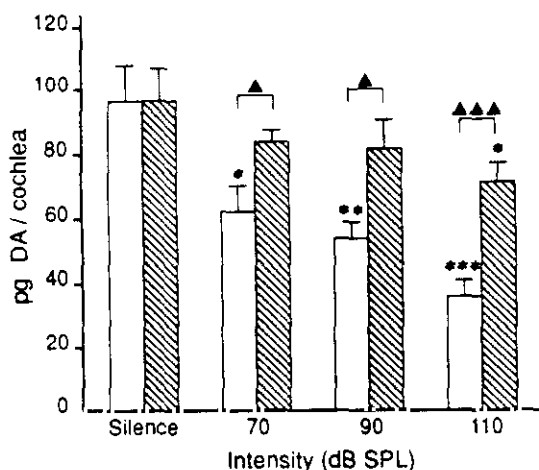


Fig. 1. Cochlear DA concentration after silence or noise stimulation at 70, 90 or 110 dB SPL. Empty bars = distilled water treated animals, striped bars = piribedil treated animals. Comparisons between silence conditions and noise stimulation are given as \* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ . Animals treated with piribedil showed no significant difference from silence at intensities lower than 110 dB SPL. Comparisons between piribedil and distilled water treated animals are given as  $\blacktriangle$  =  $P < 0.05$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$  =  $P < 0.001$ . After silence conditions, no significant difference between piribedil and distilled water treated animals was found. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $N = 12$  in each group).

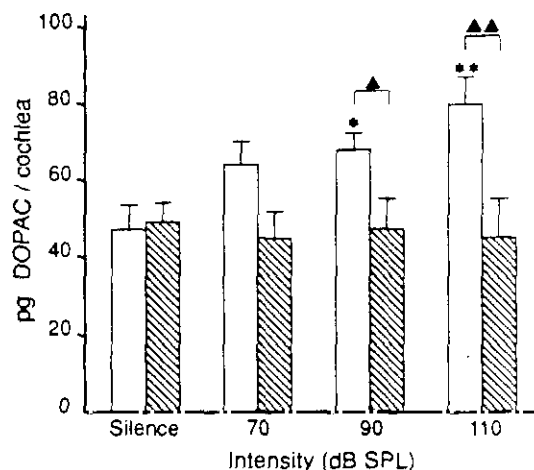


Fig. 2. Cochlear DOPAC concentration after silence or noise stimulation at 70, 90 or 110 dB SPL. Empty bars = distilled water treated animals, striped bars = piribedil treated animals. Comparisons between silence conditions and noise stimulation are given as \* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$ . This comparison resulted no significant at 70 dB SPL in control animals and at any intensity level in piribedil treated ones. Comparisons between piribedil and distilled water treated animals are given as  $\blacktriangle$  =  $P < 0.05$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle$  =  $P < 0.01$ . No significant difference was found under silence conditions and after 70 dB SPL exposure. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $N = 12$  in each group).

(Fig. 2). As for DA, after silence conditions, there was no difference between the cochlear DOPAC content in piribedil and in vehicle treated animals, but significant differences were found in animals exposed to 90 or 110 dB SPL (Fig. 2).

Control animals exposed to noise showed an increased cochlear HVA concentration with respect to control group animals kept in silence, this difference being statistically significant at 110 dB SPL (Fig. 3). Cochlear HVA concentration analyzed in piribedil treated animals did not show any change between animals which had been noise-exposed or those kept in silence. Differences in cochlear HVA concentrations between piribedil treated and control animals were only significant in animals exposed to noise at 110 dB SPL (Fig. 3).

### 4. Discussion

In control (vehicle treated) pigmented rats, cochlear DA concentration diminished with the noise level, meanwhile DOPAC and HVA concentrations increased. As has been previously reported (Gil-Loyzaga et al., 1993), the decrease in the cochlear DA content, together with the increase in its metabolites content, suggests that noise exposure increases the turnover of DA within the cochlea. Recent immunohistochemical studies have suggested that the main source of DA

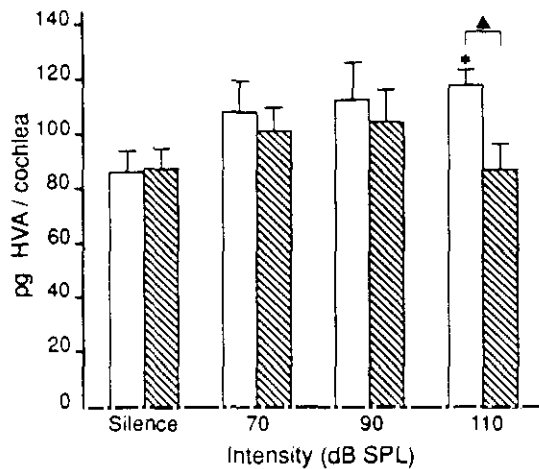


Fig. 3. Cochlear HVA concentration after silence or noise stimulation at 70, 90 or 110 dB SPL. Empty bars = distilled water treated animals, striped bars = piribedil treated animals. Only distilled water treated animals presented a significant difference from silence conditions at 110 dB SPL stimulation (\* =  $P < 0.05$ ). Also at 110 dB, it was detected the just significant difference between piribedil and distilled water treated animals ( $\blacktriangle$  =  $P < 0.05$ ). Values are given as mean  $\pm$  SEM ( $N = 12$  in each group).

within the cochlea could be located in the olivocochlear lateral efferent endings (Eybalin et al., 1993; Eybalin, 1993) without excluding the presence of DA in perivascular and other non-perivascular fibers (Jones et al., 1987; Usami et al., 1988). Additional information from other LOC putative neurotransmitters, such as GABA and Met-Enkephalin, favours the hypothesis that DA can be also considered a LOC putative neurotransmitter. In fact, GABA and Met-Enkephalin, that, within the cochlea seem to belong only to the LOC system, also showed a turnover increase under noise stimulation (Drescher et al., 1983; Eybalin et al., 1987).

The increase in the cochlear DA turnover observed in control animals exposed to noise was blocked in animals pretreated with piribedil. When animals remained in silence, cochlear DA, DOPAC and HVA concentrations were similar between cochleas from controls and piribedil treated animals. These results indicate that piribedil effects were only detected after noise exposure. In other nervous system regions, controversial results have been reported about the effect of DA agonists and antagonists on the basal DA release (Zetterström and Ungerstedt, 1984; Parker and Cubeddu, 1985; Altar et al., 1987; Wood et al., 1987; Yokoo et al., 1988; Starke et al., 1989; Timmerman et al., 1990). Whereas, the effects of the administration of  $D_2$  agonists or antagonists on DA evoked release are better understood (Farnebo and Hamberger, 1971; Cubeddu and Hoffmann, 1983; Parker and Cubeddu, 1985; Altar et al., 1987; Mayer et al., 1988; Starke et al., 1989; Palij et al., 1990).

In the central nervous system, either  $D_2$  receptors, presynaptic or postsynaptic, have been involved in the control of DA release (Farnebo and Hamberger, 1971; Kehr et al., 1972; Groves et al., 1975; Zetterström and Ungerstedt, 1984; Starke et al., 1989; Palij et al., 1990; Timmerman et al., 1990; Costentin, 1991). Present results could indicate a similar effect of piribedil on the cochlea. The inhibition of the DA release evoked by piribedil could be due to the stimulation of  $D_2$  receptors located on the dopaminergic LOC neurons. Moreover, a postsynaptic feedback loop, including or not the cochlear nuclei and the olivocochlear system, could be suggested. Recent morphological and electrophysiological studies supported an action of piribedil on the cochlear primary afferent dendrites (Pujol et al., 1993).

The stimulation of putative postsynaptic  $D_2$  receptors located on the primary afferent dendrites, besides controlling the release of DA, could mimick the effects of endogenous DA in physiological and/or in pathological conditions. These effects could explain the improvement of the clinical symptoms of some cochleo-vestibular diseases (vertigo, tinnitus, hypoacusia and sudden hearing loss) after piribedil treatment.

#### Acknowledgements

Authors are grateful to Mr. David B. Doig for language correction. This work has been supported by grants from Spanish DGICYT (PB91-0361) and FISss (92/141) and from Servier Laboratories (Courbevoie, France).

#### References

- Altar, C.A., Boyar, W.C., Oei, E. and Wood, P.L. (1987) Dopamine autoreceptors modulate the in vivo release of dopamine in the frontal, cingulate and entorhinal cortices. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 242, 115–120.
- Bille, J., Bukowski, J.V., De Ferron, C., Delatour, F., Dollet, J., Fauchon, P., Franck, T., Girard, J.L., Granier, G., Herbin, H., Manciet, G., Nunzi, R., Roux, M., Schneider, H. and Rivière, J.P. (1986) Déclin cérébral et thérapeutique: Une étude clinique multicentrique du Trivastal 50 Retard\* en Neuro-Gérontologie. *Psychol. Méd.* 18, 609–626.
- Charachon, G. and Eybalin, M. (1990) Putative dopaminergic efferent (olivocochlear) innervation of the cochlea: Immunoelectron microscopy and effects of 6-OHDA. *Eur. J. Neurosci. Suppl.* 3, 152.
- Costentin, J. (1991) Récepteurs dopaminergiques: pluralité et interactions. *JAMA Suppl. Hors série*, 9–15.
- Cubeddu L.X. and Hoffmann, I.S. (1983) Frequency-dependent release of acetylcholine and dopamine from rabbit striatum: its modulation by dopaminergic receptors. *J. Neurochem.* 41, 94–101.
- Densert, O. (1974) Adrenergic innervation in the rabbit cochlea. *Acta Oto-Laryngol.* 78, 345–356.
- Densert, O. (1975) The effect of 6-hydroxydopamine on the rabbit cochlea. *Acta Oto-Laryngol.* 79, 339–351.
- Densert, O. and Flock, Á. (1974) An electron-microscopic study of

- renergic innervations in the cochlea. *Acta Oto-Laryngol.* 77, 15–197.
- cher, M.J., Drescher, D.G. and Medina, J.E. (1983) Effects of sound stimulation at several levels on concentrations of primary amines, including neurotransmitter candidates in perilymph of the guinea pig inner ear. *J. Neurochem.* 41, 309–320.
- ebalin, M., Rebillard, G., Jarry, T.H. and Cupo, A. (1987) Effect of noise level on the Met-enkephalin content of the guinea pig cochlea. *Brain Res.* 418, 189–192.
- Eybalin, M. (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol. Rev.* 73, 309–373.
- Eybalin, M., Calas, A. and Pujol, R. (1983) Radioautographic study of the sympathetic fibers in the cochlea. *Acta Oto-laryngol.* 96, 69–74.
- Eybalin, M., Charachon, G. and Renard, N. (1993) Dopaminergic lateral efferent innervation of the guinea-pig cochlea: immunoelectron microscopy of catecholamine-synthesizing enzymes and effect of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 54, 133–142.
- Ernebo, L. and Hamberger B. (1971) Drug-induced changes in the release of 3H-monoamines from field stimulated rat brain slices. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 371, 35–44.
- Gallet, B. and Ané, P. (1989) Efficacité de Trivastal 50 Retard dans les syndromes cochléo-vestibulaires. *Arch. Otolaryngol. Hors-série* Juillet, 50–54.
- Gil-Loyzaga, P. and Parés-Herbuté, N. (1986) Presence of noradrenaline and dopamine in the adult and developing rat cochlea. *Neurosci. Lett. Suppl.* 26, 134.
- Gil-Loyzaga, P. and Parés-Herbuté, N. (1989) HPLC detection of dopamine and noradrenaline in the cochlea of adult and developing rats. *Devl. Brain Res.* 48, 157–160.
- Gil-Loyzaga P., Fernández-Mateos P., Vicente-Torres MA, Remezal M, Cousillas H, Arce A, Esquilino A (1993) Effects of noise stimulation on cochlear dopamine metabolism. *Brain Res.* 623, 177–180.
- Greiner G.F., Conraux, C. and Gillet, B. (1975) Le Trivastal dans les troubles cochléo-vestibulaires d'origine vasculaire. Intérêt thérapeutique de la forme injectable et du comprimé à libération contrôlée. *Vie Méd.* 34, 2876.
- Groves, P.M., Wilson, C.J., Young, S.J. and Rebec, G.V. (1975) Self-inhibition by dopaminergic neurons. *Science* 190, 522–529.
- Jones, B.E. and Beaudet, A. (1987) Distribution of acetylcholine and catecholamine neurons in the cat brainstem: a choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 261, 15–32.
- Jones, N., Fex, J. and Altschuler, R.A. (1987) Tyrosine hydroxylase immunoreactivity identifies possible catecholaminergic fibers in the organ of Corti. *Hear. Res.* 30, 33–38.
- Kehr, W., Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T. and Atack, C. (1972) Evidence for a receptor-mediated feedback control of striatal tyrosine hydroxylase activity. *J. Pharm. Pharmacol.* 24, 744–747.
- Mayer, A., Limberger, N. and Starke, K. (1988) Transmitter release patterns of noradrenergic, dopaminergic and cholinergic axons in rabbit brain slices during short pulse trains, and the operation of presynaptic autoreceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 338, 632–643.
- Palič, P., Bull, D.R., Sheehan, M.J., Millar, J., Stamford, J., Kruk, Z.L. and Humphrey, P.P.A. (1990) Presynaptic regulation of dopamine release in corpus striatum monitored by fast cyclic voltammetry. *Brain Res.* 509, 172–174.
- Parker, E.M. and Cubeddu, L.X. (1985) Evidence for autoreceptor modulation of endogenous dopamine release from rabbit caudate nucleus in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Therapy* 232, 492–500.
- Pujol, R., Puel, J.L., Cervais d'Audin, C. and Eybalin, M. (1993) Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 113, 330–334.
- Rarey, K.E., Ross, M.D. and Smith, C.B. (1981) Quantitative evidence for cochlear, non-neuronal norepinephrine. *Hear. Res.* 5, 101–108.
- Rarey, K.E., Ross, M.D. and Smith, C.B. (1982) Distribution and significance of norepinephrine in the lateral cochlear wall of pigmented and albino rats. *Hear. Res.* 6, 15–23.
- Ross, M.D. (1971) Fluorescence and electron microscopic observations of the general visceral efferent innervation of the inner ear. *Acta Oto-laryngol. Suppl.* 286, 1–18.
- Spoendlin, H. and Lichtensteiger, W. (1966) The adrenergic innervation of the labyrinth. *Acta Oto-laryngol.* 61, 423–434.
- Spoendlin, H. and Lichtensteiger, W. (1967) The sympathetic nerve supply to the inner ear. *Arch. Klin. Exp. Ohren-Nasen-Kehlkopfheilk.* 189, 346–359.
- Starke, K., Göthert, M. and Kießinger, H. (1989) Modulation of the neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol. Rev.* 69, 864–989.
- Terayama, Y., Holz, E and Beck, C. (1966) Adrenergic innervation of the cochlea. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 75, 69–86.
- Terayama, Y., Yamamoto, K. and Sakamoto, T. (1968) Electron microscopic observations of the postganglionic sympathetic fibers in the guinea pig cochlea. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 77, 1152–1170.
- Timmerman, W., De Vries, J.B. and Westerink, B.H.C. (1990) Effects of D-2 agonists on the release of dopamine: localization of the mechanism of action. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342, 650–654.
- Usami, S.I., Hozawa, J., Tazawa, M., Yoshihara, T., Igarashi, M. and Thompson, G.C. (1988) Immunocytochemical study of catecholaminergic innervation in the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.* 447, 36–45.
- Vicente-Torres, M.A., Gil-Loyzaga, P., Fernández, P., Arce, A. and Esquilino, A. (1993) Piribedil could modify dopamine turnover in cochleas under noise stimulation. *ORL* 55, 322–324.
- Vincent, S.R. (1988) Distribution of tyrosine hydroxylase-, dopamine- $\beta$ -hydroxylase-, and phenylethanolamine-N-methyltransferase-immunoreactive neurons in the brain of the hamster *Mesocricetus auratus*. *J. Comp. Neurol.* 268, 584–599.
- Vinnikov, Y.A., Govyryn, V.A., Leonteva, G.R. and Anichin, V.F. (1966) The adrenergic innervation of the organ of Corti (English translation: consultants Bureau, NY). *Dokl. Akad. Nauk.* 171, 835–838.
- Wood, P.L., Kim, H.S. and Altar, C.A. (1987) In vivo assessment of dopamine and norepinephrine release in rat neocortex: gas chromatography-mass spectrometry measurement of 3-methoxytyramine and normetanephrine. *J. Neurochem.* 48, 574–579.
- Yokoo, H., Goldstein, M. and Meller, E. (1988) Receptor reserve at striatal dopamine receptors modulating the release of [ $^3$ H]dopamine. *Eur. J. Pharmacol.* 155, 323–327.
- Ylikowski, J., Partanen, S. and Palva, T. (1979a) Adrenergic innervation of the eighth nerve and vestibular end organs in man. *Arch. Oto-rhino-laryngol.* 224, 17–23.
- Ylikowski, J., Partanen, S. and Palva, T. (1979b) Adrenergic innervation of blood vessels. A fluorescence microscopic study of the eighth nerve and inner ear structures in man. *Arch. Otolaryngol.* 105, 726–729.
- Zetterström, T. and Ungerstedt, U. (1984) Effects of apomorphine on the in vivo release of dopamine and its metabolites, studied by brain dialysis. *Eur. J. Pharmacol.* 97, 29–36.

#### **PUBLICACION 4**

*Efecto de la estimulación acústica sobre la concentración de noradrenalina coclear.*

**Vicente-Torres, M.A.** y Gil-Loyzaga, P. Effect of noise stimulation on cochlear norepinephrine concentration. *Brain Res.*, *remitido*.

**EFFECT OF NOISE STIMULATION ON COCHLEAR  
NOREPINEPHRINE CONCENTRATION**

M<sup>a</sup> Angeles Vicente-Torres and Pablo Gil-Loyzaga

Centro de Cultivos Celulares (CAI) and Departamento de Cirugía II  
(ORL), Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid,  
Spain

Address for correspondence: Pablo Gil-Loyzaga, Apartado de  
Correos 60075, 28080 Madrid, Spain. Telephone number: 34-91-  
3941384 and 34-91-3941375, Telefax: 34-91-3941383.



**Abstract**

Sympathetic fibers projecting to the cochlea modulate the cochlear blood flow and the activity of the cochlear nerve, which are modified by noise exposure. In the present study the cochlear concentration of norepinephrine (NE) was measured by HPLC in rats that were exposed to silence or white noise. Blood was eliminated by aortic perfusion in half of the animals and the cochlear blood-independent pool of NE measured. Cochlear NE concentration decreased due to acoustic stimulation, independently of the strain and the perfusion, which could be interpreted as a noise induced release of NE by sympathetic fibers.

*Keywords:* Norepinephrine; Sympathetic innervation; Noise; Cochlea; HPLC; Rat

Sympathetic fibers projecting to the cochlea have a dual origin in the superior cervical ganglion and the stellate ganglion [5,14,22,23,32,36-38,40,41]. In addition these fibers have a dual peripheral distribution. Most of them are perivascular but there are also blood vessel-independent fibers throughout the *habenula perforata* area [5-7,9,10,18,21,35,37-42,44].

These sympathetic fibers have been involved in the control of the cochlear blood flow [1,19,22-24,32-34]. Also, they have been related to the modulation of the activity of the cochlear nerve maybe through the blood vessel-independent sympathetic fibers that end at the *habenula perforata* level [17,20,25,26].

Noise stimulation produced cochlear vasoconstriction [2]. In addition, the exposure to noise induced a threshold shift in the auditory potentials [3,17]. Both of these effects seem to be modulated in part by cochlear sympathetic fibers [2,3,17].

Noise also produced the release of neurotransmitters of the olivocochlear lateral efferent system (OLES) in the cochlea. In this way, the releases of GABA [8], Met-enkephalin [11] and dopamine [12,15,16,43] were related to the modulation and protection of the primary afferents [4,27-30]. The aim of the present study was to analyze the effect of acoustic stimulation on the cochlear concentration of the sympathetic neurotransmitter norepinephrine (NE).

For this purpose, 24 Long-Evans and 24 Wistar adult male rats, about 200 g body weight, were exposed to silent conditions or to

white noise at 90 dB SPL for one hour, under urethane anesthesia. Afterwards, cochleas were removed and the concentration of NE determined by high performance liquid chromatography coupled to electrochemical detection (HPLC-ED). Half of the animals were perfused by aortic pathway after acoustic stimulation to eliminate the blood of the cochlea and measure exclusively the blood-independent pool of NE. The perfusion solution was a 0.1M citrate buffer (pH = 4.8) containing 20 g / l of glucose. It was administered at 26°C for 2 min. with the descending aorta clamped.

The processing of the cochleas was as previously described with minor modifications [12,15,16,43]. Briefly, cochleas were independently crushed in 0.2 M perchloric acid, sonicated, centrifuged and supernatants injected into the HPLC system. Separation of monoamines and their metabolites was achieved by a reverse phase column (Nucleosil 5 C18 100A, 150 x 4,6 mm) and a mobile phase constituted by a 0,1 M acetate - 0,1 M citrate buffer (pH = 4), containing 228 mg / l of EDTA, 200 mg / l of sodium octyl sulfate and 10 % of methanol. Detection potentials, fixed in a coulometric detector (Coulchem II, ESA), were: conditioning electrode = -0.45 V, preoxidation electrode = +0.10 V and working electrode = +0.40 V. The concentration of NE was determined from the chromatographic peak areas using the external standard method.

The concentrations of NE were statistically evaluated using a 2 x 2 x 2 (strain x perfusion x noise) independent groups analysis of

variance (ANOVA). Significant interactions were followed by one way ANOVA.

The three-way ANOVA (strain x perfusion x noise) obtained significant main effects just for noise variable and no significant interactions between the three variables. The one-way ANOVA for noise variable showed significant differences ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ ) between silence and 90 dB SPL for perfused and non-perfused animals of both strains (Figs. 1 and 2).

The cochlear concentration of NE decreased about 18% in animals exposed to noise with respect to those kept in silent conditions. This effect was independent of the strain and the perfusion (Figs. 1 and 2).

The decrease of cochlear NE concentration in noisy situations could be interpreted as the release of NE from the cochlear sympathetic fibers induced by noise. The same effect was previously observed with other efferent neurotransmitters: GABA, met-enkephalin and dopamine [8,11,12,15,16,43].

Cochlear sympathetic fibers have been involved in the modulation of the cochlear blood flow and of the activity of the cochlear nerve in noisy situations [2,3,17]. In this way, the observed likely release of NE could support the implication of cochlear sympathetic fibers in these regulatory roles.

The decrease of NE was lower (about 18%) than that detected for dopamine (about 38%) in the same noisy conditions [12,15,16,43]. This fact indicates that NE could play a lower

modulatory role than dopamine within the cochlea, which could be related with their distinct locations in sympathetic or olivocochlear fibers.

The absence of any difference in cochlear NE concentration between rats of distinct pigmentation grade does not agree with previous determinations of NE in the cochlea [31]. However, it agrees with results found within the vestibule with these same two strains [13].

The absence of any modification due to removal of the cochlear blood by aortic perfusion of a buffer solution, could indicate that blood gives just a small amount of NE to the total amount of NE in the cochlea.

The authors are grateful to Mr. F. Carricondo for expert assistance on statistical analysis and to Mr. D. Doig for correction of the English version of the manuscript. This work has been supported by grants from Spanish FISs 95-1540 and Human Capital and Mobility ERBCHRXCT940659.

- [1] Beausang-Linder, M. and Hultcrantz, E., Early effects of cervical sympathetic stimulation on cerebral, ocular and cochlear blood flow, *Acta Physiol. Scand.*, 109 (1980) 433-437.
- [2] Borg, E., Physiological and pathogenic effects of sound, *Acta Otolaryngol. (Suppl.)*, 381 (1981) 1-68.
- [3] Borg, E., Protective value of sympathectomy of the ear in noise, *Acta Physiol. Scand.*, 115 (1982) 281-282.
- [4] Densert, O., Adrenergic innervation in the rabbit cochlea, *Acta Otolaryngol.*, 78 (1974) 345-356.
- [5] D'Aldin, C., Puel, J.L., Leducq, R., Crambes, O., Eybalin, M. and Pujol, R., Effects of a dopaminergic agonist in the guinea pig cochlea, *Hear. Res.*, 90 (1995) 202-211.
- [6] Densert, O., The effect of 6-hydroxydopamine on the rabbit cochlea, *Acta Otolaryngol.*, 79 (1975) 339-351.
- [7] Densert, O. and Flock, A., An electron-microscopic study of adrenergic innervation in the cochlea, *Acta Otolaryngol.*, 77 (1974) 185-197.
- [8] Drescher, M.J., Drescher, D.G., and Medina, J.E., Effects of sound stimulation at several levels on concentrations of primary amines, including neurotransmitter candidates in perilymph of the guinea pig inner ear, *J. Neurochem.*, 41 (1983) 309-320.
- [9] Eybalin, M., Calas, A. and Pujol, R., Radioautographic study of the sympathetic fibers in the cochlea, *Acta Otolaryngol.*, 96 (1983) 69-74.

- [10] Eybalin, M., Charachon, G. and Renard, N., Dopaminergic lateral efferent innervation of the guinea-pig cochlea: immunoelectron microscopy of catecholamine-synthesizing enzymes and effect of 6-hydroxydopamine, *Neuroscience*, 54 (1993) 133-142.
- [11] Eybalin, M., Rebillard, G., Jarry, T.H. and Cupo, A., Effect of noise level on the Met-enkephalin content of the guinea pig cochlea, *Brain Res.* 418 (1987) 189-192.
- [12] Gil-Loyzaga, P., Neurotransmitters of the olivocochlear lateral efferent system: with an emphasis on dopamine, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 115 (1995) 222-226.
- [13] Gil-Loyzaga, P., Vicente-Torres, M.A., García-Bonacho, M., and Esquifino, A., Presence of catecholamines and serotonin in the rat vestibule, *Brain Res.*, 746 (1997) 265-268.
- [14] Gil-Loyzaga, P., Vicente-Torres, M.A., Arce, A., Cardinali, D.P. and Esquifino, A., Effect of superior cervical ganglionectomy on catecholamine concentration in rat cochlea, *Brain Res.*, 779 (1998) 53-57.
- [15] Gil-Loyzaga, P., Vicente-Torres, M.A., Fernández-Mateos, P., Arce, A. and Esquifino, A., Piribedil affects dopamine turnover in cochleas stimulated by white noise, *Hear. Res.*, 79 (1994) 178-182.
- [16] Gil-Loyzaga, P., Fernández-Mateos, P., Vicente-Torres, M.A., Remezal, M., Cousillas, H., Arce, A. and Esquifino, A., Effects of

- noise stimulation on cochlear dopamine metabolism, *Brain Res.*, 623 (1993) 177-180.
- [17] Hildesheimer, M., Sharon, R., Muchnik, C., Sahartov, E. and Rubinstein, M., *The effect of bilateral sympathectomy on noise induced temporary threshold shift*, *Hear. Res.*, 51, (1991) 49-54.
- [18] Hozawa, K. and Kimura, R.S., *Cholinergic and noradrenergic nervous systems in the cynomolgus monkey cochlea*, *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 110 (1990) 46-55.
- [19] Hultcrantz, E., *The effect of noise on cochlear blood flow in the conscious rabbit*, *Acta Physiol. Scand.*, 106 (1979) 29-37.
- [20] Hultcrantz, E., Nuttall, A.L., Brown, M.C. and Lawrence, M., *The effect of cervical sympathectomy on cochlear electrophysiology*, *Acta Otolaryngol.*, 94 (1982) 439-444.
- [21] Jones, N., Fex, J. and Altschuler, R.A., *Tyrosine hydroxylase immunoreactivity identifies possible catecholaminergic fibers in the organ of Corti*, *Hear. Res.*, 30 (1987) 33-38.
- [22] Laurikainen, E.A., Ren, T., Miller, J.M., Nuttall, A.L. and Quirk, W.S., *The tonic sympathetic input to the cochlear vasculature in guinea pig*, *Hear. Res.*, 105 (1997) 141-145.
- [23] Laurikainen, E.A., Kim, D., Didier, A., Ren, T., Miller, J.M., Quirk, W.S. and Nuttall, A.L., *Stellate ganglion drives sympathetic regulation of the cochlear blood flow*, *Hear. Res.*, 64 (1993) 199-204.
- [24] Laurikainen, E.A., Costa, O., Miller, J.M., Nuttall, A.L., Ren, T.Y., Masta, R., Quirk, W.S. and Robinson, P.J., *Neuronal*



- regulation of cochlear blood flow in the guinea-pig, *J. Physiol.*, 480 (1994) 563-573.
- [25] Lee, A.H. and Moller A.R., Effects of sympathetic stimulation on the round window compound action potential in the rat, *Hear. Res.*, 19 (1985) 127-134.
- [26] Pickles, J.O., An investigation of sympathetic effects on hearing, *Acta Otolaryngol.*, 87 (1979) 69-71.
- [27] Puel, J.L. and Pujol, R., Recent advances in cochlear neurobiology: cochlear efferents and acoustic trauma. En M. Vallet (Ed.), *Noise and man*, INRETS Actes no 34 ter, 1993, p.p. 136-145.
- [28] Pujol, R., Lateral and medial efferents: a double neurochemical mechanism to protect and regulate inner and outer hair cell function in the cochlea, *Br. J. Audiol.*, 28 (1994) 185-191.
- [29] Pujol, R., Eybalin, M. and Puel, J.L., Recent advances in cochlear neurotransmission: physiology and pathophysiology, *News Physiol. Sci.*, 10 (1995) 178-183.
- [30] Pujol, R., Puel, J.L., Gervais d'Aldin, C. and Eybalin, M., Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea, *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 113 (1993) 330-334.
- [31] Rarey, K.E., Ross, M.D. and Smith, C.B., Quantitative evidence for cochlear non-neuronal norepinephrine, *Hear. Res.*, 5 (1981) 101-108.

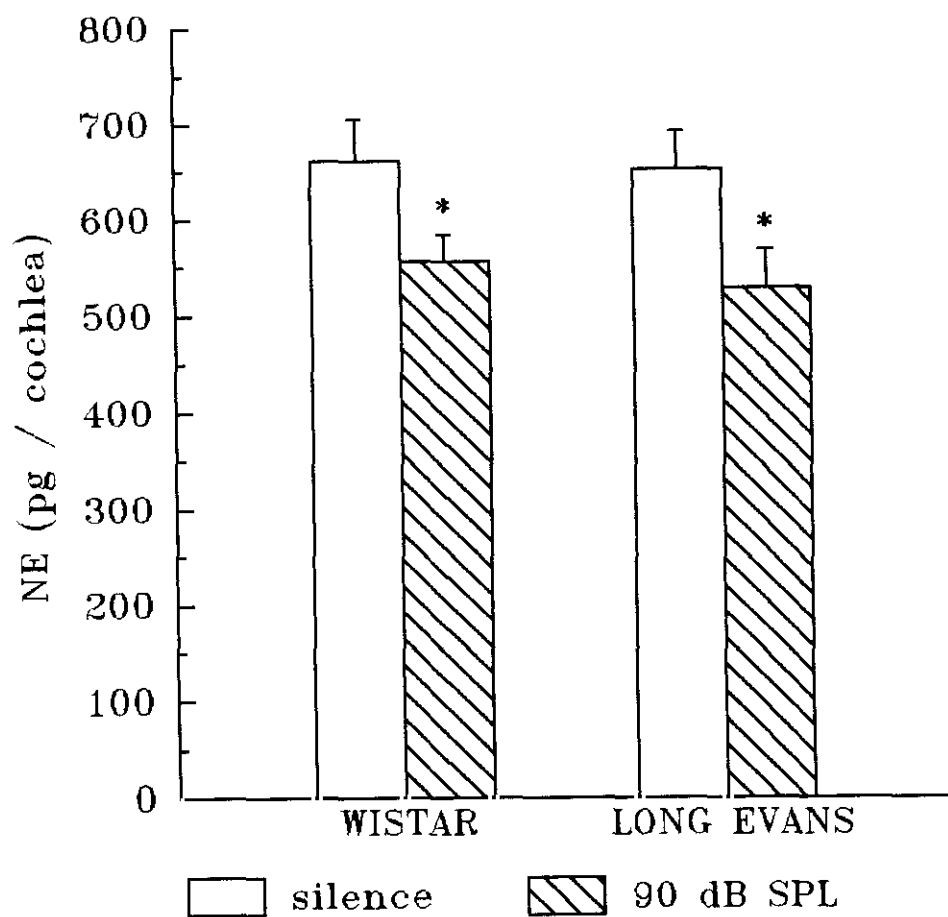
- [32] Ren, T., Laurikainen, E., Quirk, W.S., Miller, J.M. and Nuttall, A.L., Effects of stellate ganglion stimulation on bilateral cochlear blood flow, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 102 (1993) 378-384.
- [33] Ren, T., Laurikainen, E., Quirk, W.S., Miller, J.M. and Nuttall, A.L., Effects of electrical stimulation of the superior cervical ganglion on cochlear blood flow in guinea pig, *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 113 (1993) 146-151.
- [34] Ren, T., Avinash, G.B., Nuttall, A.L., Miller, J.M., Laurikainen, E.A. and Quirk, W.S., Dynamic response of cochlear blood flow to occlusion of anterior inferior cerebellar artery in guinea pigs, *J. Appl. Physiol.*, 76 (1994) 212-217.
- [35] Ross, M.D., Fluorescence and electron microscopic observations of the general visceral, efferent innervation of the inner ear, *Acta Oto-laryngol. Suppl.*, 286 (1971) 1-18.
- [36] Shibamori, Y., Tamamaki, N., Saito, H. and Nojyo, Y., The trajectory of the sympathetic nerve fibers to the rat cochlea as revealed by anterograde and retrograde WGA-HRP tracing, *Brain Res.*, 646 (1994) 223-229.
- [37] Spöndlin, H., Autonomic innervation of the inner ear, *Adv. Oto-Rhino-Laryng.*, 27 (1981) 1-13.
- [38] Spöndlin, H., Primary neurons and synapses. In I. Friedmann and J. Ballantyne (Eds.), *Ultrastructural atlas of the inner ear*, Butterworths, London, 1984, pp. 133-164.

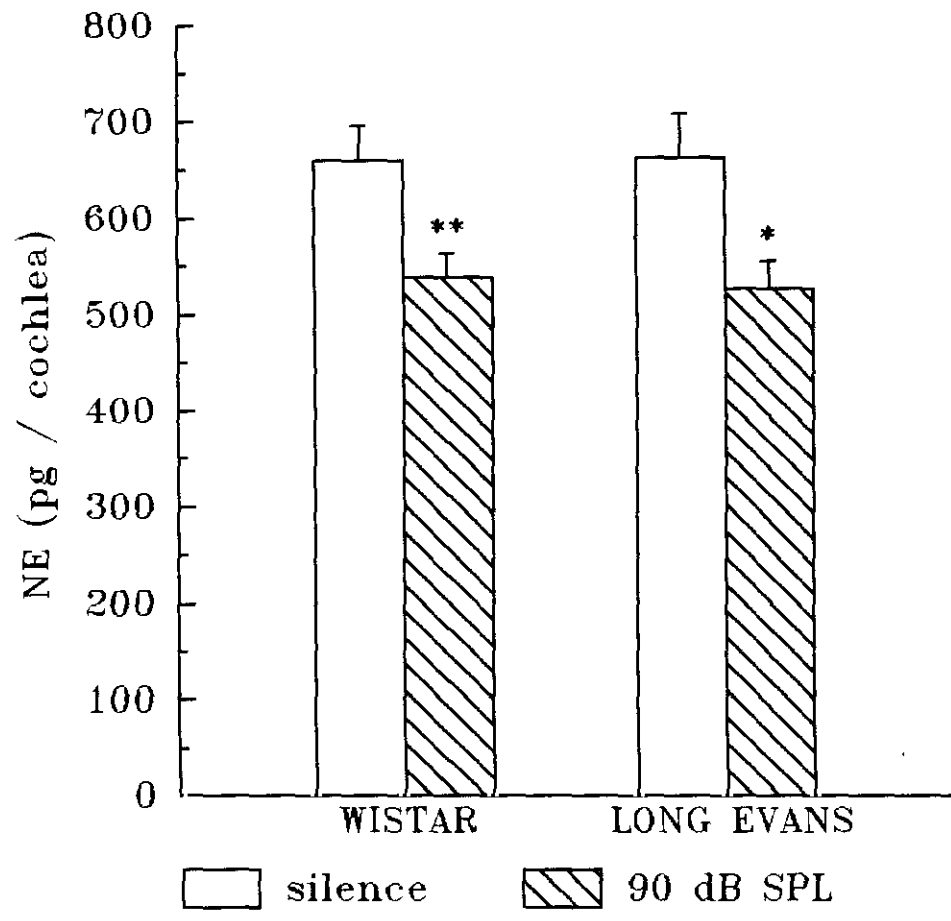
- [39] Spöndlin, H. and Lichtensteiger, W., The adrenergic innervation of the labyrinth, *Acta Oto-laryngol.*, 61 (1966) 423-434.
- [40] Terayama, Y., Holz, E. and Beck, C., Adrenergic innervation of the cochlea, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 75 (1966) 69-86.
- [41] Terayama, Y., Yamamoto, K. and Sakamoto, T., Electron microscopic observations on the postganglionic sympathetic fibers in the guinea pig cochlea, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 77 (1968) 1152-1170.
- [42] Usami, S.I., Hozawa, J., Tazawa, M., Yoshihara, T., Igarashi, M. and Thompson, G.C., Immunocytochemical study of catecholaminergic innervation in the guinea pig cochlea, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 447 (1988) 36-45.
- [43] Vicente-Torres, M.A., Gil-Loyzaga, P., Fernández, P., Arce, A. and Esquifino, A., Piribedil could modify dopamine turnover in cochleas under noise stimulation, *ORL*, 55 (1993) 322-324.
- [44] Vinnikov, Y.A., Govyrin, V.A., Leonteva, G.R. and Anichin, V.F., The adrenergic innervation of the organ of Corti, *Dokl. Akad. Nauk.*, 171 (1966) 835-838.

**Figure legends**

Fig. 1. Concentration of NE in whole cochleas of non-perfused Long-Evans and Wistar rats. Animals were maintained in silence (white bars) or exposed to 90 dB SPL of white noise for one hour (striped bars). Data are presented as means  $\pm$  SEM. N = 12 in each group. Comparisons between silence and noise stimulation are shown as \* =  $p < 0.05$ .

Fig. 2. Concentration of NE in whole cochleas of perfused Long-Evans and Wistar rats. Animals were maintained in silence (white bars) or exposed to 90 dB SPL of white noise for one hour (striped bars). Data are presented as means  $\pm$  SEM. N = 12 in each group. Comparisons between silence and noise stimulation are shown as \* =  $p < 0.05$  and \*\* =  $p < 0.01$ .





## **PUBLICACION 5**

*Efecto de la ganglionectomía cervical superior sobre la concentración de catecolaminas en la cóclea de la rata.*

Gil-Loyzaga, P., **Vicente-Torres, M.A.**, Arce, A. Cardinali, D.P. y Esquifino, A. Effect of superior cervical ganglionectomy on catecholamine concentration in rat cochlea. *Brain Res.*, 779 (1998) 53-57.

Research report

Effect of superior cervical ganglionectomy on catecholamine concentration in rat cochlea

Pablo Gil-Loyzaga<sup>a,b,\*</sup>, M. Angeles Vicente-Torres<sup>a,b</sup>, Agustín Arce<sup>c</sup>, Daniel P. Cardinali<sup>d</sup>, Ana Esquifino<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Centro de Cultivos Celulares (CAI), Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Cirugía II (ORL), Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Accepted 19 August 1997

Abstract

Both noradrenergic and dopaminergic nerve terminals have been described in the cochlea. The present report focused on the effect of superior cervical ganglionectomy (SCGx) on monoamine concentration in adult rat cochlea. In homogenates of whole cochleas, we measured the concentrations of norepinephrine (NE), dopamine (DA) and its main metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA), by HPLC coupled to electrochemical detection. Measurements were carried out 4 h, 24 h or 6 days after unilateral SCGx. Most of the NE (~82%) was lost after sympathectomy on the ipsilateral side, indicating that the principal localization of cochlear NE is in peripheral sympathetic fibers. Since about 18% of NE remained detectable 6 days after SCGx, a second origin of cochlear noradrenergic fibers may exist. Cochlear concentrations of DA or its metabolites did not change after SCGx. Therefore, DA and NE are located in two different populations of fibers within the cochlea, and are presumably related to distinct functional roles. © 1998 Elsevier Science B.V.

**Keywords:** Superior cervical ganglion; Cochlea; Norepinephrine; Dopamine; HPLC; Rat

1. Introduction

The sympathetic innervation of the mammalian cochlea was first described by using histofluorescence and electron microscopy [5,7,31,33–36,39]. Sympathetic fibers were found to distribute following two patterns, i.e. as a perivascular network or as a blood vessel-independent net throughout the habenula perforata area.

Cochlear sympathetic innervation was characterized as noradrenergic, both by using immunocytochemistry against catecholamine-synthesizing enzymes [9,20,37], and by biochemical characterization of norepinephrine (NE) [12,13,26,27]. Fibers containing NE-synthesizing enzymes followed both patterns of cochlear sympathetic innervation, namely vascular and non-vascular [9,20,37]. These observations were generally confirmed by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced degeneration [6,9], and [<sup>3</sup>H]norepinephrine uptake studies [8].

The main origin of cochlear sympathetic fibers could be the superior cervical ganglion (SCG) [5,33,35,36]. Using neurotracing molecules, both vascular and non-vascular noradrenergic fibers were shown to arise in the SCG [32]. In addition, some of these fibers may also originate from the stellate ganglion [21,28,33].

Besides the peripheral sympathetic innervation, there is evidence of the existence of other catecholamine-containing cochlear fibers, as shown by histofluorescence [39] and 6-OHDA toxicity studies [6]. Scattered non-vascular catecholamine-containing fibers were identified under the inner hair cells, within the olivocochlear lateral efferent system fibers, and were characterized as dopaminergic by immunocytochemistry against catecholamine-synthesizing enzymes [9,20,37]. By using HPLC, dopamine (DA) and its main metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA), were detected in homogenates of whole rat cochleas [12,13,15]. In addition, cochlear DA was functionally related to the olivocochlear innervation in sound stimulation experiments [15].

The present study was carried out to examine the

\* Corresponding author. Apartado de Correos 60075, 28080 Madrid, Spain. Fax: (34-1) 3941383.



relative contribution of peripheral sympathetic nerves to the catecholamine content of rat cochlea. For this purpose, cochlear concentrations of NE, DA, DOPAC and HVA were measured by HPLC at different time intervals after unilateral superior cervical ganglionectomy (SCGx).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Twenty one Long-Evans adult male rats (about 200 g b.wt) were used in this study. Animals were housed in a temperature-controlled room at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  with a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 08:00 h) and were given access to food and water ad libitum. This work was carried out according to the recommendations outlined in the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

### 2.2. Surgery

The left SCG was unilaterally and totally removed, under tribromoethanol anaesthesia, at two months of age. A sham operation was performed on the contralateral side. Surgery was carried out through a ventral incision in the neck to the bifurcation of the common carotid artery, where the SCG was located. Sham operations included all the manipulations except for SCG removal. Ipsilateral and contralateral cochleas were processed 4 h, 24 h or 6 days after surgery (six animals per group). In addition, both cochleas of 3 non-operated animals were used as external controls.

### 2.3. Biochemical analysis

The animals, under general anaesthesia (Urethane), were kept in silent conditions for 1 h in an anechoic chamber, which filters exterior noise to less than 30 dB SPL. Then, still under general anaesthesia, both cochleas were rapidly removed and processed as previously reported [14,15,38]. Briefly, cochleas were independently crushed in 200  $\mu\text{l}$  of chilled 0.2 M perchloric acid, sonicated and centrifuged. Supernatants were frozen at  $-80^\circ\text{C}$  and analyzed within three days.

Cochlear supernatants were injected into a HPLC system for measuring NE, DA, DOPAC and HVA concentrations. The separation of catecholamines was achieved by a reverse phase column (Nucleosil 5 C18 100A,  $150 \times 4.6$  mm). The mobile phase was a 0.1 M acetate-0.1 M citrate buffer (pH 4), containing 228 mg/l of EDTA, 200 mg/l of sodium octyl sulfate and 10% of methanol. The flow rate was set at 1 ml/min. Detection was carried out with a coulometric detector (Coulochem 5200, ESA). Fixed potentials vs.  $\text{H}_2/\text{H}^+$  reference electrodes were: conditioning electrode =  $-0.45$  V, preoxidation electrode =  $+0.10$  V and working electrode =  $+0.40$  V. Catecholamine concentrations were calculated from the chromatographic peak

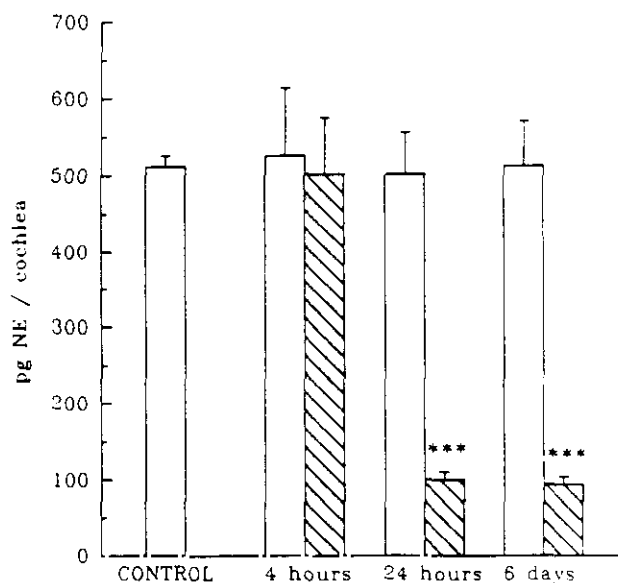


Fig. 1. Concentration of NE in cochleas after ipsilateral SCG removal (striped bars) or sham operation (white bars). The single bar on the left represents the cochlear NE concentration in external control (non-operated) animals. Data are presented as means  $\pm$  S.E.M.  $n = 6$  in each group. Comparisons between SCGx and sham-operated cochleas are shown at different times after surgery. \*\*\*  $P < 0.001$ .

areas using external standards (Sigma). Statistical analysis was carried out by using the Student's  $t$ -test.

## 3. Results

As shown in Figs. 1–4, cochleas ipsilateral to the sham-operated side showed no statistical difference in

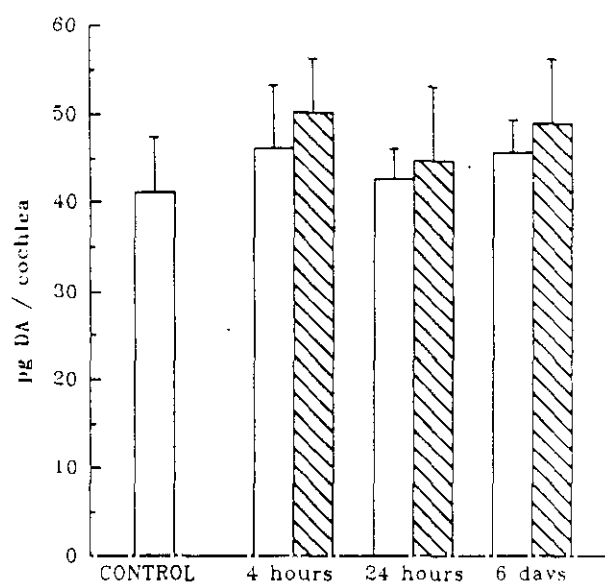


Fig. 2. Concentration of DA in cochleas after ipsilateral SCG removal (striped bars) or sham operation (white bars). The single bar on the left represents the cochlear DA concentration in external control (non-operated) animals. Data are presented as means  $\pm$  S.E.M.  $n = 6$  in each group. Comparisons between SCGx and sham-operated cochleas did not result significant at any time after surgery.

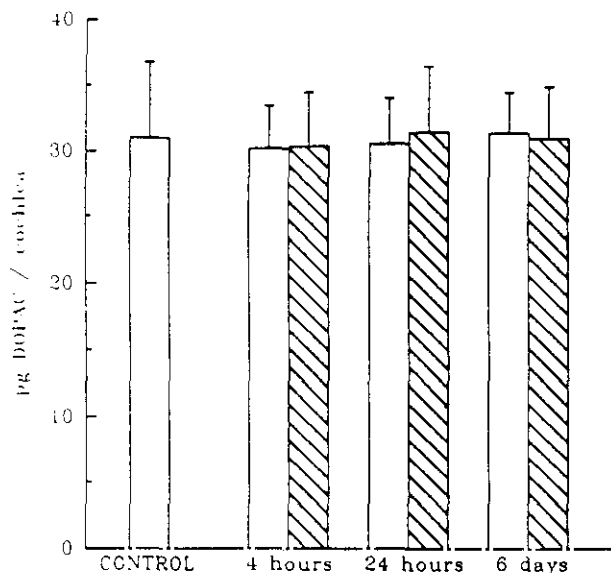


Fig. 3. Concentration of DOPAC in cochleas after ipsilateral SCG removal (striped bars) or sham operation (white bars). The single bar on the left represents the cochlear DOPAC concentration in external control (non-operated) animals. Data are presented as means  $\pm$  S.E.M.  $n = 6$  in each group. Comparisons between SCGx and sham-operated cochleas did not result significant at any time after surgery.

monoamine levels as compared to external (non-operated) controls. Four hours after SCGx, NE content did not differ between denervated and non-denervated cochleas (Fig. 1). Cochlear concentration of NE decreased very significantly in the ipsilateral side 24 h and 6 days after unilateral

SCGx. A residual amount of cochlear NE ( $\sim 18\%$ ) remained 6 days after unilateral SCG removal (Fig. 1).

In contrast, no modification was observed, at any time examined, in the concentration of DA in denervated cochleas (Fig. 2). Nor did the concentrations of the DA metabolites (DOPAC and HVA) show any modification due to SCG removal (Figs. 3 and 4, respectively).

#### 4. Discussion

The present study reports the effect of unilateral SCG removal on NE, DA, DOPAC and HVA concentrations in the rat cochlea. Only the NE concentration decreased in the ipsilateral cochlea, when assessed 24 h or 6 days after unilateral SCGx, whereas DA, DOPAC and HVA contents remained unchanged. As shown for several other organs within the SCG projection area, NE content remained unchanged 4 h after SCGx [2].

The decrease in NE concentration found (more than 80%) is in disagreement with previous studies reporting no significant changes in cochlear NE 48 h after SCG removal in rats [26]. Rather, our results agree with previous morphological findings reporting that the major sympathetic innervation of the cochlea originates in the SCG [5,32,33,35,36]. Six days after SCG removal, about 20% of the cochlear NE remained unchanged, suggesting the existence of additional sources for cochlear NE. It could be speculated that the origin of this NE may be the stellate ganglion, since this ganglion also has been proposed to innervate the cochlea, being its fibers related to blood vessels [33]. In addition, the stimulation of the stellate ganglion produced alterations of the cochlear blood flow [21,28].

In contrast to what was found for NE, cochlear concentrations of DA, DOPAC and HVA were not affected by SCG removal. These findings suggest that NE and DA are present within the cochlea in differential locations, i.e. NE is mainly in sympathetic fibers originated from the SCG while DA is mainly in dopaminergic fibers from the olivocochlear lateral efferent system, as suggested by immunocytochemical studies [20,37]. In fact, stellate ganglion fiber distribution within the cochlea seemed to be restricted to perivascular innervation [33], where noradrenergic fibers were found to be predominant [9,20,37].

Since NE and DA are present in different populations of fibers in the cochlea, they could subserve different functional roles. NE may be involved in the control of cochlear blood flow through perivascular sympathetic fibers [1,18,21,22,28–30]. Also, NE may modulate the activity of the cochlear nerve at the level of the habenula perforata, where the blood vessel-independent sympathetic fibers end [3,16,17,19,23,24]. In turn, DA can be present in lateral olivocochlear fibers, that modulate the activity of the

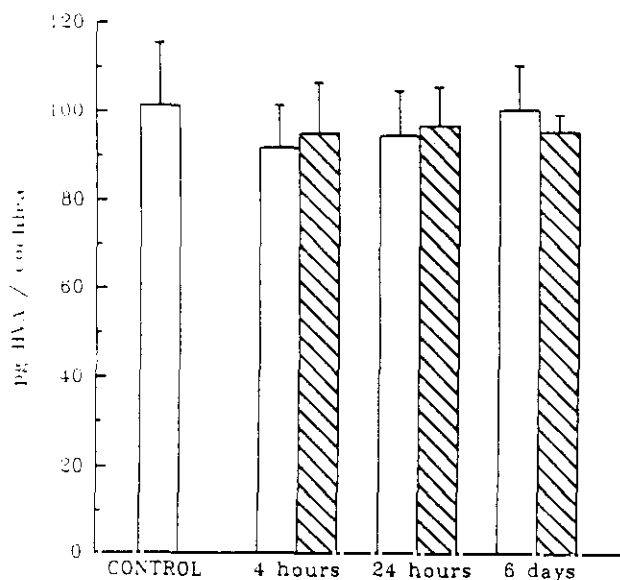


Fig. 4. Concentration of HVA in cochleas after SCG ipsilateral removal (striped bars) or sham operation (white bars). The single bar on the left represents the cochlear HVA concentration in external control (non-operated) animals. Data are presented as means  $\pm$  S.E.M.  $n = 6$  in each group. Comparisons between SCGx and sham-operated cochleas did not result significant at any time after surgery.

cochlear nerve, acting directly on the dendrites of the primary afferents [11,25].

DA appears to be released under acoustic stimulation [11,14,15,38] and may protect type I afferent dendrites against acoustic trauma or hypoxia [4,25]. Such a hypothetical role has also been indicated by in situ hybridization studies showing DA receptor mRNA modifications in auditory neurons after acoustic trauma [10]. Further morphological research will be useful to describe the location of these two catecholamine systems in independent populations of fibers within the cochlea.

### Acknowledgements

The authors are grateful to Mr David Doig for correction of the English version of the manuscript. This work has been supported by grants from Spanish DGICYT 92-0228 and FISs 95-1540 and Human Capital and Mobility ERBCHRXCT940659.

### References

- [1] M. Beausang-Linder, E. Hultcrantz, Early effects of cervical sympathetic stimulation on cerebral, ocular and cochlear blood flow, *Acta Physiol. Scand.* 109 (1980) 433–437.
- [2] D.P. Cardinali, H.E. Romeo, The autonomic nervous system of the cervical region as a channel of neuroendocrine communication, *Front. Neuroendocrinol.* 2 (1991) 278–297.
- [3] S.D. Comis, G. Leng, Action of putative neurotransmitters in the guinea pig cochlea, *Exp. Brain Res.* 36 (1979) 119–128.
- [4] C. D'Aldin, J.L. Puel, R. Leducq, O. Crambes, M. Eybalin, R. Pujol, Effects of a dopaminergic agonist in the guinea pig cochlea, *Hear. Res.* 90 (1995) 202–211.
- [5] O. Densert, Adrenergic innervation in the rabbit cochlea, *Acta Oto-Laryngol.* 78 (1974) 345–356.
- [6] O. Densert, The effect of 6-hydroxydopamine on the rabbit cochlea, *Acta Oto-Laryngol.* 79 (1975) 339–351.
- [7] O. Densert, A. Flock, An electron-microscopic study of adrenergic innervation in the cochlea, *Acta Oto-Laryngol.* 77 (1974) 185–197.
- [8] M. Eybalin, A. Calas, R. Pujol, Radioautographic study of the sympathetic fibers in the cochlea, *Acta Oto-Laryngol.* 96 (1983) 69–74.
- [9] M. Eybalin, G. Charachon, N. Renard, Dopaminergic lateral efferent innervation of the guinea-pig cochlea: immunoelectron microscopy of catecholamine-synthesizing enzymes and effect of 6-hydroxydopamine, *Neuroscience* 54 (1993) 133–142.
- [10] M. Eybalin, S. Safieddine, C.G. D'Aldin, R. Pujol, J.L. Puel, Molecular mechanisms involving neurotransmitters after excitotoxicity at the inner hair cell-auditory nerve synapse, in: A. Flock, D. Ottoson, M. Ulfendahl (Eds.), *Active Hearing*, Pergamon Press, Amsterdam, 1995, pp. 73–85.
- [11] P. Gil-Loyzaga, Neurotransmitters of the olivocochlear lateral efferent system: with an emphasis on dopamine, *Acta Oto-Laryngol.* (Stockholm) Suppl. 115 (1995) 222–226.
- [12] P. Gil-Loyzaga, N. Parés-Herbute, Presence of noradrenaline and dopamine in the adult and developing rat cochlea, *Neurosci. Lett.* Suppl. 26 (1986) 134.
- [13] P. Gil-Loyzaga, N. Parés-Herbute, HPLC detection of dopamine and noradrenaline in the cochlea of adult and developing rats, *Dev. Brain Res.* 48 (1989) 157–160.
- [14] P. Gil-Loyzaga, M.A. Vicente-Torres, P. Fernández-Mateos, A. Arce, A. Esquifino, Piribedil affects dopamine turnover in cochleas stimulated by white noise, *Hear. Res.* 79 (1994) 178–182.
- [15] P. Gil-Loyzaga, P. Fernández-Mateos, M.A. Vicente-Torres, M. Remezal, H. Cousillas, A. Arce, A. Esquifino, Effects of noise stimulation on cochlear dopamine metabolism, *Brain Res.* 623 (1993) 177–180.
- [16] M. Hildesheimer, R. Sharon, C. Muchnik, E. Sahartov, M. Rubinsteyn, The effect of bilateral sympathectomy on noise induced temporary threshold shift, *Hear. Res.* 51 (1991) 49–54.
- [17] K. Hozawa, R.S. Kimura, Cholinergic and noradrenergic nervous systems in the cynomolgus monkey cochlea, *Acta Oto-Laryngol.* (Stockholm) 110 (1990) 46–55.
- [18] E. Hultcrantz, The effect of noise on cochlear blood flow in the conscious rabbit, *Acta Physiol. Scand.* 106 (1979) 29–37.
- [19] E. Hultcrantz, A.L. Nuttall, M.C. Brown, M. Lawrence, The effect of cervical sympathectomy on cochlear electrophysiology, *Acta Oto-Laryngol.* 94 (1982) 439–444.
- [20] N. Jones, J. Fex, R.A. Altschuler, Tyrosine hydroxylase immunoreactivity identifies possible catecholaminergic fibers in the organ of Corti, *Hear. Res.* 30 (1987) 33–38.
- [21] E.A. Laurikainen, D. Kim, A. Didier, T. Ren, J.M. Miller, W.S. Quirk, A.L. Nuttall, Stellate ganglion drives sympathetic regulation of the cochlear blood flow, *Hear. Res.* 64 (1993) 199–204.
- [22] E.A. Laurikainen, O. Costa, J.M. Miller, A.L. Nuttall, T.Y. Ren, R. Masta, W.S. Quirk, P.J. Robinson, Neuronal regulation of cochlear blood flow in the guinea-pig, *J. Physiol.* 480 (1994) 563–573.
- [23] A.H. Lee, A.R. Moller, Effects of sympathetic stimulation on the round window compound action potential in the rat, *Hear. Res.* 19 (1985) 127–134.
- [24] J.O. Pickles, An investigation of sympathetic effects on hearing, *Acta Oto-Laryngol.* 87 (1979) 69–71.
- [25] R. Pujol, J.L. Puel, C. Gervais d'Aldin, M. Eybalin, Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea, *Acta Oto-Laryngol.* (Stockholm) 113 (1993) 330–334.
- [26] K.E. Rarey, M.D. Ross, C.B. Smith, Quantitative evidence for cochlear non-neuronal norepinephrine, *Hear. Res.* 5 (1981) 101–108.
- [27] K.E. Rarey, M.D. Ross, C.B. Smith, Distribution and significance of norepinephrine in the lateral wall of pigmented and albino rats, *Hear. Res.* 6 (1982) 15–23.
- [28] T. Ren, E. Laurikainen, W.S. Quirk, J.M. Miller, A.L. Nuttall, Effects of stellate ganglion stimulation on bilateral cochlear blood flow, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 102 (1993) 378–384.
- [29] T. Ren, E. Laurikainen, W.S. Quirk, J.M. Miller, A.L. Nuttall, Effects of electrical stimulation of the superior cervical ganglion on cochlear blood flow in guinea pig, *Acta Oto-Laryngol.* (Stockholm) 113 (1993) 146–151.
- [30] T. Ren, G.B. Avinash, A.L. Nuttall, J.M. Miller, E.A. Laurikainen, W.S. Quirk, Dynamic response of cochlear blood flow to occlusion of anterior inferior cerebellar artery in guinea pigs, *J. Appl. Physiol.* 76 (1994) 212–217.
- [31] M.D. Ross, Fluorescence and electron microscopic observations of the general visceral efferent innervation of the inner ear, *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* 286 (1971) 1–18.
- [32] Y. Shibamori, N. Tamamaki, H. Saito, Y. Nojyo, The trajectory of the sympathetic nerve fibers to the rat cochlea as revealed by anterograde and retrograde WGA-HRP tracing, *Brain Res.* 646 (1994) 223–229.
- [33] H. Spoendlin, Primary neurons and synapses, in: I. Friedmann, J. Ballantyne (Eds.), *Ultrastructural Atlas of the Inner Ear*, Butterworths, London, 1984, pp. 133–164.
- [34] H. Spoendlin, W. Lichtensteiger, The adrenergic innervation of the labyrinth, *Acta Oto-Laryngol.* 61 (1966) 423–434.
- [35] Y. Terayama, E. Holz, C. Beck, Adrenergic innervation of the cochlea, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 75 (1966) 69–86.
- [36] Y. Terayama, K. Yamamoto, T. Sakamoto, Electron microscopic

- observations on the postganglionic sympathetic fibers in the guinea pig cochlea. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 77 (1968) 1152–1170.
- [37] S.I. Usami, J. Hozawa, M. Tazawa, T. Yoshihara, M. Igarashi, G.C. Thompson. *Immunocytochemical study of catecholaminergic innervation in the guinea pig cochlea.* *Acta Oto-Laryngol.* (Stockholm) Suppl. 447 (1988) 36–45.
- [38] M.A. Vicente-Torres, P. Gil-Loyzaga, P. Fernández, A. Arce, A. Esquifino. Piribedil could modify dopamine turnover in cochleas under noise stimulation. *ORL* 55 (1993) 322–324.
- [39] Y.A. Vinnikov, V.A. Govyrin, G.R. Leonteva, V.F. Amelin. The adrenergic innervation of the organ of Corti. *Dokl. Akad. Nauk* 171 (1966) 835–838.

## **PUBLICACION 6**

*Detección de serotonina mediante HPLC en la cóclea de la rata.*

**Vicente-Torres, M.A.**, Bartolomé, M.V., Carricondo, F., Esquifino, A. y Gil-Loyzaga, P. HPLC detection of serotonin within the cochlea of the rat. *NeuroReport*, remitido.

**HPLC DETECTION OF SEROTONIN WITHIN THE RAT  
COCHLEA**

**M<sup>a</sup> Angeles Vicente-Torres<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Visitación Bartolomé<sup>1</sup>,  
Francisco Carricondo<sup>1</sup>, Ana Esquifino<sup>2</sup>, Pablo Gil-Loyzaga<sup>1</sup>**

1Centro de Cultivos Celulares (CAI-UCM) and Depart. de Cirugía II (ORL). 2Depart. de Bioquímica. Fac. Medicina, Univ. Complutense, Madrid (Spain).

***Address for correspondence:*** Pablo Gil-Loyzaga, Apartado de Correos 60075, 28080 Madrid, Spain.

Telephone number: 34-1-394 13 84 and 394 13 75

Telefax: 34-1-3941383

E-mail: loyzaga@eucmax.sim.ucm.es

**Abstract**

Serotonin (5-HT) and its main metabolite, the 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA), are now reported for the first time in homogenates of rat cochleas, by using HPLC coupled to electrochemical detection. The removal of the superior cervical ganglion (SCG) did not modify the concentrations of 5-HT and 5-HIAA in the ipsilateral cochleas, which could indicate that cochlear 5-HT is not located within the sympathetic fibers from the SCG. However, the concentration of 5-HT decreased significantly (about 76%) after removal of the blood by aortic perfusion, while the concentration of 5-HIAA was not modified. This result indicates that blood constitutes an important source of 5-HT for the cochlea. Noise exposure at 90 dB SPL did not modify neither the total cochlear concentrations of 5-HT and 5-HIAA, nor the pools remaining after removal of the blood, which suggests that 5-HT could have in the cochlea a modulatory role distinct of olivocochlear neurotransmitters.

**Key words:** serotonin, cochlea, superior cervical ganglion, noise stimulation, HPLC, rat

## Introduction

Several potential sources of serotonin (5-HT) must be taken into account in the analysis of cochlear 5-HT.

A small population of serotonergic fibers projecting to the cochlea has recently been identified by immunocytochemistry<sup>14</sup>. These fibers projected to the sensory epithelium and contacted with inner and outer hair cells. In addition, the subunit A of 5-HT<sub>3</sub> receptors was identified by in situ hybridization in the cochlear sensory epithelium of the early rat embryos<sup>19</sup>.

Other neural source of cochlear 5-HT could be the sympathetic fibers from the superior cervical ganglion (SCG) that project to the cochlea<sup>6,25-27,29,30</sup>, since 5-HT has been identified in fibers from this ganglion projecting on regions other than the cochlea<sup>2-5</sup>. However immunocytochemical studies<sup>14</sup> did not detect the presence of 5-HT in cochlear territories innervated by sympathetic fibers<sup>6-8,10,20,24,26-31,34</sup>.

Other likely source of cochlear 5-HT could be the blood, since 5-HT is present within the blood, mainly in platelets, in high concentration<sup>1,21,22</sup>. This source could not be demonstrated in immunocytochemical studies<sup>14</sup> because animals used were perfused.

Previous studies using high performance liquid chromatography coupled to electrochemical detection (HPLC-ED) did not detect 5-HT within the cochlea of distinct mammals<sup>23</sup>. The aim of the present



study was to analyze the cochlear concentrations of 5-HT and its main metabolite, the the 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA), by using a HPLC-ED method previously tested within the vestibule<sup>15</sup>. In addition to the global concentration, the contribution from the SCG and from the blood were analyzed. Also, the effect of acoustic stimulation was tested since this stimulus produced the release of several cochlear neurotransmitters: dopamine<sup>12,17,18,33</sup>, GABA<sup>9</sup> and Met-enkephalin<sup>9,11</sup>.

These results have been previously presented as a preliminary communication<sup>32</sup>.

## **Materials and methods**

*Animals:* Forty eight Long-Evans adult male rats (200-300 g b.w.) were used in this work. The total cochlear concentrations of 5-HT and 5-HIAA were quantified in 12 animals: 6 kept in silence and 6 exposed to 90 dB SPL for one hour. The contribution of the SCG to the cochlear concentrations of 5-HT and 5-HIAA was analyzed in 24 animals by unilateral superior cervical ganglionectomy (SCGx). And the blood contribution was determined in 12 animals (6 kept in silence and 6 exposed to 90 dB SPL) by removal of the blood by aortic perfusion.

*Acoustic stimulation:* Animals kept for one hour, under urethane anesthesia, in an anechoic chamber, which filters exterior noise to 20 dB SPL. The animals were exposed to silence or white noise at 90 dB SPL. After silence or noise stimulation, both cochleas were removed and individually processed.

*SCGx:* The left SCG was unilaterally and totally removed under tribromoethanol anesthesia. Surgery was carried out through a ventral incision in the neck to the bifurcation of the common carotid artery, where the SCG was located, as it was described elsewhere<sup>16</sup>. Sham operations, including all the manipulations except for SCG removal, were performed in the contralateral side.

Twenty four hours or six days after surgery, animals were kept in silence (under urethane anesthesia) for one hour. Then both cochleas were removed and individually processed.

*Aortic perfusion:* Twelve animals were perfused by aortic pathway after silence or 90 dB SPL exposure, for one hour, to eliminate the blood of the cochlea. The perfusion solution was a 0.1M citrate buffer (pH = 4.8) containing 20 g / l of glucose. It was administered at 26°C for 2 min with a flow rate of 4.5 ml/min. and the descending aorta clamped. After perfusion, both cochleas were removed and individually processed.

*Biochemical analysis:* Cochleas were independently crushed in 200µl of chilled 0.2 M perchloric acid, sonicated and centrifuged (14.000 r.p.m., 10 min., 4°C). The supernatants were filtered, frozen at -80°C and analyzed before three days.

Cochlear supernatants were injected into a HPLC-ED system prepared for measuring 5-HT and 5-HIAA. The mobile phase was a 0.1 M acetate - 0.1 M citrate buffer (pH=4) containing 228 mg/l of EDTA, 200 mg/l of sodium octyl sulphate and 10% of methanol. The stationary phase was a Nucleosil C18 column. The flow rate was set at 1 ml / min. Detection was achieved with a coulometric detector (Coulchem II, ESA). Fixed potentials vs H<sub>2</sub> / H<sup>+</sup> reference electrodes were: -0.45 V (conditioning electrode), +0.10 V (preoxidation electrode) and +0.40 V (working electrode). The

concentrations of 5-HT and 5-HIAA were calculated from the chromatographic peak areas using external standards (Sigma).

*Statistics:* Concentrations of 5-HT and 5-HIAA were evaluated using a 2 x 2 (perfusion x noise) independent groups analysis of variance (ANOVA). Significant interactions were followed by one way ANOVA. In addition, concentrations of 5-HT and 5-HIAA in sympathectomized cochleas were compared with respect to the sham-operated cochleas by the Student's t test.

## Results

Both 5-HT and 5-HIAA were detected in all of the samples analyzed.

When 5-HT was analyzed, the two-way ANOVA (perfusion x noise) obtained highly significant main effects for perfusion variable ( $p < 0.001$ ) and no significant interactions between the two variables. The one-way ANOVA for perfusion variable resulted in a probability  $p < 0.001$ , both in silence and in 90 dB SPL groups. Aortic perfusion resulted in a significant decrease of about 76% in the cochlear concentration of 5-HT, both in silence and after 90dB SPL exposure (Fig.1).

However, in the two-way ANOVA analysis of cochlear 5-HIAA, no variability was observed due to sound, perfusion or the interaction of both variables (Fig. 1). Therefore no one-way ANOVA was carried out.

Both 24 hours and 6 days after SCGx, no significant difference was observed in the concentrations of 5-HT and 5-HIAA in sympathectomized ipsilateral cochleas with respect to non-denervated contralateral cochleas (Fig. 2).

## Discussion

The present report quantifies, for the first time, the concentrations of 5-HT and its main metabolite 5-HIAA within the cochlea of the rat by using HPLC-ED. In contrast, previous HPLC studies reported the absence of 5-HT within the cochlea of the rat<sup>23</sup>. This controversy could be explained on the basis of the distinct methodologies used, since also Rarey et al.<sup>23</sup> reported the absence of dopamine within the cochlea, which was later found<sup>12,13,17,18,33</sup>.

The cochlear concentrations of 5-HT and 5-HIAA were not modified by the SCGx. This fact indicates that the SCG does not contribute significantly to the total concentration of 5-HT within the cochlea. Also, cochlear dopamine and its metabolites remained unchanged after SCGx, while norepinephrine was reduced about 80%<sup>16</sup>. In the same way than it was concluded for dopamine, from present results it could be suggested that 5-HT is not located in the cochlear sympathetic fibers from the SCG. This result disagrees with studies supporting the coexistence of 5-HT and norepinephrine within fibers from the SCG which project to territories other than the cochlea<sup>2-5</sup>. However, it agrees with immunocytochemical studies that showed no serotonergic fibers in cochlear sympathetic territories<sup>14</sup>.

In contrast, blood represented an important source of 5-HT for the cochlea, since its concentration was reduced about 76% after removing the blood by aortic perfusion. Meanwhile, the

concentration of 5-HIAA was not modified, indicating that it came mainly from the cochlear tissue. The 24% of 5-HT remaining after blood removal and the 5-HIAA could be related to the metabolism of the cochlear serotonergic fibers, that were recently identified by immunocytochemistry<sup>14</sup>.

The role of the cochlear serotonergic fibers has not been yet described. The present report shows that the total concentrations of 5-HT and 5-HIAA and the neural pools remaining after aortic perfusion were not modified by 90 dB SPL noise exposure. These facts indicate that 5-HT does not carry the same release pattern than olivocochlear neurotransmitters such as dopamine, GABA or Met-enkephalin, which were released with stimuli from 70 to 115 dB SPL<sup>9,11,12,17,18,33</sup>. This distinct behaviour could be correlated with the distribution of the cochlear serotonergic fibers, which did not exactly correspond to any of the previously described cochlear innervation systems<sup>14</sup>.

## **Conclusion**

Present report quantifies for the first time the concentrations of 5-HT and 5-HIAA within the whole cochlea. In addition, it has been shown that the SCG does not contribute to those concentrations. However an important amount of the cochlear 5-HT (about 76%) came from the blood. Neither the total cochlear concentrations of 5-HT and 5-HIAA, nor the pools remaining after removal of the blood were modified by noise exposure. These results indicate that the likely modulatory role of serotonergic fibers within the cochlea is distinct from that one of olivocochlear fibers, whose neurotransmitters were released by acoustic stimulation. These results fit well with the distribution of cochlear serotonergic fibers, which constitute a cochlear innervation system recently identified<sup>14</sup> that does not correspond exactly to the olivocochlear efferent system.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** The authors are grateful to Mr. David Doig for correction of the English version of the manuscript. This work has been supported by grants from Spanish FISs 95/1540, and Human Capital and Mobility ERBCHRXCT940659.



## References

1. Anderson GM, Feibel FC and Cohen DJ. *Life Sci* 40, 1063-1070 (1987).
2. Bonvento G, Lacombe P, MacKenzie ET et al. *J Neurochem* 56, 681-689 (1991).
3. Chang JY, Owman C and Steinbusch HWM. *Brain Res* 438, 237-246 (1988).
4. Chang JY, Ekblad E, Kannisto P et al. *Brain Res* 492, 79-88 (1989).
5. Cohen Z, Bonvento G, Lacombe P et al. *Brain Res* 598, 203-214 (1992).
6. Densert O. *Acta Otolaryngol* 78, 345-356 (1974).
7. Densert O. *Acta Otolaryngol* 79, 339-351 (1975).
8. Densert O and Flock A. *Acta Otolaryngol* 77, 185-197 (1974).
9. Drescher MJ, Drescher DG and Medina JE. *J Neurochem* 41, 309-320 (1983).
10. Eybalin M, Calas A and Pujol R. *Acta Otolaryngol* 96, 69-74 (1983).
11. Eybalin M, Rebillard G, Jarry TH et al. *Brain Res* 418, 189-192 (1987).
12. Gil-Loyzaga P. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 115, 222-226 (1995).
13. Gil-Loyzaga P and Parés-Herbuté N. *Devl Brain Res* 48, 157-160 (1989).

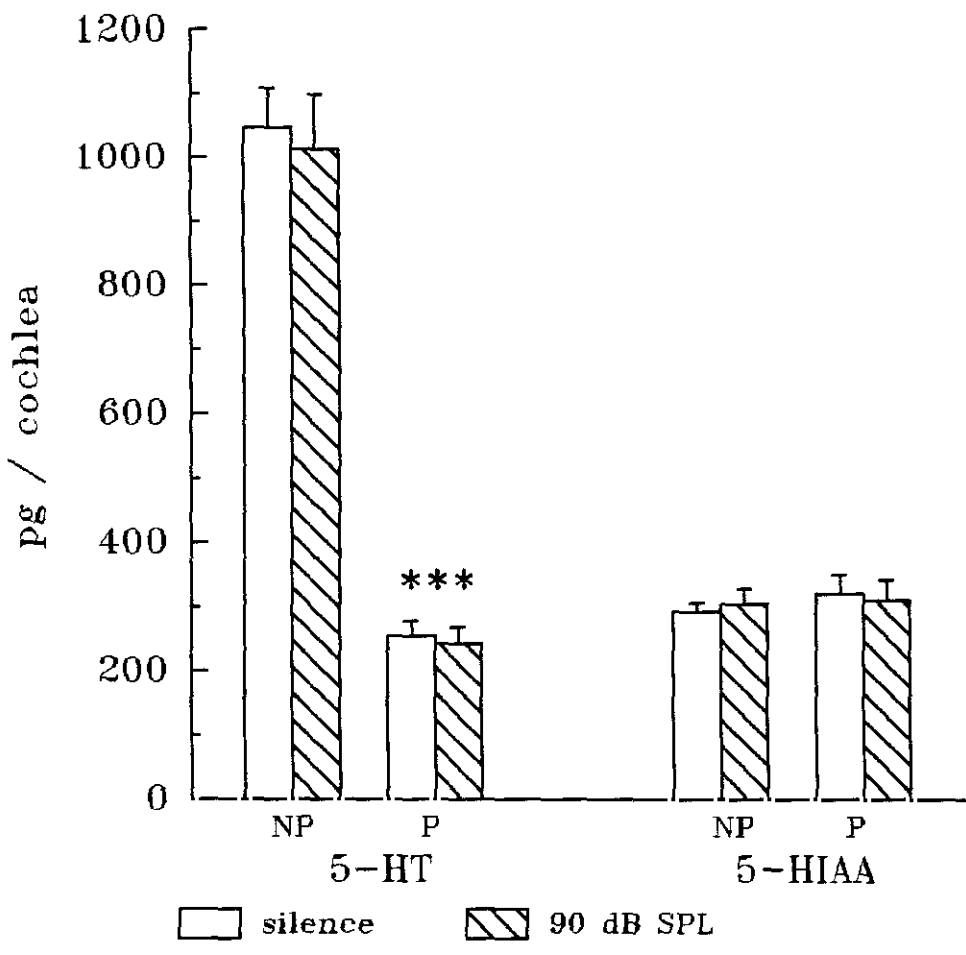
14. Gil-Loyzaga P, Bartolomé MV and Vicente-Torres MA. *NeuroReport* 8, 3519-3522 (1997).
15. Gil-Loyzaga P, Vicente-Torres MA, García-Bonacho M et al. *Brain Res* 746, 265-268 (1997).
16. Gil-Loyzaga P, Vicente-Torres MA, Arce A et al. *Brain Res* 779, 53-57 (1998).
17. Gil-Loyzaga P, Vicente-Torres MA, Fernández-Mateos P et al. *Hear Res* 79, 178-182 (1994).
18. Gil-Loyzaga P, Fernández-Mateos P, Vicente-Torres MA et al. *Brain Res* 623, 177-180 (1993).
19. Johnson DS and Heinemann SF. *Mol Cell Neurosci* 6, 122-138 (1995).
20. Jones N, Fex J and Altschuler RA. *Hear Res* 30, 33-38 (1987).
21. Kumar AM, Kumar M, Deepika K et al. *Life Sci* 47, 1751-1759 (1990).
22. Pussard E, Guigueno N, Adam O et al. *Clin Chem* 42, 1086-1091 (1996).
23. Rarey KE, Ross MD and Smith CB. *Hear Res* 5, 101-108 (1981).
24. Ross MD. *Acta Oto-laryngol Suppl* 286, 1-18 (1971).
25. Shibamori Y, Tamamaki N, Saito H et al. *Brain Res* 646, 223-229 (1994).
26. Spöndlin H. *Adv Oto-Rhino-Laryng* 27, 1-13 (1981).
27. Spöndlin H. In: Friedmann I and Ballantyne J, Eds., *Ultrastructural atlas of the inner ear*. London: Butterworths, 1984: 133-164.

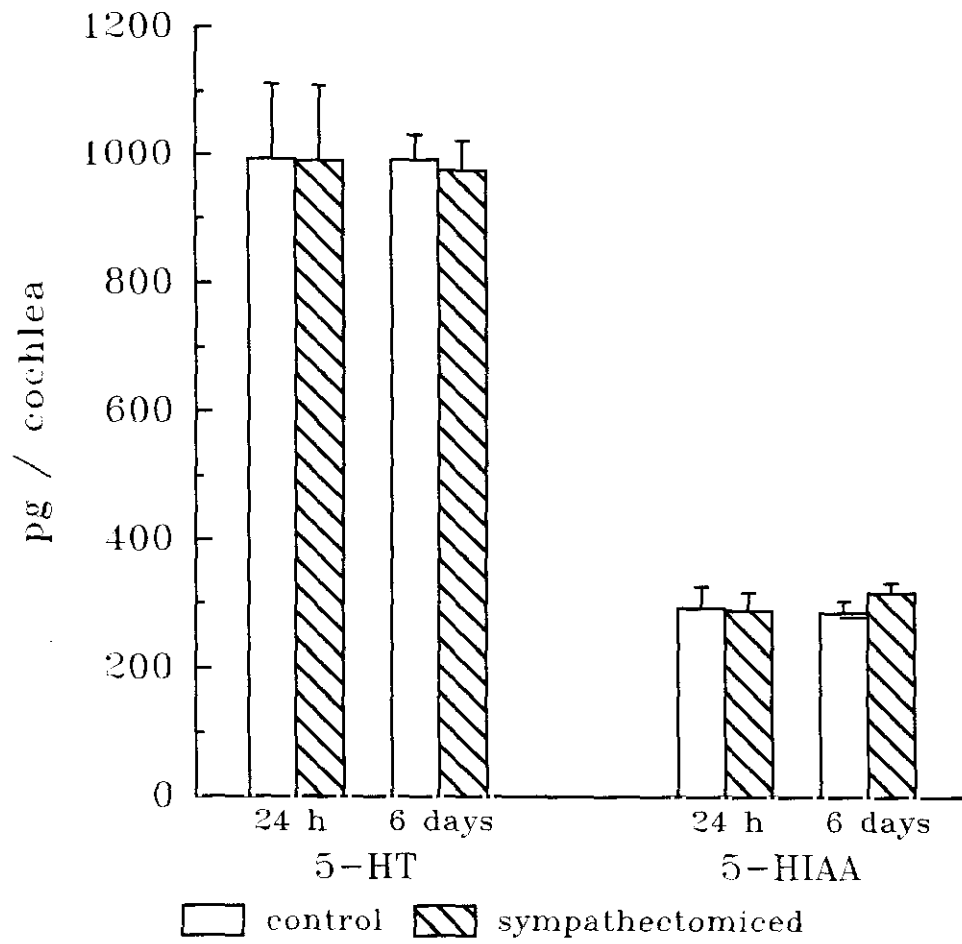
28. Spöndlin H and Lichtensteiger W. *Acta Oto-laryngol* 61, 423-434 (1966).
29. Terayama Y, Holz E and Beck C. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 75, 69-86 (1966).
30. Terayama Y, Yamamoto K and Sakamoto T. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 77, 1152-1170 (1968).
31. Usami SI, Hozawa J, Tazawa M et al. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 447, 36-45 (1988).
32. Vicente-Torres MA, Gil-Loyzaga P, Bartolomé MV et al. 33rd Workshop on Inner Ear Biology, Utrecht, The Netherlands, 1996, pg. 119.
33. Vicente-Torres MA, Gil-Loyzaga P, Fernández P et al. *ORL* 55, 322-324 (1993).
34. Vinnikov YA, Govyrin VA, Leonteva GR et al. *Dokl Akad Nauk* 171, 835-838 (1966).

### Figure legends

FIG. 1. Concentrations of 5-HT and 5-HIAA in whole cochleas (NP) or in cochleas after aortic perfusion (P) to remove the blood. White bars represent animals exposed to silence and striped bars animals exposed to 90 dB SPL of white noise for one hour. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 12 in each group). Comparisons between perfused and non-perfused cochleas are shown as \*\*\*=p<0.001. Comparisons between silent and noise situations did not result significant.

FIG. 2. Concentrations of 5-HT and 5-HIAA in cochleas of rats 24 h or 6 days after ipsilateral SCGx (striped bars) or sham operation (white bars). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 12 in each group). Comparisons between sympathectomized and sham-operated cochleas did not result significant at any time after surgery.





## **PUBLICACION 7**

*Presencia de catecolaminas y serotonina en el vestíbulo de la rata.*

Gil-Loyzaga, P., **Vicente-Torres, M.A.**, García-Bonacho, M. y Esquifino, A.  
Presence of catecholamines and serotonin in the rat vestibule. *Brain Res.* 746  
(1997) 265-268.

## Presence of catecholamines and serotonin in the rat vestibule

Pablo Gil-Loyzaga <sup>a,b,\*</sup>, M. Angeles Vicente-Torres <sup>b</sup>, Manuel García-Bonacho <sup>c</sup>, Ana Esquifino <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Centro de Cultivos Celulares (CAI), Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Cirugía II (ORL), Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Received 9 July 1996; accepted 8 October 1996

### Abstract

The concentrations of norepinephrine (NE), dopamine (DA) and its metabolites DOPAC and HVA, and serotonin (5-HT) and its metabolite 5-HIAA, were quantified in the rat vestibule. For this purpose, homogenates of vestibules, of albino and pigmented rats, were analyzed using HPLC with electrochemical detection. Vestibules of pigmented rats showed higher DOPAC and HVA concentrations than those of albino rats, and male pigmented rats also showed significantly more DA than male albino rats. These results could indicate that the rate of DA metabolism in vestibules was higher in pigmented than in albino rats. The vestibular concentrations of NE and 5-HT did not differ significantly between the two strains. In contrast, 5-HIAA concentration was higher in vestibules of pigmented rats than in those of albino rats, suggesting an increased 5-HT metabolism for the former strain. Differences in monoamine concentrations between the two sexes of the same strain were scarce. Only, a higher HVA concentration in vestibules of females could indicate a higher DA metabolism.

**Keywords:** Norepinephrine; Dopamine; Serotonin; Vestibule; HPLC; Rat

### 1. Introduction

Sympathetic fibers reaching the vestibule were identified early, using the histofluorescence method of Flack and Hillarp [7,28,29]. These sympathetic nerve fibers presented a dual vestibular distribution: around the blood vessels or independent of them underneath the sensory epithelia in the maculae and the cristae. Histofluorescence related to the presence of monoamines, in particular norepinephrine (NE), seemed to correspond mainly to unmyelinated fibers observed with electron microscopy [7,28]. Moreover, ultrastructural studies carried out after 5-hydroxydopamine administration indicated that nerve terminals containing dense core vesicles might correspond to those histofluorescent fibers [7].

Immunocytochemical studies against tyrosine hydroxylase (TH) showed positive immunoreaction at vestibular subepithelial regions [32]. More exhaustive analysis, either with light or electron microscopy, detected TH-like and

dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH)-like immunoreactive fibers related to the blood vessels or underneath the sensory epithelia [18,19,21]. More recently, TH-like and DBH-like immunoreactivities have also been identified in the endolymphatic sac [20,21].

Sympathetic fibers reaching the vestibule seem to originate in the ipsilateral superior cervical ganglion, as indicated by cervical sympathectomy [7,18,29]. Retrograde neurotracing with an anti-DBH antibody also supports this fact [18].

Up to now, there has been no direct evidence regarding the presence of dopamine (DA) or serotonin (5-HT) in the adult vestibule. In the cochlea, the presence of DA was revealed using high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) [12]. Moreover, a modification of this technique also allowed quantification of the cochlear concentrations of the main DA metabolites: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) [13,15,31]. The effect of noise on the activity of the cochlear dopaminergic fibers has been demonstrated [13]. Also, the changes occurring in the cochlear DA metabolism as a result of the administration of a D2 agonist were analyzed [15,31].

\* Corresponding author. Apartado de Correos 60075, 28080 Madrid, Spain. Fax: +34 (1) 3941383.



The aim of the present study was to quantify the vestibular concentrations of catecholamines (NE and DA), 5-HT and their metabolites (DOPAC, HVA and 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA)), in albino and pigmented rats, either males or females. These results have been previously presented as preliminary communications [14,16].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Young adult rats, 10 Long-Evans (5 males and 5 females) and 10 Wistar (5 males and 5 females), were used for this study.

Animals were anesthetized (urethane) and maintained in an anechoic chamber for 1 h before samples were obtained. This process was included to avoid any noise interference on vestibule physiology, which has been proposed previously [2].

### 2.2. Sample obtention

As has been previously described elsewhere for the cochlea [13,15,31], both vestibules were removed in less than 2 min by careful dissection avoiding cochlear contamination. Each whole vestibule was independently crushed in 400  $\mu$ l of chilled 0.2 M perchloric acid, then they were sonicated and centrifuged (12000 rpm, 15 min, +4°C). Supernatants were rapidly frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  and stored for no more than three days.

### 2.3. Monoamine analysis

Monoamine determination in the vestibular supernatants was carried out using an HPLC-ED technique described elsewhere [13,15,31], with minor modifications for quantifying NE, DA, DOPAC, HVA, 5-HT and 5-HIAA concentrations. Briefly, the separation of these monoamines or metabolites was achieved by a reverse phase column (Nucleosil 5 C18 100A, 150  $\times$  4.6 mm). The mobile phase was 0.1 M acetate–0.1 M citrate buffer (pH 4) with 228 mg/l of EDTA, 200 mg/l of sodium octyl sulphate and 10% of methanol. The flow rate was set at 1 ml/min. A coulometric detector (Coulchem II, ESA) was used for monoamine detection. Fixed potentials vs.  $\text{H}_2/\text{H}^+$  reference electrodes were: conditioning electrode =  $-0.45$  V, preoxidation electrode =  $+0.10$  V and working electrode =  $+0.40$  V. Monoamine concentrations were quantified from the chromatographic peak areas using external standards (Sigma).

Statistical analysis was carried out by comparison of mean  $\pm$  standard deviation using the Student's *t*-test.

## 3. Results

When pigmented versus albino rats were compared, the vestibular concentrations of DA, DOPAC and HVA were significantly higher in pigmented male rats than in albino male rats (Fig. 1a). Female rats also showed higher DOPAC and HVA concentrations in the pigmented strain than in the albino strain, DA concentration being similar in the two strains (Fig. 1b).

The vestibular concentrations of NE and 5-HT were similar for pigmented and albino male or female rats. However, 5-HIAA was significantly higher in pigmented than in albino rats of the same sex (Fig. 2a,b).

In neither strain was there a significant difference between males and females except for the levels of HVA

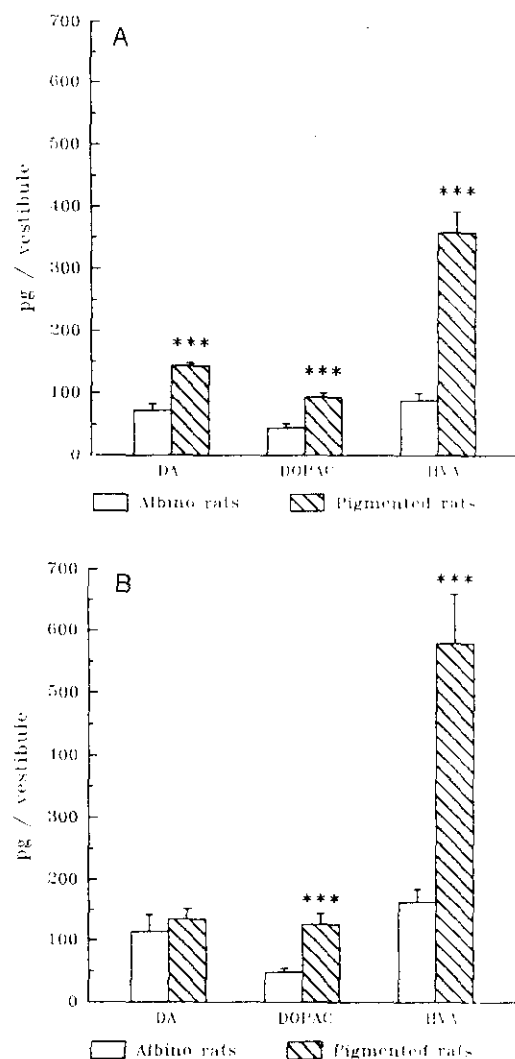


Fig. 1. Vestibular DA, DOPAC and HVA concentrations in male rats (a) or female rats (b). Empty bars = albino rats, striped bars = pigmented rats. Comparisons between albino and pigmented animals are given as \*\*\* =  $P < 0.001$ . No significant difference was observed in the DA vestibular concentration between albino and pigmented females. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 10$  for each group).

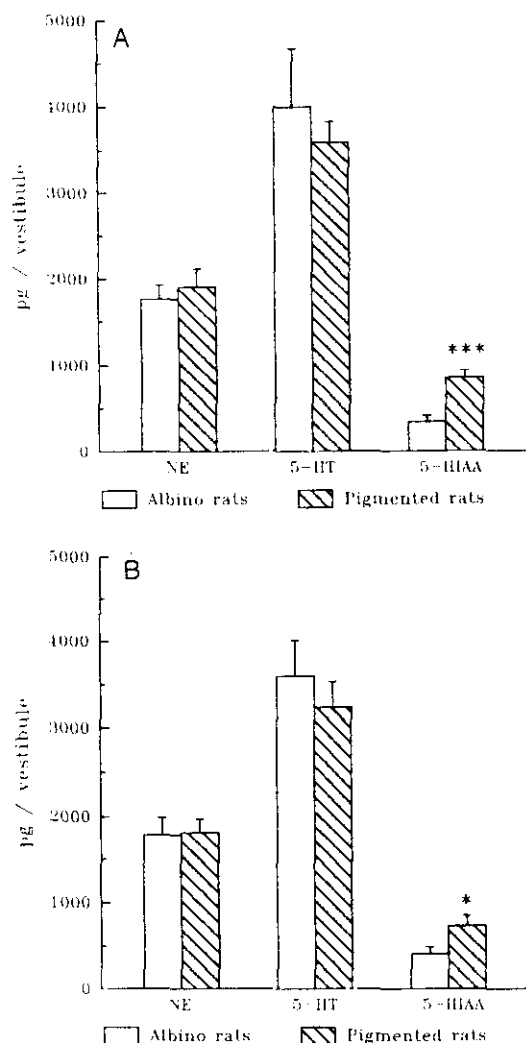


Fig. 2. Vestibular NE, 5-HT and 5-HIAA concentrations in male rats (a) or female rats (b). Empty bars = albino rats, striped bars = pigmented rats. Comparisons between albino and pigmented animals are given as \* =  $P < 0.05$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ . No significant differences were observed in NE and 5-HT vestibular concentrations between albino and pigmented animals. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 10$  for each group).

which were significantly higher in the females in both albino ( $P < 0.01$ ) and pigmented ( $P < 0.05$ ) rats.

#### 4. Discussion

In the present study, the concentrations of NE, DA (and its metabolites DOPAC and HVA) and 5-HT (and its metabolite 5-HIAA) were quantified in the vestibule of both albino and pigmented rats. The presence of NE supports previous morphological studies showing noradrenergic fibers in the vestibule of mammals [7,18–21,28,29,32].

The influence of pigmentation on the NE concentration has been previously analyzed in other sensory structures.

In the cochlea, NE concentration was observed to be higher in pigmented than in albino rats [25], although some regions of this organ showed no difference in NE concentrations with respect to strain [26]. Also, in the eye, the concentration of NE was higher in pigmented than in albino rats [23]. Nevertheless, in the present study NE content was similar in vestibules of the two studied strains, both in males and females.

In contrast, the present study positively suggests that vestibular metabolisms of both DA and 5-HT could be strongly related to levels of pigmentation. Pigmented rats showed higher DA and 5-HT vestibular metabolisms than albino rats. This assumption is supported by two facts: (1) higher or similar concentrations of these monoamines in vestibules of pigmented versus albino rats, and (2) higher concentrations of their metabolites, also in pigmented rats.

Comparing males and females of the same strain, it could be suggested that females have a higher DA vestibular metabolism than males, since HVA concentrations were higher in vestibules of females than in those of males. This fact could be related to the link between DA and gonadal steroids, since estrogen treatment affected the density of DA receptors [9] and the extracellular levels of DA or its metabolites [3,10] in the central nervous system. Moreover, estrogen treatment affected the DA related behaviour [24]. Also in the cochlea, females presented similar DA and DOPAC concentrations and higher HVA concentrations than males [11,13].

DA, 5-HT and their respective metabolites are now, for the first time, reported in the vestibule of the adult rat. Therefore, nothing is known about their location in this sensory organ, since this study was carried out using homogenates of whole vestibules. Previous immunocytochemical results [18–21,32] detected TH- and DBH-immunoreactive fibers forming a perivascular and non-perivascular innervation. However, TH containing fibers negative for DBH have never been detected by immunocytochemistry, but this does not exclude the possibility of their existence. The presence of dopaminergic efferent fibers within the cochlea [8,11,22,30] could allow to hypothesize the existence of a similar innervation within the vestibule. Evidently this suggestion needs further immunocytochemical support and also specific neurotracing confirmation. In any case, DA could also be present within sympathetic NE containing fibers reaching to the vestibule, since DA is a precursor of NE. With respect to the vestibular location of 5-HT, it could also be related to the sympathetic innervation of the vestibule, since it has been suggested that 5-HT may be present in fibers originated in the superior cervical ganglion [1,4–6,17]. In addition, serotonergic fibers could also originate in the brainstem, possibly in the efferent vestibular nuclei, but at present, this belongs to the field of speculation. Nevertheless, it is impossible to rule out the possibility of the location of 5-HT in other non-neuronal vestibular structures, e.g. vessel endothelium [27].

Further research will be done to clearly localize all

these monoamines within the vestibular receptor, as a complementary indication of their physiological role. Also, more accurate pharmacological and receptor studies could help to propose functional roles for all these substances in the vestibular physiology.

### Acknowledgements

The authors are grateful to Ms. Laura Y. Blazquez for correction of the English version of the manuscript. This work has been supported by grants from Spanish DGICYT (PB91-0361), FISs (95-1540) and Human Capital and Mobility (ERBCHRXCT940659).

### References

- [1] Bonvento, G., Lacombe, P., MacKenzie, E.T., Fage, D., Benavides, J., Rouquier, L. and Scatton, B., Evidence for differing origins of the serotonergic innervation of major cerebral arteries and small pial vessels in the rat. *J. Neurochem.*, 56 (1991) 681–689.
- [2] Cazals, Y., Aran, J.M., Erre, J.P., Guilhaume, A. and Arousseau, C., Vestibular acoustic reception in the guinea pig: a saccular function?, *Acta Otolaryngol.*, 95 (1983) 211–217.
- [3] Castner, S.A., Xiao, L. and Becker, J.B., Sex differences in striatal dopamine: in vivo microdialysis and behavioral studies, *Brain Res.*, 610 (1993) 127–134.
- [4] Chang, J.Y., Ekblad, E., Kannisto, P. and Owman, C., Serotonin uptake into cerebrovascular nerve fibers of rat: visualization by immunohistochemistry, disappearance following sympathectomy, and release during electrical stimulation, *Brain Res.*, 492 (1989) 79–88.
- [5] Chang, J.Y., Owman, C. and Steinbusch, H.W.M., Evidence for the coexistence of serotonin and noradrenaline in sympathetic nerves supplying brain vessels of guinea pig, *Brain Res.*, 438 (1988) 237–246.
- [6] Cohen, Z., Bonvento, G., Lacombe, P., Seylaz, J., MacKenzie, E.T. and Hamel, E., Cerebrovascular nerve fibers immunoreactive for triptophan-5-hydroxylase in the rat: distribution, putative origin and comparison with sympathetic noradrenergic nerves, *Brain Res.*, 598 (1992) 203–214.
- [7] Densert, O., A fluorescence and electron microscopic study of the adrenergic innervation in the vestibular ganglion and sensory areas, *Acta Otolaryngol.*, 79 (1975) 96–107.
- [8] Eybalin, M., Charachon, G. and Renard, N., Dopaminergic lateral efferent innervation of the guinea-pig cochlea: immunoelectron microscopy of catecholamine-synthesizing enzymes and effect of 6-hydroxydopamine, *Neuroscience*, 54 (1993) 133–142.
- [9] Falardeau, P. and Di Paolo, T., Regional effect of estradiol on rat caudate-putamen dopamine receptors: lateral-medial differences, *Neurosci. Lett.*, 74 (1987) 43–48.
- [10] Gayrard, V., Malpoux, B. and Thiéry, J.C., Oestradiol increases the extracellular levels of amine metabolites in the ewe hypothalamus during anoestrus: a microdialysis study, *J. Endocrinol.*, 135 (1992) 421–430.
- [11] Gil-Loyzaga, P., Neurotransmitters of the olivocochlear lateral efferent system: with an emphasis on dopamine, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 115 (1995) 222–226.
- [12] Gil-Loyzaga, P. and Parés-Herbuté, N., HPLC detection of dopamine and noradrenalin in the cochlea of adult and developing rats, *Dev. Brain Res.*, 48 (1989) 157–160.
- [13] Gil-Loyzaga, P., Fernández-Mateos, P., Vicente-Torres, M.A., Re-meza, M., Cousillas, H., Arce, A. and Esquifino, A., Effects of noise stimulation on cochlear dopamine metabolism, *Brain Res.*, 623 (1993) 177–180.
- [14] Gil-Loyzaga, P., García-Bonacho, M., Vicente-Torres, M.A. and Esquifino, A.I., Catecholamines and serotonin metabolism in the rat vestibule. Effects of bromocriptine treatment, *32nd Workshop on Inner Ear Biology*, Madrid, Spain, 1995, O25.
- [15] Gil-Loyzaga, P., Vicente-Torres, M.A., Fernández-Mateos, P., Arce, A. and Esquifino, A., Piribedil affects dopamine turnover in cochleas stimulated by white noise, *Hear. Res.*, 79 (1994) 178–182.
- [16] Gil-Loyzaga, P., Vicente-Torres, M.A., García-Bonacho, M., Tapia, E. and Esquifino, A., Identification of monoamines (catecholamines and indolamines) in the vestibular receptor of the adult rat using HPLC, *1st Symposium on Inner Ear Neuropharmacology*, Montpellier, France (1994) P8.
- [17] Häppölä, O., 5-hydroxytryptamine-immunoreactive neurons and nerve fibers in the superior cervical ganglion of the rat, *Neuroscience*, 27 (1988) 301–307.
- [18] Hozawa, K. and Kimura, R.S., Vestibular sympathetic nervous system in guinea pig, *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 107 (1989) 171–181.
- [19] Hozawa, K. and Takasaka, T., Catecholaminergic innervation in the vestibular labyrinth and vestibular nucleus of guinea pigs, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 503 (1993) 111–113.
- [20] Hozawa, K. and Takasaka, T., Sympathetic and CGRP-positive nerve supply to the endolymphatic sac of guinea pig, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 506 (1993) 14–17.
- [21] Hozawa, K., Takasaka, T. and Kimura, R.S., Vestibular sympathetic nervous system in guinea pig, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 481 (1991) 95–96.
- [22] Jones, N., Fex, J. and Altschuler, R.A., Tyrosine hydroxylase immunoreactivity identifies possible catecholaminergic fibers in the organ of Corti, *Hear. Res.*, 30 (1987) 33–38.
- [23] Oroscio, M., Jacquot, C., Rapin, J.R. and Weppierre, J., Uptake, turnover and release of norepinephrine in pigmented and albino rat eye, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 229 (1977) 15–22.
- [24] Palermo-Neto, J. and Dorce, V.A.C., Influences of estrogen and/or progesterone on some dopamine related behavior in rats, *Gen. Pharmac.*, 21 (1990) 83–87.
- [25] Rarey, K.E., Ross, M.D. and Smith, C.B., Quantitative evidence for cochlear non-neuronal norepinephrine, *Hear. Res.*, 5 (1981) 101–108.
- [26] Rarey, K.E., Ross, M.D. and Smith, C.B., Distribution and significance of norepinephrine in the lateral wall of pigmented and albino rats, *Hear. Res.*, 6 (1982) 15–23.
- [27] Robinson-White, A., Peterson, S., Hechtman, H.B. and Shepro, D., Serotonin uptake by isolated adipose capillary endothelium, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 216 (1981) 125–128.
- [28] Spoendlin, H. and Lichtensteiger, W., The adrenergic innervation of the labyrinth, *Acta Otolaryngol.*, 61 (1966) 423–434.
- [29] Terayama, Y., Shige, E. and Sakamoto, T., Distribution and origin of adrenergic nerve fibers in the vestibular apparatus and their arterial supply in the guinea pig, *Acta Otolaryngol.*, 76 (1973) 244–253.
- [30] Usami, S.I., Hozawa, J., Tazawa, M., Yoshihara, T., Igarashi, M. and Thompson, G.C., Immunocytochemical study of catecholaminergic innervation in the guinea pig cochlea, *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.*, 447 (1988) 36–45.
- [31] Vicente-Torres, M.A., Gil-Loyzaga, P., Fernández, P., Arce, A. and Esquifino, A., Piribedil could modify dopamine turnover in cochleas under noise stimulation, *Otorhinolaryngology*, 55 (1993) 322–324.
- [32] Ylikoski, J., Pirlova, U., Häppölä, O., Panula, P. and Virtanen, L., Immunohistochemical demonstration of neuroactive substances in the inner ear of rat and guinea pig, *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 107 (1989) 417–423.