

00562

2  
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

" BIOQUIMICA DE LA NEUROTRANSMISION DEL OIDO  
INTERNO DE LA RANA "

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS QUIMICAS ( BIOQUIMICA ) .

QUE PRESENTA EL QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
IVAN AXEL LOPEZ BAJONERO

México, D.F.

1987

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Esta tesis está basada en los siguientes artículos:

1.- López,I. and Meza,G. Some properties of frog vestibular choline acetyltransferase and acetylcholinesterase. ( enviado para su revisión a Brain Research ).

2.- López,I. and Meza,G. Neurochemical evidence for afferent GABAergic and efferent cholinergic neurotransmission in the frog vestibule ( aceptado para su publicación en Neuroscience, 1987)

y en los siguientes resúmenes:

Meza,G., Cuadros,P., and López,I. Biochemical studies on the cholinergic neurotransmission of the frog vestibule. Soc. Neurosci. Abstr.,10:1152 (1984).

Meza,G. and López,I. Characterization of cholinergic neurotransmission in the frog vestibule. J. Neurochem.44, s98c(1985).

Meza,G., López,I. and Feria Velasco,A. Possible efferent neurotransmission in the inner ear of the frog. Soc. Neurosci. Abstr,11:207(1985).

López,I., and Meza,G. Possible cells of origin of GABA and acetylcholine synthesis in the frog vestibule. Midwinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology. 10:142(1987).

## I N D I C E

RESUMEN. . . . .	1
INTRODUCCION . . . . .	3
MODELO Y ENFOQUE EXPERIMENTAL. . . . .	23
BREVE DESCRIPCION DEL OIDO INTERNO DE LA RANA. . . . .	24
PARAMETROS ESTUDIADOS. . . . .	25
PROCEDIMIENTO DE DISECCION DEL VESTIBULO DE LA RANA. . . . .	27
PROCEDIMIENTO DE LA DENERVACION. . . . .	27
RESULTADOS Y DISCUSION	
SISTEMA DE LA ACETILCOLINA . . . . .	31
SISTEMA DEL GABA . . . . .	34
LOCALIZACION CELULAR DE LA SINTESIS DE GABA Y ACETIL- COLINA . . . . .	35
CONCLUSIONES . . . . .	43
REFERENCIAS. . . . .	45
APENDICE. TRABAJOS PRESENTADOS BASE DE ESTA TESIS. . . . .	58

## RESUMEN

El oído interno está constituido por dos partes: una porción relacionada con la audición (la cóclea) y la porción vestibular que se encarga de proveer al sistema nervioso central (SNC) de una parte importante de la información sensorial necesaria para el mantenimiento del equilibrio y de la postura. Esta función es llevada a cabo por células especializadas en la mecanorrecepción (células pilosas) a través de fibras aferentes. Por otro lado los impulsos centrales son enviados al vestíbulo por conexiones eferentes.

Existen evidencias de que la comunicación en ambos sentidos (eferente y aferente) es de tipo químico. Sin embargo la investigación en relación a la naturaleza y función de los neurotransmisores en este sistema es muy reducida comparándola con otros (i.e. la retina), esto se debe probablemente a que el oído, debido a su ubicación es un órgano poco accesible. Recientemente han aparecido algunos reportes (55,105,109) los cuales involucran a la acetilcolina (ACh) y al ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) como posibles mediadores, por lo que en este estudio se decidió investigar algunos parámetros de estos neurotransmisores en el vestíbulo, usando como modelo el oído interno de la rana.

Para evaluar el papel de la ACh se investigó la enzima que la sintetiza la colin acetiltransferasa (CAT), y se estudiaron algunas de sus propiedades. Así mismo, se estudió la existencia de la acetilcolinesterasa (AChE) como un posible mecanismo de inactivación del neurotransmisor. Para la evaluación del GABA como neurotransmisor se midió la actividad de la glutamato descarboxilasa (GAD), que es la enzima que lo sintetiza.

Se encontró que en homogenados de vestíbulo de rana, existe actividad tanto de la CAT y AChE como de la GAD. Se encontró también que estas enzimas tienen actividades específicas semejantes a sus homólogas en el sistema nervioso central y periférico. Además tanto la CAT como la AChE presentaron propiedades cinéticas semejantes a las de la CAT y la AChE presentes en el sistema nervioso central y periférico.

Para la localización celular tanto de la CAT como de la GAD se aprovechó el modelo de la denervación en el cual se sabe que al escindir el nervio vestibular de la rana, las terminales eferentes degeneran. Al medir tanto la CAT como la GAD se observó un decremento gradual con el tiempo de la actividad de la CAT hasta casi desaparecer completamente a las seis semanas después de la denervación. En tanto que la GAD no se modificó en ninguno de los tiempos después de la escisión.

Estos hallazgos nos sugieren que la CAT parece localizarse en las terminales eferentes que degeneran con la denervación y que la GAD en el vestíbulo de la rana parece localizarse en alguna célula o compartimento del epitelio sensorial vestibular el cual no sufre ninguna alteración después de la escisión y que podría ser la célula pilosa.

Con base a estos resultados se puede postular que la ACh y el GABA pudieran actuar como neurotransmisores eferente y aferente respectivamente en el vestíbulo de la rana.

## ABSTRACT

The vertebrate inner ear is divided into two parts: a portion related to audition (cochlea) and the vestibular part, which provides the major source of sensory information utilized by the central nervous system(CNS), in order to maintain balance. This function is carried out by specialized cells in mechanoreception(hair cells) through synaptic contacts with afferent fibers. The central impulses are sent to the vestibule by means of efferent connections.

There is strong evidence indicating that synaptic transmission between the hair cells and the afferent fibers as well as the communication between the efferent fiber and the hair cell is chemical in nature. However, research into this system, is quite scarce as compared with other sensory organs(i.e. retina). This is mainly due to the fact that end organ is less accessible.

Recently there have appeared some evidences in regard to acetylcholine(Ach) and  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA) as putative mediators in the vestibule. For this reason, we decided to investigate some parameters related to these substances using as a model the frog inner ear.

To test the role of Ach we studied its synthesizing enzyme choline acetyltransferase (CAT), some of their kinetic properties, and the presence of acetylcholinesterase(AchE) as Ach inactivating mechanism.

The role of GABA as a neurotransmitter in this system was studied by the investigation of the existence of its enzyme of synthesis, glutamic acid decarboxylase(GAD).

CAT, AchE, and GAD were found to be present in a frog labyrinth homogenate. These enzymes have similar specific activities as those of the CNS and peripheral nervous system(PNS). Additionally CAT and AchE showed similar kinetic properties as those of CAT and AchE of the CNS and PNS.

The cells of origin of these enzymes was studied by elimination of certain populations of terminals. For this purpose we used the model of denervation in which the eighth cranial nerve(right side) of the frog is excised and degeneration of efferent fibers and terminals has been found.

We observed that the transection of the vestibular nerve resulted in a gradual diminution of CAT activity until it reached 88% decreased six weeks after surgery. In contrast GAD activity did not suffer any alteration at any time after nerve excision. These findings suggest that the decrease of CAT following nerve excision supports the efferent synaptic bouton localization of CAT. That GAD is located in a cell type(or compartment) that may well be the hair cell is supported by the fact that this enzyme does not suffer any modification after denervation.

These results are in accordance with an efferent cholinergic neurotransmission and of a putative afferent role of GABA in the frog vestibule .

## INTRODUCCION

La naturaleza ha provisto a todos los animales sobre la tierra de receptores especiales que detectan la fuerza de gravedad. Estos se ubican en la parte interna del oído.

El papel del sistema vestibular en la percepción de las aceleraciones y la integración de información en relación a matener la orientación, ha mantenido el mismo mecanismo desde los organismos más antiguos sobre la tierra. El primer órgano vestibular (el receptor más primitivo, el estatocisto, que se encuentra en los moluscos) apareció hace más de 600 millones de años.

Un incremento continuo en la complejidad de la anatomía ocurre con la evolución filogenética desde el primer estatocisto hasta el sofisticado laberinto de los vertebrados superiores.

Todos los vertebrados detectan los sonidos, las aceleraciones del cuerpo y los movimientos del agua con el sistema sensorial acústico lateral. Los receptores primarios de esta sistema, ya sea en la cóclea, el vestíbulo o la línea lateral son las células neuroepiteliales llamadas células pilosas, las cuales reciben inervación tanto eferente como aferente. Estas inervaciones provienen del nervio vestíbulo-auditivo (octavo nervio craneal), el cual se extiende hacia los órganos periféricos sensoriales vestibulares, a través del canal auditivo interno y finalmente penetrando hacia el sistema nervioso central (SNC) donde termina de una manera compleja pero organizada dentro del tallo cerebral y el cerebelo.

## EL OIDO INTERNO DE LOS VERTEBRADOS

Tradicionalmente se dice que el hombre posee cinco sentidos: tacto, olfato, gusto, vista y oído, pero algunos de estos pueden a su vez dividirse en varios, por ejemplo, en la cavidad que contiene al oído interno se encuentran los órganos de dos sentidos, el órgano encargado de recibir las ondas sonoras (el órgano de Corti) y el del equilibrio (el aparato vestibular).

La delicadeza del oído interno es sugerida por la impenetrabilidad de su alojamiento. La porción petrosa (peñasco) del temporal constituye la estructura ósea más dura del cuerpo y es el único que persiste como tejido óseo fetal (fig.1).

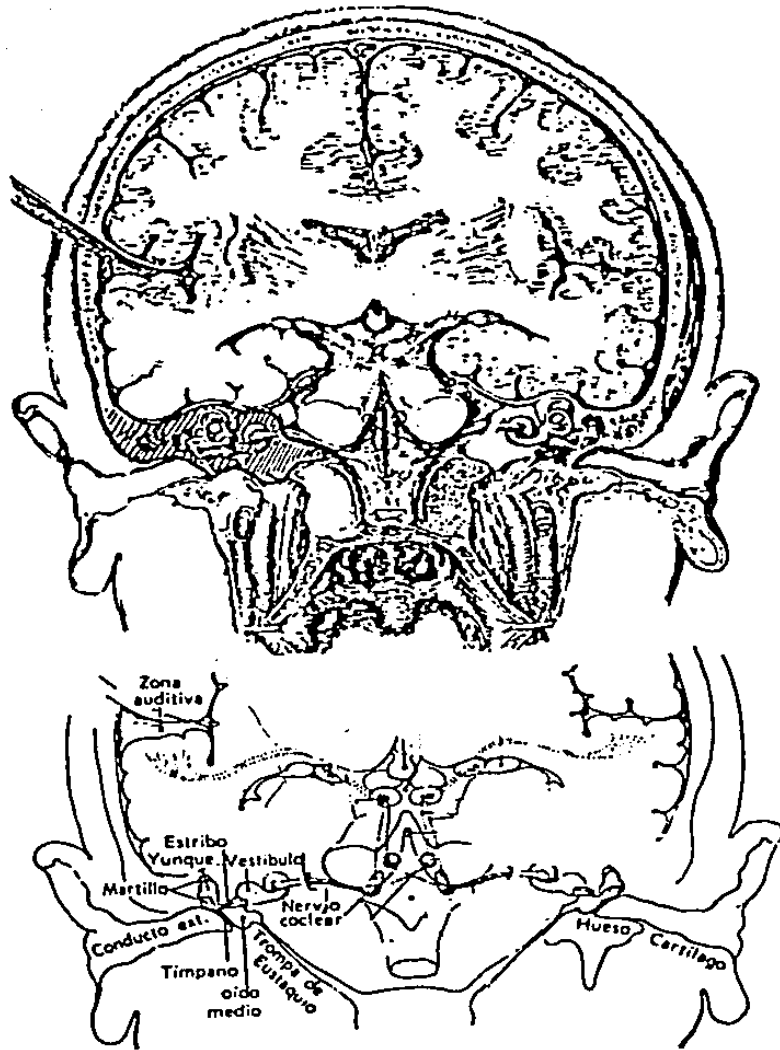


Fig. 1 Localización del sistema auditivo en el hombre.  
La zona estriada muestra la región del hueso temporal.



El aparato vestibular está constituido por una serie de sacos y conductos de tipo membranoso, lleno de un líquido de composición química muy peculiar llamado endolinfa , y al mismo tiempo este aparato membranoso está en suspensión en un líquido conocido como perilinfa. Todo este conjunto está contenido dentro de una serie de canales y cavidades excavadas en el hueso temporal cuya forma sigue cercanamente la de las estructuras del laberinto membranoso, este último es el verdadero receptor . La porción vestibular del oído interno consta de cinco órganos: tres canales semicirculares, el utrículo y el sáculo. La cóclea está constituida por un solo órgano( el órgano de Corti)(fig.2).

La porción sensible del epitelio sensorial se organiza en el vestíbulo de la siguiente manera: en el utrículo y el sáculo formando lo que se denominan las máculas; en los canales semicirculares, la cresta ampular, y en la cóclea lo que constituye el órgano de Corti(fig 3).

#### EPITELIO SENSORIAL

Ciertas partes de los órganos estato-acústicos están cubiertas con una capa de células epiteliales especializadas, que constituyen la porción sensitiva y que forman junto con las células de soporte el epitelio sensorial. Cada epitelio sensorial de los diferentes órganos (i.e. canales, utrículo sáculo, línea lateral y cóclea) contiene dos tipos de células pilosas, la I y la II, en el caso del vestíbulo y células pilosas externas e internas en la cóclea, además poseen células de soporte y las fibras nerviosas (aférentes y eferentes) que las inervan. Las células de soporte se extienden por toda la superficie endolinfática hasta la porción basal de ésta excepto durante el desarrollo. En la parte superior del epitelio sensorial se encuentra casi siempre una masa inerte (la cúpula y la membrana otolítica en el caso de los órganos vestibulares y la membrana tectoria en la cóclea fig.4).

Las células pilosas se originan de la superficie del ectodermo y mantienen su carácter de epitelio en los órganos maduros del oído interno, y aunque carecen de axones y dendritas, hacen sinapsis con las fibras nerviosas aferentes, que van

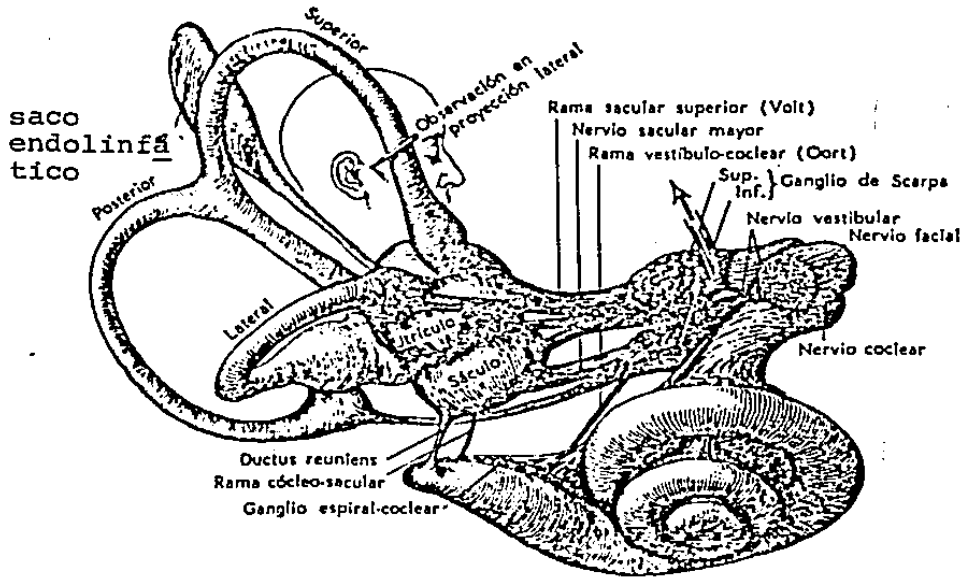


Fig.2 Partes que constituyen al oído interno mostrando la relación del órgano del equilibrio (vestíbulo) con el órgano auditivo (cóclea).

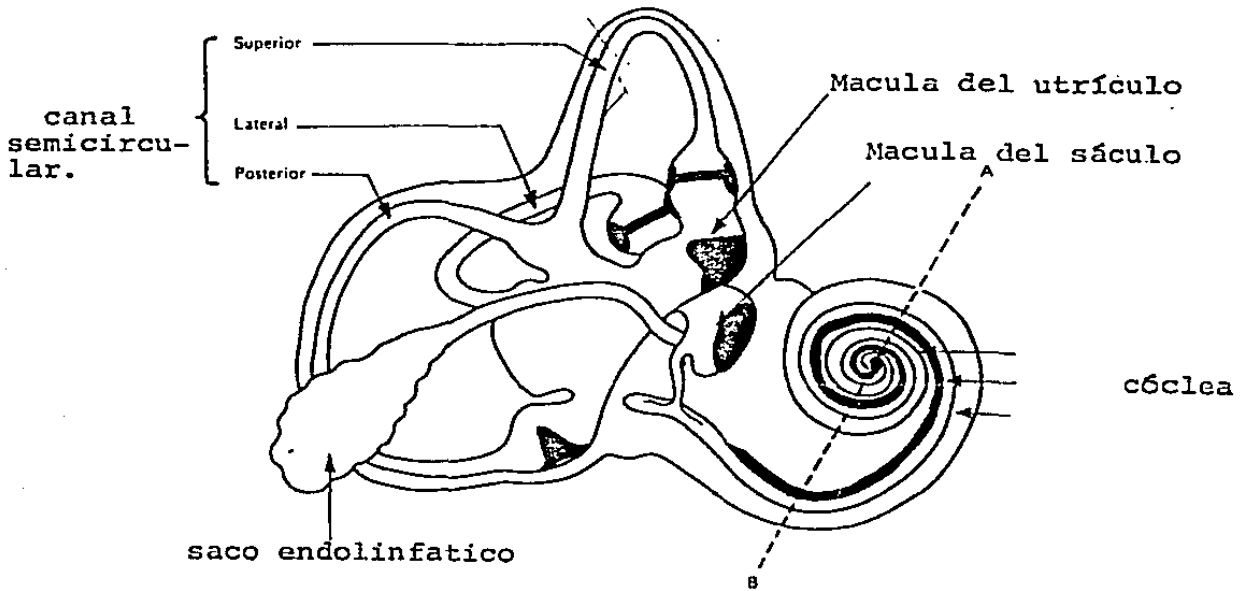


Fig 3 . Porciones sensibles del oído interno.

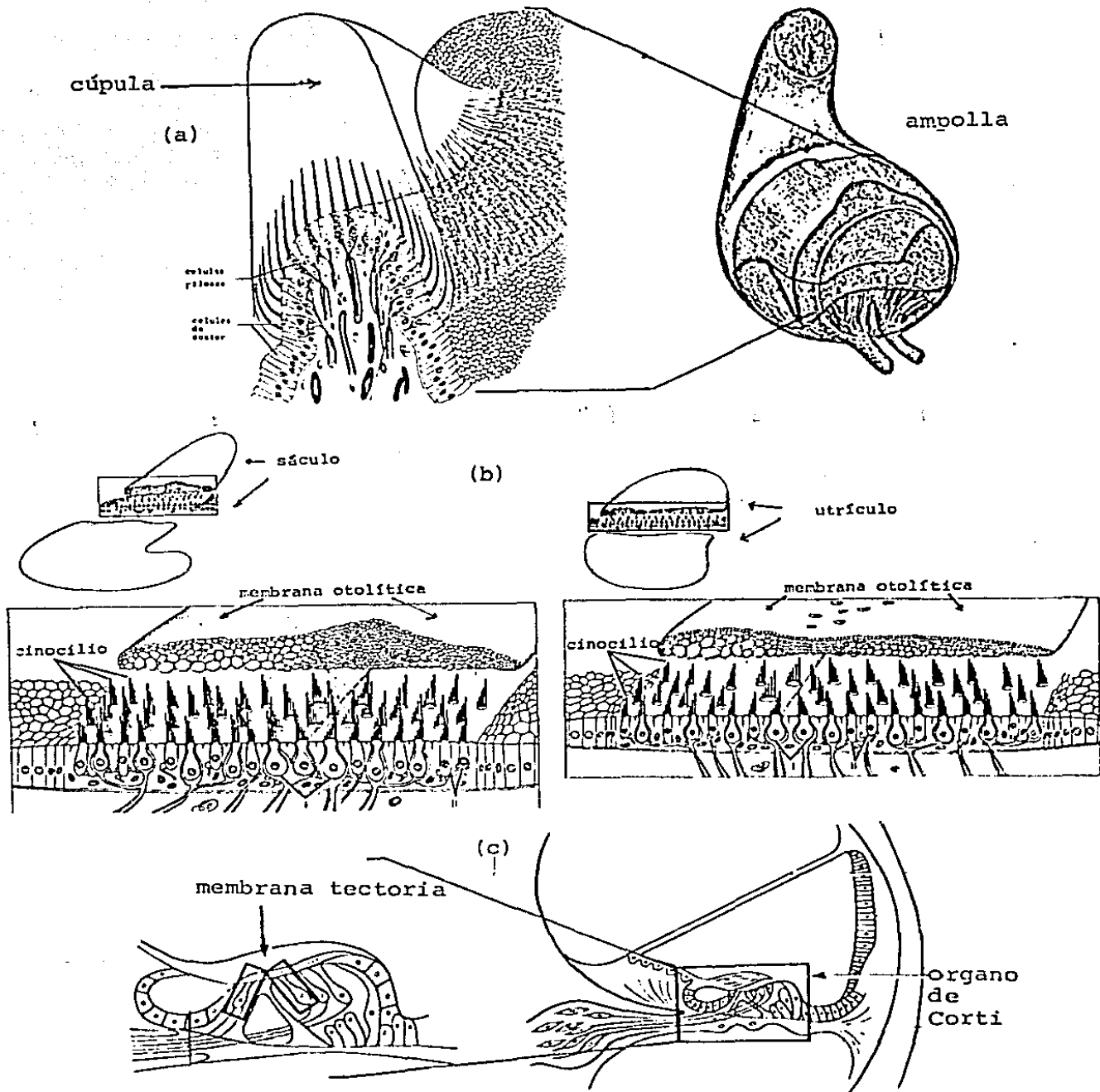


Fig 4 . Esquema representativo de las áreas sensitivas ubicadas en:  
 (a) Las crestas vestibulares de los canales semicirculares, (b) Las máculas de los órganos otolíticos del vestíbulo, (c) En el órgano de Corti coclear, mostrando los elementos fundamentales y los sistemas de acoplamiento mecánico (cúpula, membrana otolítica y membrana tectoria).

hacia el cerebro y reciben las fibras eferentes provenientes del tallo cerebral(fig 5).

Un rasgo estructural de éstas células es el haz de prolongaciones citoplasmáticas en su porción apical denominados pelos sensorios o estereocilios y poseen además un cilio verdadero o cinocilio. Cada estereocilio está formado en su interior por un bastón rígido de filamentos de actina fasciculados y rodeados por la prolongación de la membrana(fig.6).

Estos estereocilios se encuentran en una disposición hexagonal y su tamaño se va incrementando de una orilla del haz hacia el lado opuesto en donde se encuentra el cinocilio.

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

Cada célula pilosa se encuentra morfológicamente polarizada: por la parte apical contiene un haz de pelos y un cilio verdadero, el que se opone a 60 estereocilios. El cinocilio de varios receptores tiene la misma orientación con respecto a algún punto de referencia. Es claro que la polarización morfológica es paralela a la polarización funcional i.e. todas las células pilosas muestran la misma polarización morfológica y reaccionan a un estímulo de la misma manera(98). Los principios de la polarización funcional(respuesta eléctrica) se resumen de la siguiente forma: cuando el haz de pelos sensorios se dobla hacia el extremo en donde se encuentra el cinocilio se produce una despolarización, mientras que la deflexión en dirección opuesta ocasiona una hiperpolarización(86). Los estímulos aplicados en dirección ortogonal no producen respuesta(fig 7) (53,132).

#### TRANSDUCCION

La célula pilosa es una célula mecanoreceptora que convierte (transduce) la energía mecánica aplicada a su haz de pelos sensorios en una señal eléctrica. Se considera como muy probable que la energía mecánica sea transducida a una señal

(9.)

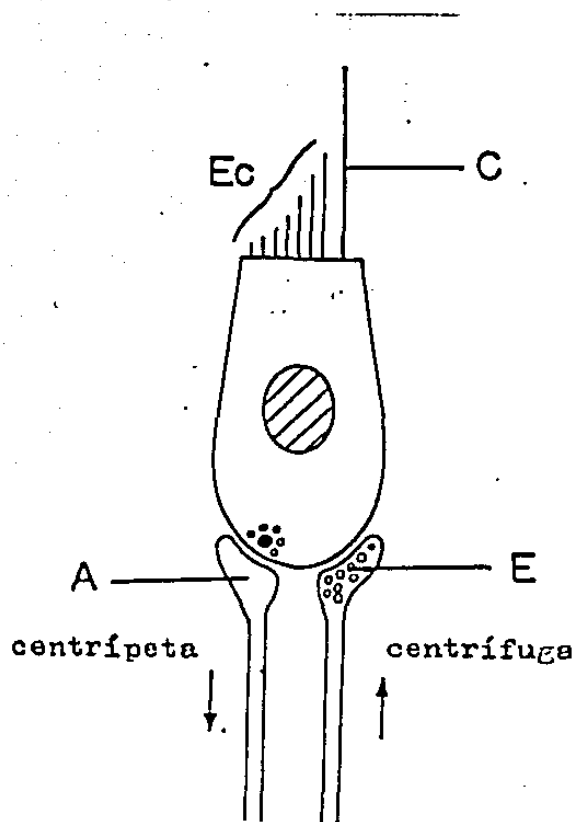


Fig 5. Esquema de las partes principales que constituyen a la célula pilosa y sus contactos neurales. Ec= estereocilios; C=cinocilio; A=terminación nerviosa aferente; E= terminación nerviosa eferente.

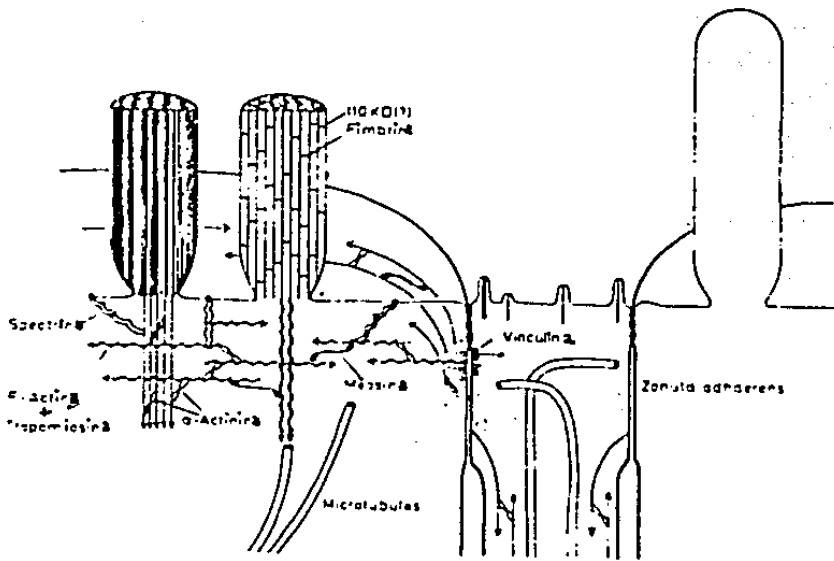


Fig.6 Modelo hipotético de la organización estructural y funcional del citoesqueleto en las células pilosas. (modificado de Drenckhahn, D., Schafer, T., and Prinz, M. (1985) Actin, myosin, and associated proteins in the vertebrate auditory and vestibular organs: immunocytochemical and biochemical studies. In Auditory Biochemistry. D. Drescher. (Ed.). Charles, C. Thomas, pp 317-335.

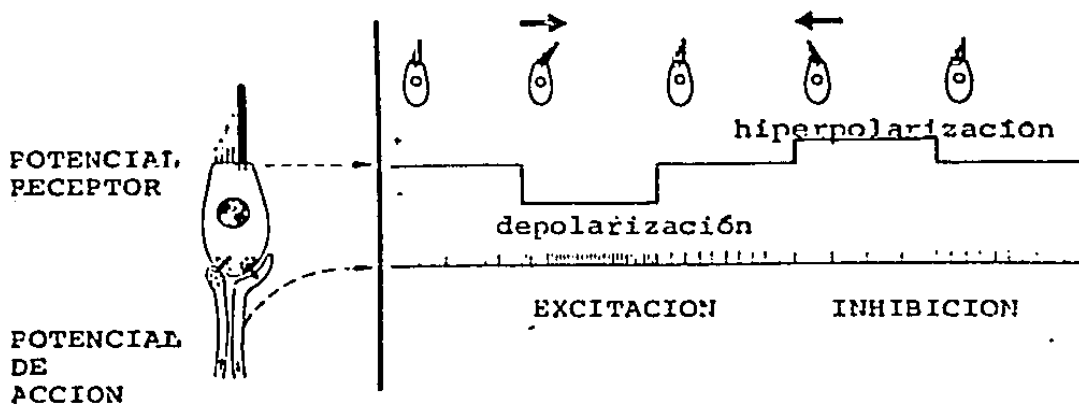


Fig.7 Ilustración diagramática de la función de la célula pilosa (Tomado de: Flock, A (1965) Transducing mechanisms in lateral line canal organ receptor. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 30, 133-146.

eléctrica a través de canales iónicos(115)directamente acoplados a la parte apical de los estereocilios y no a los del cinocilio el cual el cual tiende a desaparecer durante el desarrollo de las células pilosas del órgano de Corti y puede ser eliminado en los órganos vestibulares sin alterar esta función(85).

La propiedad de los estereocilios de responder mecánicamente se determina por su arquitectura interna, en la cual el citoesqueleto de los filamentos de actina proporciona rigidez y en la porción cuticular de la parte apical de la célula pilosa se encuentran otras proteínas como son la fimbrina la cual probablemente se entrecruce con los filamentos de actina de una forma estable. La miosina también está presente y quizá interaccionando con la actina y controlando esta interacción se encuentra la tropomiosina(fig.6) (32).

Estimulos como la rotación, los desplazamientos lineales, la fuerza de gravedad y las ondas sonoras son transmitidos inicialmente a las estructuras accesorias del oído interno- la cúpula, la membrana otolítica y la membrana tectoria- lo que provoca un desplazamiento de los estereocilios de las células pilosas de las áreas sensitivas de la porción vestibular y coclear del oído interno. Una vez que ocurre el desplazamiento de los pelos sensorios por alguno de estos estímulos el potencial de membrana cambia de -60mV hasta 20 mV. Cuando el haz de estereocilios se mueve hacia el cinocilio la conductancia de la membrana se incrementa; esto es, la membrana se vuelve más permeable a iones cargados positivamente. Esto sugiere la existencia de canales de transducción, a través de los cuales los iones pueden pasar cuando se estimula a los estereocilios.

Se ha calculado que existen cerca de 280 canales de transducción por célula pilosa en el sáculo de la rana, estos canales tienen la capacidad de mediar el movimiento de iones como el  $K^+$ , el cual se encuentra en alta concentración en la endolinfa(84)

El proceso de transducción ocurre muy rápidamente, ya que los canales conducen la corriente a los pocos microsegundos de la aplicación del estímulo, una explicación es que este proceso se lleva a cabo en la parte apical del haz de cilios, lo que no permite la interacción de segundos mensajeros y por lo tanto

solo la interacción entre los estereocilios puede iniciar alguna respuesta. Esta interacción se ha propuesto que ocurra por la existencia de un microfilamento que se encuentra en la punta de un estereocilio y que interacciona con la parte lateral del estereocilio adyacente(59,118).

Cuando el haz de estereocilios es flexionada, los canales de transducción se abren y los iones  $K^+$  entran a la célula. La despolarización provocada por este estímulo activa los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje, provocando un aumento de la despolarización por los iones  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje. Al mismo tiempo la entrada de  $Ca^{2+}$  eleva la concentración local de este cerca de la superficie de la membrana. La alta concentración de  $Ca^{2+}$  activa los canales de  $K^+$  sensibles a  $Ca^{2+}$  y el  $K^+$  sale y repolariza la membrana disminuyendo la activación de los canales de  $Ca^{2+}$ . El fluido en la superficie apical de la célula pilosa tiene una concentración de  $K^+$  mucho más elevada que la superficie basolateral de ésta, Como consecuencia el  $K^+$  puede entrar y salir de la célula. Con el tiempo el potencial de membrana se vuelve más negativo y regresa a su estado estacionario, y el contenido de  $Ca^{2+}$  intracelular se reduce por su captura dentro de los organelos de la célula y por expulsión de este ión. Por ultimo cuando el canal de  $K^+$  sensible a  $Ca^{2+}$  se cierra, la célula pilosa retorna a su condición inicial(fig.8).

Los iones  $Ca^{2+}$  al entrar por la parte basal de la célula interactúan con estructuras aún desconocidas y por un mecanismo incierto provocan la salida de un mensajero químico hacia la región intersináptica. Cuando esta substancia atraviesa este espacio y llega a la terminal nerviosa aferente se combina con los receptores de éstas y causa un cambio de permeabilidad de la membrana lo que resulta en un potencial generador que a su vez llega al axón y provoca un potencial de acción, transformándose en una señal eléctrica(impulso eléctrico) que viaja al cerebro (fig 8.).

#### TIPOS DE CELULAS PILOSAS



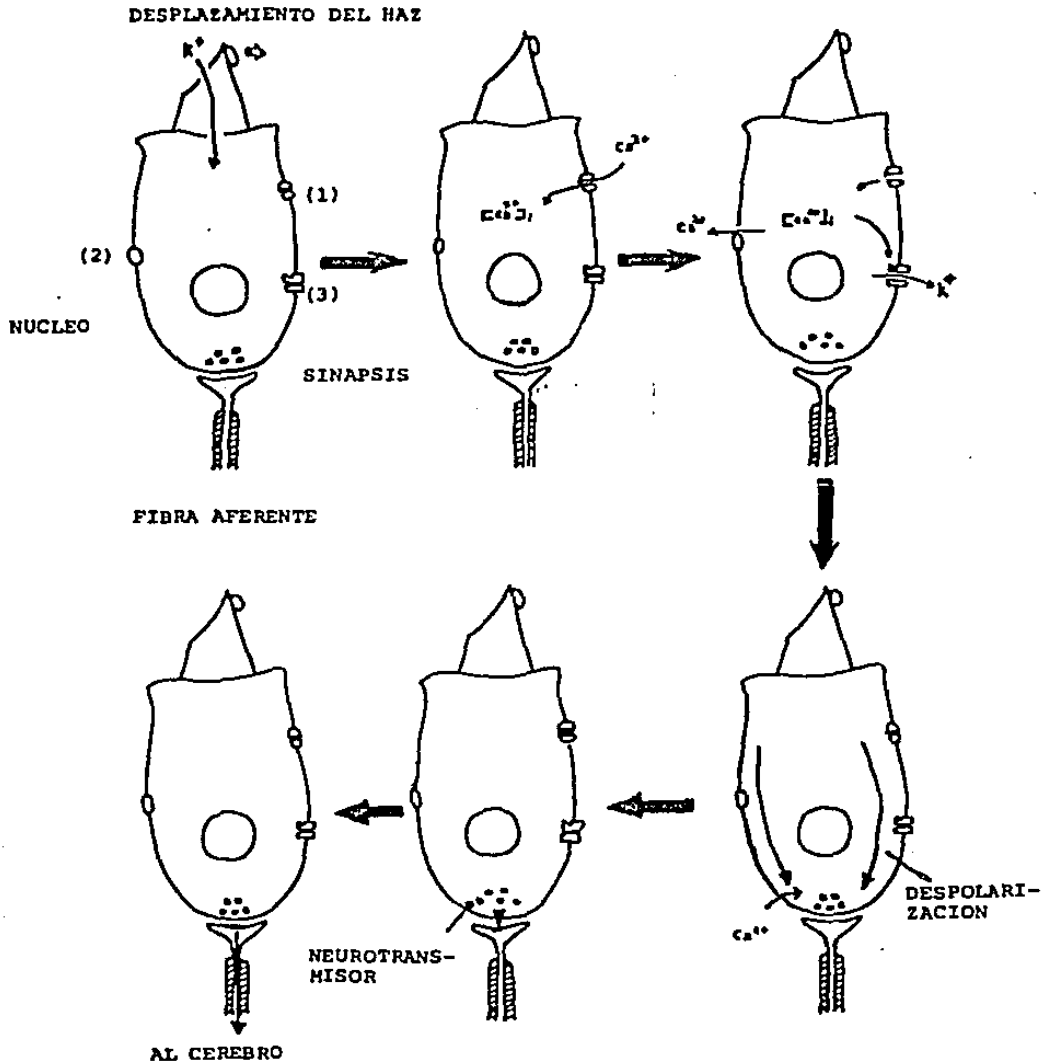


Fig 8. Representación esquemática de los eventos que desencadena un estímulo sobre el haz de estereocilios de la célula pilosa. (1), (2) canal de calcio, (3) canal de potasio sensible a calcio (modificado de Hudspeth, A.J. (1985) The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells. Science, 230, 745-752).

Wersall describió dos tipos de células pilosas en el epitelio sensorial vestibular y demostró que poseen diferentes terminales nerviosas(154). En el vestíbulo la célula pilosa Tipo I común en los vertebrados superiores, está inervada por una terminal aferente en forma de calíz(fig 9A). A su vez recibe información central en la forma de botones sinápticos eferentes que contactan a la fibra aferente. La célula pilosa Tipo II común a todos los vertebrados, recibe terminales nerviosas tanto aferentes como eferentes en su parte basal(fig.9B).

En la porción auditiva las células pilosas son de dos tipos: las internas y las externas(fig 9Cy'D), clasificadas por su colocación con respecto a la luz de la rampa media de la cóclea.

Las células pilosas internas tienen forma ovoide y las parte apical ligeramente doblada, las externas tienen forma cilíndrica y se disponen oblicuamente frente a las internas y son más numerosas, ambas presentan varias filas de estereocilios de un tamaño bien definido. En su parte basal se encuentran sinapsis aferentes (ascendentes) y sinapsis eferentes(descendentes). Las terminales aferentes inervan al 95% de las células pilosas internas y al resto a las externas. Las fibras eferentes hacen contacto con las células pilosas internas y externas y con las fibras aferentes de las células internas.

#### MECANISMO DE TRANSMISION SINAPTICA EN EL SISTEMA ACUSTICO-LATERAL

Existen numerosas evidencias tanto morfológicas como fisiológicas indicando que la transmisión sináptica entre las células pilosas y las fibras nerviosas aferentes es de naturaleza química(53,60,61, 87,155,156).

Estudios ultraestructurales han revelado que el espacio sináptico entre la célula receptora y la fibra aferente es aproximadamente de 200 Å. La célula pilosa (presinapsis en este caso) contiene un cuerpo típicamente presináptico, mientras que la terminal post-sináptica(fibra aferente) muestra un engrosamiento en su membrana (9,110,134,154-157).

Los cuerpos presinápticos fueron descritos por primera vez por Sjöstran(133) en la retina y dichos cuerpos fueron encontrados

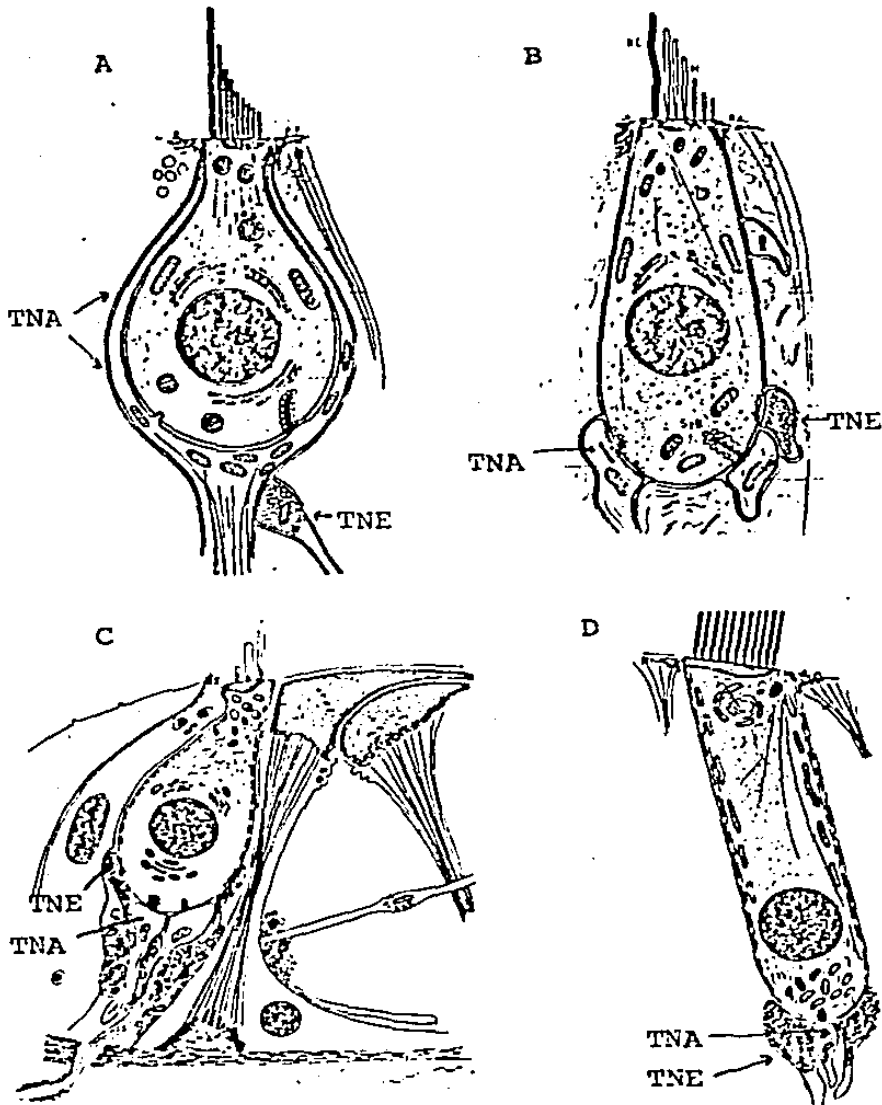


Fig 9 . Esquema de los diferentes tipos de células pilosas que se encuentran en el epitelio sensorial vestibular y coclear y sus inervaciones.

A y B células pilosas Tipo I y II .

C y D células pilosas externa e interna.

TNA = terminal nerviosa aferente, TNE= terminal nerviosa eferente .

en los receptores vestibulares por varios grupos(53,110,154,155, 156) (fig 10).

Investigaciones fisiológicas han demostrado potenciales post-sinápticos excitatorios en las fibras primarias aferente en el sáculo del pez dorado y en el canal semicircular de la rana(60, 127). Furukawa también ha demostrado la existencia de un retraso en el potencial sináptico en la unión recepto-neural del octavo nervio del pez dorado después de la estimulación de la célula pilosa(61) y se ha comprobado la existencia de una neurotransmisión de tipo cuántico(87). Asimismo, potenciales unitarios registrados en fibras aferente provenientes de las áreas sensoriales vestibulares de elasmobranchios y anfibios se modifican por movimientos de la cabeza ó desaparecen por la supresión de calcio en el medio(27,126,138).

Se ha descrito la sinapsis eferente por estudios morfológicos con microscopía electrónica. Generalmente las terminales eferentes (botones) contienen muchas vesículas, algunas de ellas con centro denso, mientras que a nivel de la célula pilosa se ha encontrado una cisterna subsináptica. También la distancia entre las terminales eferentes (presinápsis) y la célula pilosa mide cerca de 200 Å (36,63,110,134,135,152). Todos estos rasgos conforman la estructura de una sinapsis química (fig 10).

Hallazgos fisiológicos han reportado que existen en el laberinto de la rana potenciales postsinápticos inhibitorios, inducidos por estimulación de las fibras eferentes(64). Aún más existen evidencias fisiológicas de que la comunicación entre la célula pilosa y la terminal nerviosa eferente es de naturaleza química(120).

Estos hallazgos, aunque importantes, no nos explican nada acerca de la naturaleza química del transmisor involucrado tanto en las sinapsis aferentes como eferentes en este sistema, por lo que ha sido necesario utilizar una serie de estrategias para resolver el problema de vías neuronales específicas en el SNC ó en los receptores sensoriales como es en este caso el oído interno. Sin embargo para propósitos prácticos deben existir reglas homogéneas de manera que se puedan comparar los resultados de diferentes investigaciones.

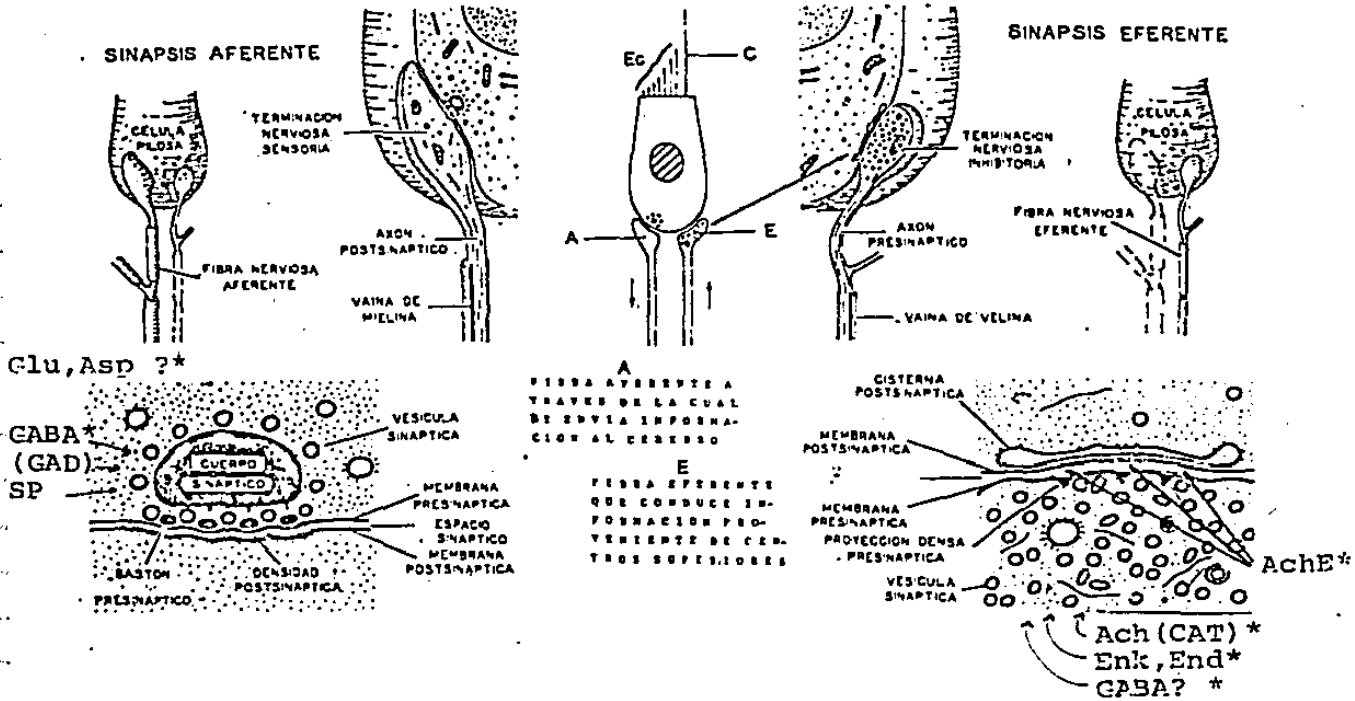


Fig10 Representación esquemática de la ultraestructura de las uniones sinápticas que contactan a la célula pilosa (modificado de Benshalon, G. y Flock, A. (1980) Ultrastructure of synapses in the lateral line canal organ. Acta Otolaryng. 90,11 ). \* Se señala la posible localización de estos neurotransmisores (ver por separado pag 19 a 24)

Basandose en las características mostradas por un neurotransmisor en una sinapsis bien definida, varios autores han propuesto criterios que debe llenar un compuesto para ser denominado neurotransmisor .

Entre estos criterios los descritos por Werman(153) son esencialmente útiles, sobre todo tratándose de estudios iniciales . Dichos criterios pueden ser de gran utilidad para establecer la comparación con sistemas ya definidos(i.e. la acetilcolina en la placa neuromuscular y el GABA en las células de Purkinje de los mamíferos).

Estos criterios pueden dividirse en presinápticos y postsinápticos. Los presinápticos son: la presencia de esta sustancia en la terminal nerviosa; la disponibilidad de los precursores de esta; la presencia de la enzima sintetizante; la existencia de un mecanismo específico de liberación y captación de la sustancia por estimulación de la terminal y la existencia de mecanismos de inactivación.

Entre los criterios postsinápticos se encuentran: la sustancia aplicada en el sistema debe tener los mismo efectos que la estimulación presináptica; drogas aplicadas, las cuales disminuyan el efecto del compuesto en prueba, deben bloquear los efectos de estimulación y la sustancia debe producir cambios similares en las propiedades eléctricas de la membrana como lo hace la estimulación(este último criterio debe hacerse por registro intracelular).

En general, los criterios presinápticos pueden ser estudiados por métodos bioquímicos o inmunocitoquímicos, mientras que los criterios postsinápticos requieren de métodos electrofisiológicos, aunque la identificación de los receptores postsinápticos puede ser estudiada bioquímicamente.

Como se mencionó anteriormente, la identidad del(o los) neurotransmisor(es) que actúan entre las células pilosas y las terminales aferente y eferentes no se conoce. Sin embargo, se han estudiado como posibles mediadores los ya clásicamente descritos para el SNC y el periférico de vertebrados, tratando de acumular para estos, datos experimentales que cumplan con los requisitos ya mencionados.

De los neurotransmisores estudiados en el sistema acústico-

lateral podemos mencionar; a la acetilcolina, el ácido  $\gamma$ -amino-butírico, el ácido glutámico, el ácido aspártico, las catecolaminas y más recientemente algunos neuropéptidos como las encefalinas.

A continuación se describirán algunos de los hallazgos realizados por varios grupos de investigación, para cada uno de estos mediadores químicos.

#### ACETILCOLINA (ACh)

Existen numerosas evidencias tanto fisiológicas, histoquímicas y bioquímicas, que implican a la ACh en la neurotransmisión vestibular eferente de algunos vertebrados.

Las terminales eferentes de probable naturaleza colinérgica en el sistema vestibular ejercen una influencia tónica inhibitoria sobre la actividad aferente proveniente del receptor vestibular (11, 23, 69, 129, 148).

Se ha demostrado que la ACh imita los efectos de la estimulación del haz olivocolear y del sistema eferente en el vestíbulo (18, 20, 26, 31, 69, 112).

Experimentos histoquímicos describen la presencia de la acetilcolinesterasa (AChE), la enzima que hidroliza a la ACh, a nivel de la periferia sensorial vestibular en vertebrados (76, 90), además existen evidencias que demuestran que las terminales altamente vesiculadas (eferentes) provienen de centros superiores las cuales son teñidas selectivamente por métodos histoquímicos (30) para la AChE y que esta tinción se pierde después de la escisión del nervio vestibular (62). Se ha demostrado también transporte retrógrado de  $^3\text{H}$ -colina (el precursor de la ACh) por sinapsis eferentes en el laberinto del gato (11BR).

La colin acetiltransferasa (CAT), la enzima de síntesis de ACh se ha encontrado en el laberinto aislado del pez (54), pollo y cuy (88, 84, 105). Se ha reportado también un sistema de captación de  $^3\text{H}$ -colina dependiente de  $\text{Na}^+$  y energía y un sistema de liberación de ACh recién sintetizada dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en el laberinto de la rana (47BR).

Se ha postulado por estudios farmacológicos que el receptor para la ACh en el sistema vestibular es probablemente nicotínico (14, 125, 127).

En la cóclea se ha demostrado síntesis de Ach (por bioensayo) (91) y se ha medido la actividad de la CAT en este sistema (52).

Recientemente por inmunocitoquímica se detectó actividad pa recida a la CAT en el sistema eferente medial y lateral en la cóclea (43,47,48) y se observó en animales deferentados la - desaparición de esta inmunoreactividad (3). Por otro lado también se ha detectado actividad de la AchE asociada al sistema eferente en la cóclea (76).

#### GABA

El GABA se ha postulado como transmisor aferente en el sistema vestibular, ya que ha llenado varios de los criterios postulados por Werman.

Se ha visto que la picrotoxina, un conocido bloqueador del receptor a GABA inhibe la actividad espontánea y evocada cuando ha sido aplicada en el nervio aferente del canal semicircular de la raya (54). La aplicación iontoforética (la cual involucra la inyección de volúmenes calculables de sustancias químicas ionizadas a través de una micropipeta de vidrio de varias puntas, por medio de la aplicación de una corriente constante) de GABA incrementa la actividad espontánea en la mácula del sáculo del gato (45).

El bloqueo por bicuculina y picrotoxina de esta respuesta y el tratamiento exitoso con picrotoxina de pacientes que sufren crisis de vértigo de origen periférico (35,44) pueden correlacionarse con la existencia de un receptor a GABA en la periferia sensorial del laberinto.

Experimentos bioquímicos han demostrado la unión específica de GABA tritiado a una preparación membranal cruda en crestas ampulares aisladas del pollo y esto tiende a confirmar la presencia de un receptor sináptico a GABA (106); también la existencia de un sistema de captación de alta afinidad dependiente de  $\text{Na}^+$  y energía posiblemente representando un sistema inactivador a GABA se ha reportado en crestas ampulares del vestíbulo del pollo (107). Por otro lado la enzima responsable de la síntesis de GABA, la glutamato descarboxilasa (GAD), se ha encontrado en el canal semicircular de la raya, en la papila anfibiana (la cual carece de inervación eferente),



(54) y en las crestas de pollo y cuy (104,28).

En contraposición, no se han encontrado efectos excitatorios del GABA sobre la actividad aferente en el vestíbulo de anfibios lo que contradice los resultados anteriores(7,70,150).

En la cóclea se ha detectado la presencia de sustancias similares al GABA, las cuales se incrementan en la perilinfa en cuyes sometidos a estimulación sonora(33,34). Por otro lado en la cóclea de gato y de cuy se ha encontrado que no existen niveles suficientes de las enzimas claves asociadas a la síntesis y degradación del GABA; la GAD, la transaminasa del GABA(GABA-T) y la deshidrogenasa del semialdehído succínico(SSADH)(52,140), y estudios con agonistas del GABA no modifican significativamente la respuesta de las fibras aferentes cocleares en el gato(94).

Finalmente estudios recientes por inmunocitoquímica han asociado al GABA a los sistemas eferentes en la cóclea del cuy(2,49) y del mono(143), y se han encontrado gránulos radioactivos en terminales eferentes de la cóclea, cuando ésta se incubaba con <sup>3</sup>H-GABA(22). Aunque evidencias aún más recientes han detectado la presencia de GABA por inmunocitoquímica con anticuerpos anti-GABA en las células pilosas del vestíbulo del pollo(146) y en las terminales nerviosas eferentes en el mono araña(147)

#### GLUTAMICO Y ASPARTICO

El ácido glutámico(Glú) y ácido aspártico(Asp) han sido también postulados como posibles neurotransmisores aferentes en el sistema vestibular, la línea lateral y la cóclea.

Recientemente se ha reportado que el glutámico mimetiza la acción de la sinapsis en la línea lateral y en los canales semicirculares de la rana(12,14,17,75,145,149). En la cóclea del cuy el Glu y el Asp producen un efecto excitatorio sobre las fibras aferentes(15,16,19,95). La perfusión del oído del gato con glutamato produce un aumento en la frecuencia de descarga de las neuronas aferentes secundarias a nivel del núcleo coclear(29). Se ha encontrado que el Nmetil,D-aspártico(NMDA), el ácido kaínico(KA) y el ácido quisquálico(QA) (agonistas del Asp y Glu) tienen un efecto activador en las aferentes de los canales semicirculares y la línea lateral de la rana(7,12,14). En el sáculo, la lagena y los

canales semicirculares del ajolote Ambystoma mexicanum se han estudiado los efectos del Glu y Asp los cuales cumplen con el criterio de similitud de acción, ya que la respuesta evocada por ellos remeda la producida por estimulación fisiológica además los antagonistas de Glu y Asp bloquean la respuesta a la estimulación del sistema(136). En la cóclea del gato el KA produce una activación de las aferentes mayor que la producida por glutámico(29). La administración de KA en la cóclea de rata produce alteraciones morfológicas de las aferentes asociadas a las células pilosas internas(102,121). La estimulación con alto  $K^+$  produce en la cóclea del cuy y en la línea lateral de la rana un aumento significativo en la liberación de Glu(13,92). Se ha encontrado que las células pilosas en la cóclea son capaces de transportar Glu y glutamina por un sistema de alta afinidad dependiente de  $Na^+$  y se ha reportado captación de  $^3H$ -Glu y  $^3H$ -glutamina por autorradiografía en las células pilosas internas de la cóclea(41,130).

Por otro lado se han detectado gránulos radiactivos en terminales eferentes de la cóclea cuando esta se incubaba con  $^3H$ -Asp(131)

Se ha visto que la aspartato aminotransferasa(AAT) posee una distribución en las células pilosas de la cóclea que parece indicar una mayor participación en el metabolismo energético de las células que en la transmisión sináptica, adicionalmente la actividad producida por el Glu en las aferentes primarias en los canales semicirculares de la rana, se asocian a una despolarización de las células pilosas a las cuales inervan, poniendo en duda su efecto postsináptico y no se ha logrado tampoco demostrar que el Glu realmente se libere por estimulación, ni que existan mecanismos de síntesis y degradación activa aparte de los asociados al metabolismo normal de las células(2,6,50,51,158).

#### CATECOLAMINAS

Las catecolaminas han sido postuladas como posibles transmisores aferentes en las células pilosas(116,144), aunque no se ha encontrado que los antagonistas adrenérgicos tengan efecto alguno en la descarga de las fibras aferentes cocleares(93), ni que la noradrenalina ejerza un efecto excitatorio sobre las mismas(26)

y no se ha encontrado actividad de la tirosina hidroxilasa en la cóclea de mamífero.

#### NEUROPEPTIDOS

Existen evidencias experimentales obtenidas recientemente por métodos inmunocitoquímicos que involucran a las encefalinas como posibles transmisores eferentes implicando que sus sistemas coexisten con el de la Ach en terminales eferentes (5).

La existencia de péptidos neuroactivos en la cóclea fue descrita por primera vez por Fex y Altschuler(46), los cuales demostraron inmunoreactividad semejante a las encefalinas en el órgano de Corti del Cuy. Estos estudios fueron confirmados por la identificación mediante cromatografía líquida de alta presión(HPLC) de sustancias del tipo de las encefalinas en la cóclea(79-82). Diversos estudios por inmunocitoquímica permitieron encontrar un efecto diferencial en el grado de inmunoreactividad de las eferentes que contactan las células cocleares internas y externas(38,39,42).

Estudios adicionales utilizando el HPLC han permitido demostrar la existencia de diferentes péptidos derivados de la proencefalinaA asociados al sistema olivococlear(37,40). Esta inmunoreactividad desaparece en animales deferentados indicando la asociación de estas sustancias al sistema eferente(4). Recientemente se ha encontrado inmunoreactividad asociada a péptidos derivados de la proencefalinaB(prodinorfina) en la cóclea del cuy (82). Por otro lado, en el sistema vestibular del conejo se ha reportado fuerte inmunoreactividad por la sustancia P(113) localizada en las terminales aferentes en forma de cáliz, que innervan las células pilosas Tipo I, del utrículo y el sáculo(160) y más recientemente se ha reportado inmunoreactividad a la sustancia P y a la colecistocinina en el cuerpo de las células pilosas (114).

#### MODELO Y ENFOQUE EXPERIMENTAL

A pesar de que en el oído interno de los vertebrados tenemos la ventaja de tener una población reducida de tipos de células, lo que nos permite estudiar la química de la neurotransmisión y a su vez correlacionar estos estudios con datos fisiológicos y conductuales de una manera más sencilla que en otras partes

del cerebro, la investigación a este nivel es muy reducida, debido probablemente a que es menos accesible, que por ejemplo la retina.

Aprovechando que al aislar los órganos del oído interno se pueden tener poblaciones celulares enriquecidas tanto de células receptoras como de contactos sinápticos, lo cual nos permite, que en las observaciones obtenidas sólo se tengan unas cuantas posibilidades al relacionarlas con un determinado tipo celular, decidimos utilizar un sistema cuyo acceso no ofreciera demasiadas dificultades a fin de poder estudiar la bioquímica de la transmisión sináptica a este nivel y para este objeto el oído interno de la rana representa un modelo ideal.

El oído interno de la rana es un órgano que ha sido utilizado durante décadas para estudios morfológicos y fisiológicos por ser relativamente accesible; el epitelio sensorial de este anfibio ha sido descrito(77) y la vía eferente ha sido mapeada(39). Por otro lado debido a que se puede aislar en forma relativamente intacta, se pueden realizar estudios in vitro, además este animal carece de cóclea. Otra ventaja es que el epitelio del vestíbulo de la rana a diferencia del de mamífero el cual contiene dos tipos de células pilosas, este sólo tiene un tipo de célula, la célula pilosa Tipo II, por lo que la existencia de un único tipo de receptor simplifica la interpretación acerca de la bioquímica de la transmisión sináptica, en nuestro caso para investigar los posibles neurotransmisores de la periferia sensorial vestibular abordando algunos de los parámetros descritos por Werman(153).

#### BREVE DESCRIPCION DEL OIDO INTERNO DE LA RANA

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

El epitelio sensorial de la rana posee un sólo tipo de célula

pilosa sensitiva (Tipo II) inervada por terminales nerviosas aferentes y eferentes en la parte basal, que provienen de la rama vestibular del octavo nervio craneal, y rodeada por células de soporte.

De este modelo se utilizó el órgano completo, al cual se eliminó el otolito (fig.11).

#### PARAMETROS ESTUDIADOS

En virtud de lo anterior y teniendo como antecedente que los neurotransmisores para los cuales se han aportado más evidencias en el vestíbulo siguiendo los criterios de Werman son la Ach como uno de los más probables eferentes y el GABA como en transmisor aferente, se decidió aportar evidencias que apoyen estas suposiciones en el vestíbulo de la rana, en el cual se determinó la actividad de las enzimas sintetizantes de la Ach, la colin acetiltransferasa (CAT) y del GABA (la glutamato descarboxilasa (GAD) como criterio principal para postular a estas dos sustancias como candidatos a neurotransmisores en el vestíbulo.

Este criterio es importante, no solo porque la velocidad de formación del transmisor, como de cualquier metabolito depende de la actividad de la enzima sintetizante, sino también porque la poza metabólica de la cual se liberan preferentemente los neurotransmisores es una poza de neurotransmisor recientemente sintetizado (141).

Al tratar de implicar tanto a la Ach como al GABA como neurotransmisores en el vestíbulo se infirió que sus enzimas de síntesis se comportarían bioquímicamente como aquellas descritas para el sistema nervioso (103, 104, 109).

Para la CAT, la enzima de síntesis de la Ach, se trató de comprobar la anterior suposición en este sistema, por lo que se midieron algunas de sus propiedades. Adicionalmente para el sistema de la Ach se midió la actividad de su enzima de degradación, la acetilcolinesterasa (AChE) como su mecanismo inactivador.

En el caso de la GAD la enzima de síntesis del GABA ya han sido reportadas algunas de sus propiedades en el sistema vestibular del pollo, y se vió que esta enzima se comportó como la descrita para el SNC (104).

Por último teniendo en cuenta que conociendo la localización celular de éstas enzimas se puede correlacionar bastante con la función sináptica del neurotransmisor, se utilizó el modelo de la denerva-

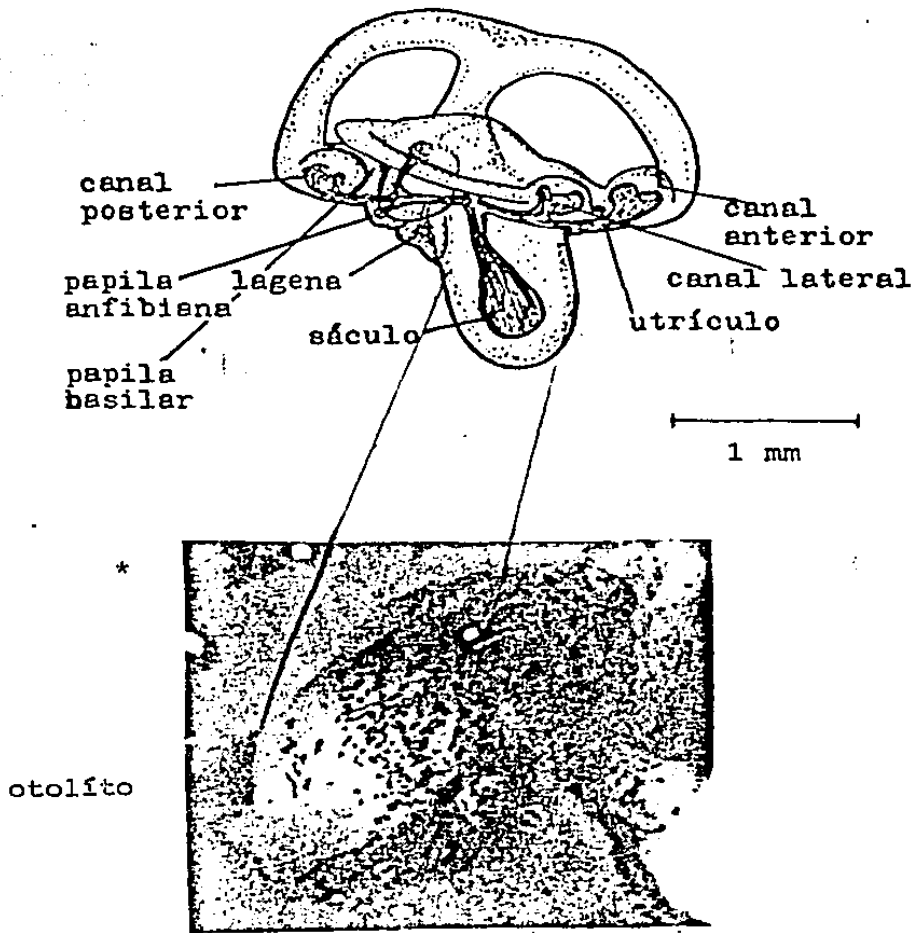


Fig.11 Representación esquemática de las partes que conforman el oído interno de la rana.

\* En la fotografía se muestra la localización del otolito.

ción en el cual se escinde el octavo nervio craneal y con este tratamiento se desconecta el vestíbulo de influencias centrales, provocando una degeneración de las terminales eferentes (degeneración Walleriana) lo que nos permitió ver cambios en la actividad de la CAT y la GAD, con objeto de identificar los tipos celulares en donde se ubican estas actividades.

#### PROCEDIMIENTO DE DISECCION DEL VESTIBULO DE LA RANA

Se utilizaron laberintos aislados de ranas adultas (Rana moctezuma) 50 a 100 g de peso y laberintos de ranas denervadas a diferentes tiempos después de la denervación.

Para esto se decapita al animal y se recibe la cabeza en una caja de petri, la cual contiene amortiguador de fosfatos, pH 7.4, 10 mM para la CAT y 7.3, 200 mM (para la GAD, con objeto de prevenir una posible deshidratación del tejido. Se procede entonces a remover la mandíbula inferior de la cabeza y a localizar la porción del hueso temporal, dentro del cual se encuentra el órgano vestibular, se remueve el músculo y el hueso y se abre la cápsula ótica que contiene al laberinto, el cual se encuentra separado del tallo cerebral, se remueve el ótolito del vestíbulo y se extrae el órgano completo con unas micropinzas (todo el procedimiento se realiza con la caja de petri sobre hielo y bajo el microscopio de disección). Al extraer el vestíbulo se tiene cuidado de no incluir al ganglio vestibular. El tiempo de disección para cada vestíbulo fue de 20 segundos y se extrajeron vestíbulos desde 5 a 20 animales según las necesidades de los experimentos.

#### PROCEDIMIENTO DE LA DENERVACION

Se siguió el procedimiento descrito en la literatura (123) con algunas modificaciones.

Se utilizaron ranas adultas (Rana moctezuma) las cuales se anestesiaron con pentobarbital sódico al 0.1% en solución salina isotónica inyectándolo por vía sublingual. Una vez anestesiada la rana se coloca boca arriba sobre un colchón de disección, se sujeta la cabeza con un alfiler y se abre la mandíbula inferior la cual se sujeta con un retractor. El procedimiento de la denervación se realiza bajo un microscopio estereoscópico y con el animal cubierto con una franela húmeda.

Se realiza una incisión en la membrana mucosa del paladar para exponer el hueso paraesfenoides. Se remueve el músculo que cubre al hueso y se hace una cavidad con una fresa dental, de un tamaño tal que se pueda visualizar el aparato vestibular de la rana, el octavo nervio y el tallo cerebral ( $3\text{mm}^2$  aproximadamente). A continuación se lleva a cabo la escisión del octavo nervio, teniendo cuidado de no dañar el aporte sanguíneo que va hacia el vestíbulo (descartando cualquier animal que presente hemorragia en la zona de la operación y al realizar la extracción del vestíbulo eliminando el órgano que presente hemorragia).

Una vez cortado el nervio, en una zona lo más cerca posible del tallo cerebral (fig 12.) se coloca una barrera de Gel foam entre el nervio escindido y el tallo cerebral, para prevenir una posible regeneración de éste.

El éxito de la operación se sigue por la examinación de los efectos característicos posteriores a la cirugía (123) (fig 13). La cabeza se inclina en un plano vertical relativo al cuerpo del lado de la denervación, en este caso el derecho y con una tendencia a extender las extremidades contralaterales. Los animales presentaron esta conducta todo el tiempo de experimentación.

Se realizaron controles morfológicos de esta denervación en animales de 15 días después de la operación, por microscopía de luz, con objeto de observar la degeneración Walleriana debida a la escisión del octavo nervio vestibular y observar el daño causado a nivel del epitelio sensorial.

Para esto se fijaron "in situ" vestibulos del lado izquierdo (control) y del lado derecho (denervado) con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato ( $0.1\text{M}$ ,  $400\text{ mOsm/l}$ ,  $\text{pH } 7.4$ ) y se postfijaron con tetróxido de osmio al 1%, se deshidrató el tejido y se incluyó en resina epóxica. Se realizaron secciones de una micra y se tiñeron con azul de toluidina para la examinación bajo el microscopio de luz.

#### DETERMINACION DE LA CAT, AchE y la GAD.

Los metodos utilizados para la determinación de la actividad enzimatica de la CAT, AchE y GAD en el vestíbulo de la rana se describen detalladamente en el artículo de Brain Research para las dos primeras y en el artículo de Neuroscience el de la GAD.



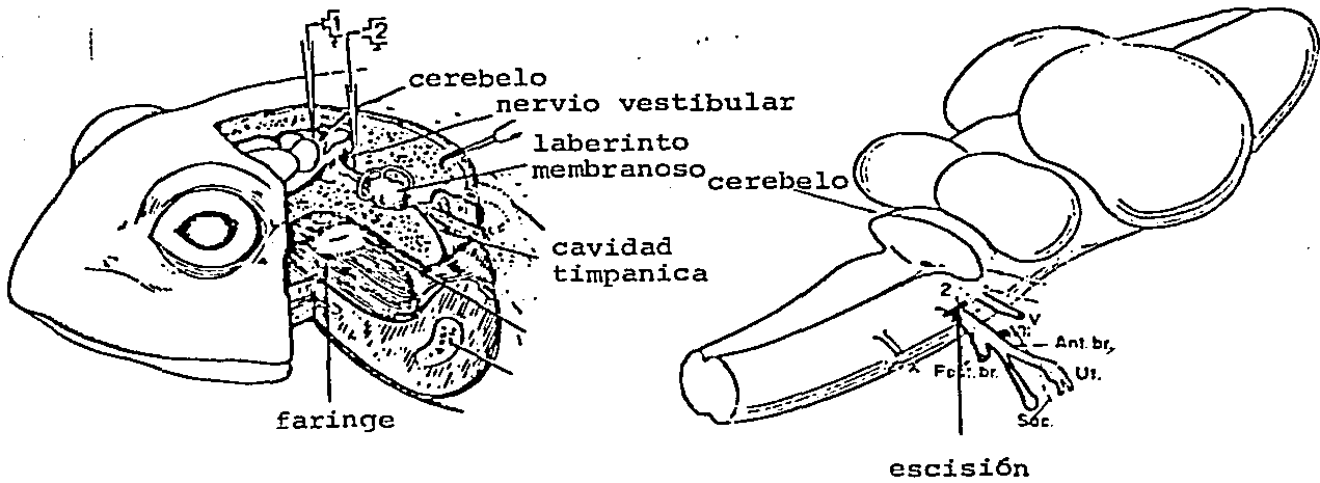


Fig.12 Dibujo que representa la localización del vestíbulo en el cráneo de la rana y el lugar en donde se escinde el octavo nervio craneal .

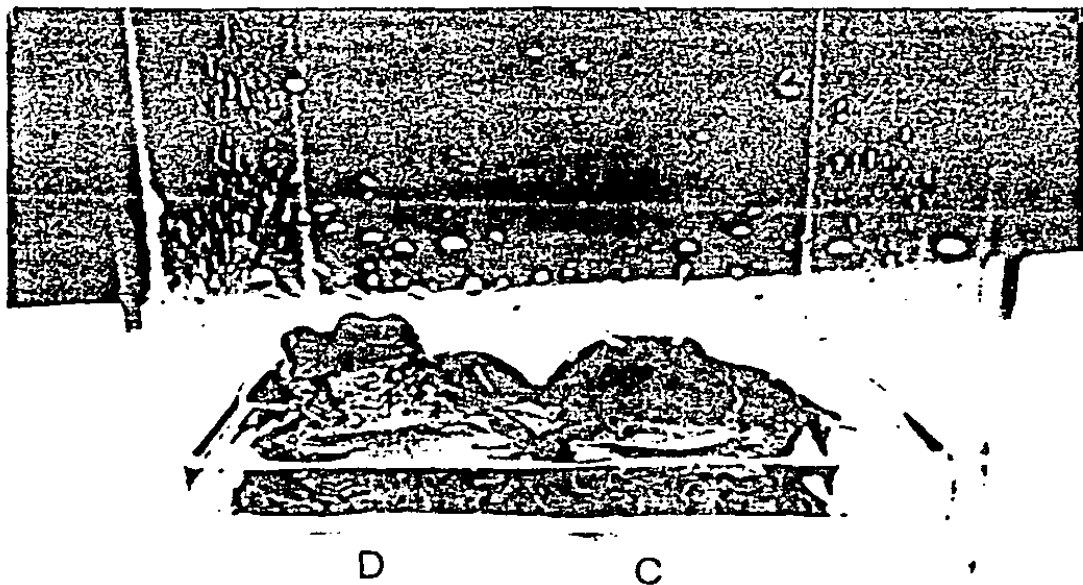


Fig.13 Fotografía que muestra una rana deferentada(D) y una rana control (C). En la primera se observa una inclinación del lado en que se escindió el octavo nervio.

## RESULTADOS Y DISCUSION

## Sistema de la acetilcolina

Se encontró actividad de la CAT en homogenados de vestíbulo de rana con una actividad específica de 9.44 picomoles de acetilcolina sintetizada/mg de proteína/minuto.

Cuando se compara esta actividad, con la de su enzima homóloga en la retina y el SNC de la rana se ve que es del mismo orden de magnitud i.e. pmoles que los reportados por otros autores (Tabla I). Estos valores son considerablemente diferentes a los obtenidos en otras especies de vertebrados, i.e. la actividad de la CAT en el vestíbulo del pollo es de 970 pmoles de acetilcolina/min/mg de proteína (109), la del cuy es de 450 pmoles de Ach/min/mg de proteína (en vestíbulo) (88).

En retina de cuy es de 920 pmoles/min/mg de proteína (67) y en retina de rata de 680 Pmoles/min/mg de proteína (97) mientras que en sistema nervioso por ej. en pollo es de 830 pmoles de Ach/min/mg de proteína.

Se realizó una curva de actividad de la CAT medida con concentraciones crecientes de proteína para lo cual se utilizaron homogenados del vestíbulo de la rana aumentando la cantidad de éstos para tener una concentración de proteína desde 0.2 mg por tubo hasta 0.8 mg. Como puede verse en la figura 1 de B.Res. la actividad de la CAT aumenta en forma directa a la concentración de proteína, manteniendo constante la actividad específica.

Cuando se midió la actividad de la CAT a diferentes intervalos de tiempo de incubación, ésta se incrementó proporcionalmente con el tiempo hasta 60 minutos, por lo que nuestros experimentos realizados a 15 minutos de incubación se encuentran en la parte lineal de la reacción (fig. 2 de B.Res.).

Se realizó también una curva de actividad de la CAT contra diferentes concentraciones del detergente Tritón X-100 y se observó que a una concentración de 0.33% en el medio de ensayo se obtuvo la actividad óptima. El efecto del Tritón X-100 sobre la CAT fue estudiado por Fonnum y Benishin (55,10) los cuales encontraron que este agente era necesario para la determinación de la actividad de la CAT ya que esta enzima se encuentra presente en el cerebro

Tabla 1. Actividad de la colin acetiltransferasa en el SNC y el vestíbulo de la rana .

REGION	Pmoles de acetilcolina sintetizada/min/mg de protefina
Vestíbulo °	9.44
Telencefalo *	16.00
Diencefalo *	25.00
Tallo cerebral *	23.00
Cerebro completo*	32.00
Cerebro completo °	28.00
Retina +	30.00

\* Wachtler, K (1981). The regional distribution of acetylcholine choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in vertebrate brains of different phylogenetic levels. In Cholinergic mechanism (Pepeu, G., ed) pp 54-71. Plenum Press, New York.

+Lam, D.M.K (1975)

° Nuestro trabajo

unida a membranas, para lo cual debe liberarse. Aunque la concentración del detergente usado para su máxima liberación fue de 0.33% en lugar de 0.5%, se puede decir que la CAT en el vestíbulo de rana necesita ser liberada para su determinación (fig 3 de B.R.).

Al medir la actividad de la CAT a diferentes pHs, que van desde 5.7 a 8.2 encontramos una curva típica de actividad dependiente del pH y se ve que la enzima tiene mayor actividad a un pH de 7.4 por lo que se considera su pH óptimo (fig.4 de B.R.) este valor cae dentro del rango para la enzima de cerebro de rata (7.2), cerebro de ratón (7.5) y cerebro de res (7.5) (56,99,65).

La actividad de la CAT en el sistema nervioso es altamente sensible a fosfatos y extremadamente dependiente de la presencia del ión cloruro en el medio (57,128) (Tabla I de B.R.). Cuando se examinaron estas propiedades en la CAT del vestíbulo de la rana se encontró que son idénticas a las descritas para la CAT en crestas aisladas del oído interno del pollo (i.e. es inhibida por el ión fosfato 66% y disminuye un 77% cuando se utilizó citrato en lugar del ión cloruro) (109) y en tejido nervioso (74, ,128).

En relación a la AchE, enzima esencial en el sistema nervioso la cual degrada rápidamente a la Ach liberada de la presinapsis, se encuentra presente en una fracción membranal cruda del laberinto de la rana con un valor de 270 nmoles/min/mg de proteína, comparable a la de la AchE del sistema nervioso de rana y en crestas aisladas del oído interno del pollo (174 nmoles/min/mg de proteína en la médula oblongada y 312 nmoles/min/mg de proteína en el oído interno del pollo) (103,151).

La AchE es inhibida de una manera reversible y específica por la eserina tanto in vivo como in vitro (8,22). En nuestro trabajo encontramos que la AchE de vestíbulo es sensible a este agente y la  $K_i$  aparente obtenida en nuestra fracción membranal es similar a la obtenida en otras preparaciones i.e.  $K_i$  del órgano eléctrico 2.5  $\mu$ M y 7  $\mu$ M en nuestra preparación (fig 5 de B.R. tabla 2.).

Para distinguir la actividad de la AchE de colinesterasas no específicas se ha utilizado la sensibilidad de éstas a la Iso-Ompa (inhibidor irreversible de las colinesterasas inespecíficas) (1,28,96). Cuando medimos la actividad de la AchE vestibular en presencia de Iso-Ompa esta actividad no mostró inhibición alguna

(tabla 2 de B.R.) lo que nos indica que la hidrólisis de la Ach es mediada principalmente por la AchE específica existente en nuestra fracción.

En virtud de que clásicamente, la ubicación de la CAT ha sido descrita en terminales colinérgicas (71,72,73) y la AchE básicamente en la membrana sináptica de la célula colinoceptiva (sensible a Ach) aunque más recientemente en otras membranas intracelulares (24,72) y con otras funciones (25,68,101), se puede concluir que en el vestíbulo aislado de la rana existen terminales colinérgicas y células sensibles a la Ach, lo que se apoya también por estudios histoquímicos en el vestíbulo de varias especies de vertebrados en los cuales se encuentra un precipitado de la reacción para detectar a la AchE, aún a nivel de microscopía electrónica como es en el laberinto de la chinchilla en la cual se ve la reacción en la pared de la membrana plasmática de las terminales eferentes que contactan las células pilosas Tipo I y II. Por lo que la actividad de la AchE encontrada en la porción sensorial parece ser una propiedad de los elementos eferentes.

En conclusión, el hallazgo de la CAT y la AchE en el vestíbulo de la rana con propiedades similares a las de las enzimas del sistema nervioso es importante para entender la neurotransmisión colinérgica eferente en el órgano estato-acústico de los vertebrados, lo que no es posible dilucidar es la localización celular de estas actividades.

#### SISTEMA DEL GABA

Se encontró actividad de la GAD en un homogenado del vestíbulo de la rana con una actividad específica de 3.76 nmoles de ácido glutámico descarboxilado /hr/mg de proteína y como puede verse en la tabla 2, es del mismo orden de magnitud que el reportado en la GAD de varias partes del tejido nervioso de la rana (137,159). Este resultado nos permite postular la existencia en el tejido de estudio de la enzima sintetizante del GABA, la cual se ha considerado un buen marcador de células GABAérgicas ya que su presencia se ha demostrado en neuronas GABAérgicas (124) y su actividad puede reflejar sitios de liberación de GABA (66,111,142). Recientes investigaciones de las propiedades de la GAD en tejido vestibular nos permiten concluir que la GAD puede ser similar a

la presente en el tejido nervioso y por lo tanto ser usada para propósitos de síntesis(104).

Reportes recientes dan evidencias de que la GAD puede tener un papel en la transaminación mediada por glutamato y por esto tener un papel de inactivación de este aminoácido. Esto es poco probable ya que este reporte se realizó en la enzima purificada lo que no refleja condiciones "in vivo"(119), aun más, el mecanismo de inactivación del glutamato es por un sitio de captación de alta afinidad(27).

Las evidencias bioquímicas reunidas en este trabajo tanto para la Ach como para el GABA, como las descritas en otros vertebrados podrían tomarse como indicio de que estos dos neurotransmisores podrían estar actuando como tales en el vestíbulo de la rana. Aunque el tipo de experimentos descritos anteriormente no nos permite señalar a la población celular en la que están localizadas estas actividades enzimáticas y para tratar de averiguar la ubicación celular de la CAT y la GAD se utilizó el modelo de la denervación.

#### LOCALIZACION CELULAR DE LA SINTESIS DE GABA Y ACETILCOLINA: MODELO DE LA DENERVACION

Durante mucho tiempo se han utilizado los experimentos de degeneración nerviosa para mapear vías de células nerviosas en el SNC.

Estos experimentos se basan en el hecho de que la terminal nerviosa degenerará después de la transección de su axón o la introducción de una lesión en el cuerpo neuronal de la célula. Por microscopía electrónica se puede reconocerlos daños, esto es, los botones presinápticos degenerados, con aparición de cuerpos electrodensos, citolisosomas axónicos y órganos desintegrados, difícilmente reconocibles en el botón(117).

En la rana existen reportes que muestran que la escisión del octavo nervio dan como resultado una degeneración Walleriana de las fibras eferentes y una degeneración sináptica eferente (78,123). Por lo que la estrategia utilizada para el vestíbulo de la rana fue la de investigar la actividad de las enzimas de síntesis de Ach y GABA en homogenados de vestibulos de ranas a las cuales se les escindió el nervio vestibular derecho y dejando el nervio del lado izquierdo intacto como control, y posteriormente

Tabla 2. Actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico en el vestíbulo y el SNC de la rana.

REGION	nmoles de ác. glutámico des-carboxilado/hr/mg de proteína
Vestíbulo °	3.76
Tallo cerebral *	1.23
Cerebro medio *	2.00
Tectum óptico *	2.43
Retina +	0.91

\* Yates, R.A and Taberner, P.V. (1975), Glutamic acid, GABA and their metabolizing enzymes in the frog central nervous system. Brain Res, 84, 399-407.

+ Starr, M.S. (1973) Effect of dark adaptation in the GABA system in retina. Brain Res, 59, 331-338.

(Valores calculados asumiendo un contenido de 10% de proteína y 90% de agua en el tejido).

° Nuestro trabajo.



se extrajeron los vestíbulos de ambos lados a diferentes tiempos después de la denervación (desde 3 hasta 42 días), para la determinación de la actividad de la CAT y la GAD en homogenados de este tejido (ver procedimiento de la denervación pag. 27).

Hallazgos morfológicos: como puede verse en la figura 14a en el vestíbulo del lado izquierdo del animal deferentado, no se observaron alteraciones estructurales en el área de las células pilosas.

En la figura 14b se observan las fibras del nervio vestibular mostrando sus características normales mientras que en el vestíbulo del lado derecho denervado, en la figura 15a no se observan alteraciones a nivel del epitelio, y en la figura 15b se observan alteraciones (degeneración Walleriana) en las fibras del nervio vestibular derecho como resultado de la operación.

Estos resultados nos indican que al menos en los animales con 15 días después de la denervación, el nervio vestibular y la porción receptora del lado izquierdo (control) no sufren alteraciones con la cirugía, mientras que en el nervio del lado derecho (denervado) se provocó una degeneración walleriana y que aparentemente la porción receptora no se alteró.

A los 3, 7, 15, 21 y 42 días después de la operación, las ranas fueron decapitadas y los vestíbulos del lado derecho e izquierdo (denervado y control) se extrajeron como se describió anteriormente y se realizaron homogenados de cada uno de estos para la determinación de la actividad de la CAT y la GAD.

Los hallazgos bioquímicos de la CAT y la GAD fueron los siguientes:

En el vestíbulo derecho de las ranas denervadas, la actividad de la CAT muestra una caída dramática desde el 3er día después de la denervación (9.26 pmoles de Ach sintetizada/min/mg de proteína en el control, hasta 3.94 pmoles de Ach sintetizada/min/mg de proteína en el lado operado, 57% de disminución) y un decremento hasta un 12% del valor control (9.77 pmoles de Ach sintetizada/min/mg de proteína y 1.18 pmoles de Ach sintetizada/min/mg de proteína en el lado izquierdo y derecho respectivamente, 88% de disminución) en el día 42 después de la denervación (Tabla I de Neurosc.).

La CAT es transportada por un flujo axoplásmico lento (58), por lo que se ve una desaparición inicial del 50% a los 3 días después

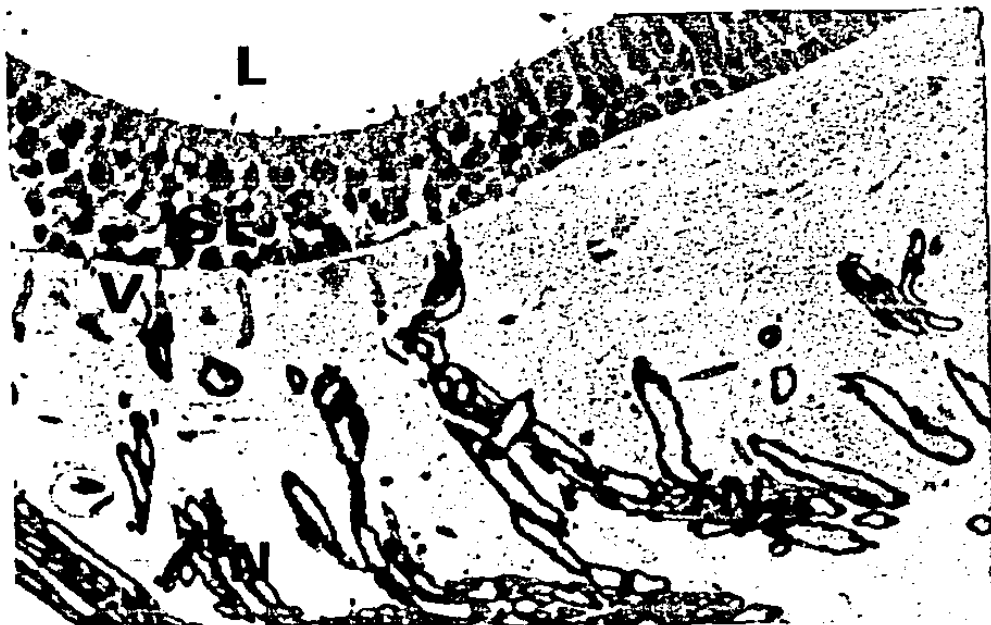


Fig 14a. Control. No se observaron alteraciones estructurales en el área de las células pilosas y el tronco del nervio vestibular del vestíbulo no denervado de ranas operadas.

L= luz del canal semicircular, V= porción amielínica de las fibras del nervio vestibular debajo del epitelio sensorial (SE), N= nervio vestibular ( azul de toluidina 370 X).



Fig. 14b. Control. Fibras del nervio vestibular mostrando sus características normales(N) (azul de toluidina 1280X).



Fig 15a. Denervado. No se observaron alteraciones estructurales en el epitelio sensorial (SE) del vestíbulo denervado de ranas operadas. V= porción amielínica de las fibras nerviosas vestibulares del epitelio sensorial. N= fibras nerviosas vestibulares (azul de toluidina 420X).



Fig. 15b Denervado. Degeneración Walleriana como resultado de la operación en varias fibras del nervio vestibular (N) (azul de toluidina 1100 X).

de la denervación. Una desaparición casi completa de las terminales eferentes nos explica la caída del 88% de la actividad al día 42 después de la operación, lo que nos sugiere la localización de la CAT en las terminales nerviosas, en este caso las conexiones eferentes. Sin embargo, no se observó una desaparición total de la actividad de la CAT como se podría esperar, aunque se han reportado hallazgos similares en ratas a las cuales se escinde el séptimo nervio (facial) (83) y no se observa una desaparición total de la actividad de la CAT en las terminales nerviosas eferentes colinérgicas. La razón de estos dos hallazgos es hasta el momento desconocida.

En contraste la actividad de la GAD fue de la misma magnitud en el lado operado y el control desde el día 3 después de la denervación (3.77 nmoles de ácido glutámico descarboxilado/hr/mg de proteína en el control y 3.74 nmoles de ácido glu. descarboxilado/hr/mg de proteína) y permaneció constante hasta el día 42 después de la operación (3.89 nmoles de ac. glu. descarboxilado/hr/mg de proteína en el control y 3.94 nmoles de ácido. glu. descarboxilado/hr/mg de proteína, denervado) (Tabla I de Neuroscience).

Esto nos sugiere que la GAD debe localizarse en un elemento celular (o compartimento) el cual no sufre ninguna alteración con la cirugía y que podría ser la célula pilosa.

Los resultados obtenidos con el modelo de la denervación nos permiten postular una localización de la CAT en las terminales eferentes y que la GAD pudiera estar confinada a un elemento o tipo celular del epitelio sensorial posiblemente la célula pilosa.

Estos hallazgos también se han corroborado por estudios ontogénicos (89, 108), en crestas vestibulares asiladas del pollo y del cuy. En estos experimentos la GAD aparece muy temprano en el desarrollo cuando la célula pilosa está ya madura, mientras que la CAT se ha detectado sólo cuando los botones eferentes llegan al epitelio para contactar las células pilosas.

También en experimentos en los cuales, vestíbulos aislados de cuyes tratados con estreptomycin (en los cuales se observa una degeneración de las células pilosas y ninguna alteración de los botones eferentes) pierden la actividad de la GAD a los largo del tratamiento y no muestran ninguna modificación en la actividad

de la CAT, tienden a apoyar la anterior suposición(88).

#### CONCLUSIONES

Por los resultados presentados an este trabajo es evidente que en el vestíbulo de la rana existe actividad de la colinacetiltransferasa y de la descarboxilasa del ácido glutámico enzimas de síntesis de Ach y GABA, con una magnitud de 9.44 pmoles de Ach sintetizada/min/mg de proteína y 3.76 nmoles de ácido glutámico descarboxilado/hr/mg de proteína respectivamente, lo que apoya el posible papel de estas sustancias como neurotransmisores en este sistema.

Adicionalmente la detección de la actividad de la acetilcolinesterasa con una magnitud de 270 nmoles de acetilcolina hidrolizada/min/mg de proteína nos indica que el mecanismo de inactivación de la Ach está presente.

Los valores obtenidos para las actividades de estas tres enzimas al compararlas con sus homologas en el sistema nervioso central y periférico, son similares en actividad específica.

En el caso de la CAT y la AchE se encontraron características similares(i.e. CAT: concentración de proteína, concentración de Tritón X-100, tiempo de incubación, pH, sensibilidad a los iones fosfato y cloruro, para la AchE: inhibición por eserina e insensibilidad por Iso-Ompa) a las del sistema nervioso de otras especies lo cual es importante para entender la neurotransmisión eferente en el sistema estado-acústico.

En cuanto a la localización celular de la CAT y la GAD se encontró que la escisión del octavo nervio vestibular derecho resultó en un decremento gradual de la actividad específica de la CAT hasta casi una completa desaparición(88% con respecto al vestíbulo control, el izquierdo), mientras que la actividad específica de la GAD no se modificó ni en el control ni en el denervado.

Estos resultados aunque indirectos corroboran los reportes en los cuales la Ach ha sido reportada como uno de los transmisores eferentes en la periferia sensorial de los vertebrados y apoyan también la idea de que el GABA es un candidato a transmisor aferente en este sistema.

Aunque como se ve, el problema de una localización más directa de la célula de origen de los parámetros referentes a la Ach y al GABA continúan sin resolver, utilizando técnicas como la inmunocitoquímica, podremos estudiar su localización utilizando anticuerpos contra la CAT, la GAD y anticuerpos contra la Ach y el GABA para llegar a una localización más precisa en el epitelio sensorial vestibular, lo que nos aportará más evidencias en relación a la participación de la Ach y el GABA como neurotransmisores en este sistema.



## R E F E R E N C I A S

- 1.- Aldridge, W.N. (1953) The differentiation of true and pseudo-cholinesterase by organophosphorus compounds. *Biochem. J.* 53, 62-67.
- 2.- Altschuler, R.A. and Fex, J. (1986) Efferent neurotransmitters. In *Neurobiology of Hearing: The Cochlea*. Altschuler, R.A., Hoffman, D.W. and Bobbin, R.P. (Eds.) Raven Press, New York. pp 383-396.
- 3.- Altschuler, R.A., Kachar, B., Rubio, J.A., Parakkal, M.H. and Fex, J. (1985) Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in guinea pig cochlea. *Brain Res.* 338, 1-11.
- 4.- Altschuler, R.A., Parakkal, M.H., Rubio, J.A., Hoffman, D.W. and Fex, J. (1984) Enkephalin like immunoreactivity in the guinea pig organ of Corti; ultrastructural and lesion studies. *Hearing Res.* 16, 17-31.
- 5.- Altschuler, R.A., Parakkal, M.H. and Eckenstein, F. (1984) Co-localization of enkephalin like and choline acetyltransferase immunoreactivities in olivocochlear neurons of the guinea pig. *J. Histochem. Cytochem.* 32, 839-843.
- 6.- Altschuler, R.A., Wenthold, R.J., Schwartz, A.M., Haser, W.G., Curthoys, NP. and Parakkal, M.H. (1984) Immunocytochemical localization of glutaminase like immunoreactivity in the auditory nerve. *Brain Res.* 291, 173-178.
- 7.- Annoni, J., Cochran, S., and Precht, W. (1984) Pharmacology of the vestibular hair cell-afferent fiber synapse in the frog. *J. Neurosc.* 4, 2106-2116.
- 8.- Augustinsson, K.B., and Nachmansohn, D. (1949) Studies on cholinesterase VI. Kinetics of the inhibition of acetylcholine esterase. *J. Biol. Chem.* 179, 543-549.
- 9.- Bagger-Sjoberg, D., and Gulley, R.L. (1979) Synaptic structures in the Type II hair cell in the vestibular system of the guinea pig. *Acta Otolaryngol.* 88, 401-411.
- 10.- Benishin, C.G., and Carrol, P.T. (1982) A comparison of soluble and membrane bound forms of choline-o-acetyltransferase in mouse brain nerve endings. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 25, 343-345.
- 11.- Bernard, C., Cochran, S.L. and Precht, W. (1985) Presynaptic actions of cholinergic agents upon the hair cell-afferent fiber synapse in the vestibular labyrinth of the frog. *Brain Res.* 338, 225-236.

- 12.- Bledsoe, S.C., Chial, D.M., Bobbin, R.P. and Morgan, D.N. (1983) Comparative actions of glutamate and related substances on the lateral line *Xenopus leavis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 75c, 199-206.
- 13.- Bledsoe, S.C., Meyer, J.R., and Howland, M. (1985) Potassium induced, calcium dependent release of endogenous amino acid from the *Xenopus* lateral line of *Xenopus leavis*. *Association for Research in Otolaryngology*. Abs 8, 111.
- 14.- Bobbin, R.P., and Konishi, T. (1974) Action of cholinergic and anticholinergic drugs at the crossed olivo-cochlear bundle-hair cell junction. *Acta Otolaryngol.* 77, 56-65.
- 15.- Bobbin, R.P. (1979) Glutamate and aspartate mimic the afferent transmitter in the cochlea. *Exp. Brain Res.* 34, 389-393.
- 16.- Bobbin, R.P., Bledsoe, S.C., and Jenisson, G.L. (1984) Neurotransmitter of the cochlea and lateral line organ. In *Hearing Sciences; recent advances*. Berlin, C.I. (Ed.). College Hill Press, San Diego, CA. pp 159-180.
- 17.- Bobbin, R.P., Bledsoe, S.C., Winbery, S., Ceasar, G., and Jenishon, G.L. (1985) Comparative actions of GABA and acetylcholine on the *Xenopus leavis* lateral line. *Comp. Biochem. Physiol.* 80c, 313-318.
- 18.- Bobbin, R.P. and Konishi, T. (1971) Acetylcholine mimics COCB stimulation. *Nature*, 231, 222-223.
- 19.- Bobbin, R.P., and Thompson, M.H. (1978) Effects of putative transmitter on afferent cochlear transmission. *Annals of Otol. Laryngol.* 87, 185-190.
- 20.- Brunneti, F., Rossi, G., Voena, G., Buongiovanni, S., and Cortesina, G.L. (1963) L' action locale de substance anticholinestérasiques sur la fonction vestibulaire. *Acta Otolaryngol.* 57, 285-290.
- 21.- Buddeli, R., and Macadar, O. (1979) Statoacoustic properties of utricular afferent. *J. Neurophysiol.* 42, 1479.
- 22.- Bullock, T.H., Nachmansohn, D., and Rothenberg, M.A. (1946) Effect of inhibitors of cholinesterase on the nerve action potential. *J. Neurophysiol.* 9, 9-22.
- 23.- Caston, J., and Rousell, H. (1984) Curare and the efferent vestibular system. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 97, 19-26.
- 24.- Cheney, D.L., Racagni, G., and Costa, E. (1976) Appendix II: distribution of acetylcholine and choline acetyltransferase in specific nuclei and tract of rat brain. In A. Goldberg. and I. Hanin (Eds.). *Biology of cholinergic function*. Raven Press New York pp. 655-659.

- 25.- Chubb, I.W., Hodgson, A.J. and White, G.H. (1980) Acetylcholinesterase hydrolyses substance P. *neuroscience*. 5, 2065-2072.
- 26.- Comis, S.D. and Leng, G. (1979) Action of putative neurotransmitters in the guinea pig cochlea. *Exp. Brain Res.* 36, 119-128.
- 27.- Cotman, C.W. and Hamberger, A. (1978) Glutamate as a CNS neurotransmitter. Properties of release, inactivation and biosynthesis. In *Amino acids as neurotransmitters* (Fonnum, F., ed) pp 379-412. Raven Press, N.Y.
- 28.- Davis, R., Koelle, G., and Sanville, U.J. (1984) Electron microscope localization of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the ciliary ganglion of the cat. *J. Histochem. and Cytochem.* 32, 849-861.
- 29.- Dechesne, C., Raymond, J., and Sans, A. (1984) Action of glutamate in the cat labyrinth. *Annals of Oto-rhino-laryngol.* 93, 163-165.
- 30.- Dohlman, G.F. (1960) Histochemical studies of vestibular mechanism. In *Neural mechanisms of the auditory and vestibular system* (eds. Rasmussen, G.L. and Windle, W.F.) pp 258-275. Springfield Ill. Charles, C. Thomas.
- 31.- Dohlman, G.F. (1965) *Neural mechanism of the auditory and vestibular system*. Springfield, Thomas.
- 32.- Drenckhahn, D., Schafer, T., and Prinz, M. (1985) Actin, myosin, and associated proteins in the vertebrate auditory and vestibular organs: immunocytochemical and biochemical studies. Chapter 18. In *Auditory Biochemistry*. D. Drescher (Ed.) Thomas, Springfield, Ill. pp 317-335.
- 33.- Drescher, M.S., Drescher, D.G. and Medina, J. (1983) effect of sound stimulation at several levels on concentrations of primary amines including neurotransmitter candidates, in perilymp of the guinea pig inner ear. *J. Neurochem.* 41, 309-320.
- 34.- Drescher, D.G. and Drescher, M.J. (1985) HPLC analysis of presumptive neurotransmitter in perilymp. In *Auditory Biochemistry*, Drescher, D.G. (Ed.) Charles, C. Thomas, Springfield Ill. pp 50-67.
- 35.- Ehrenberger, K., Benkoe, E., and Felix, D. (1982) Suppressive action of picrotoxin, a GABA antagonist on labyrinthine spontaneous nystagmus and vertigo in man. *Acta Otolaryngol.* 93, 269-273.
- 36.- Engstrom, H. (1958) On the double innervation of the sensory epithelia on the inner ear. *Acta Otolaryngol.* 49, 100-118.
- 37.- Eybalin, M., Abou-Madi, L., Rossier, J., and Pujol, R. (1985) Electron microscopic localization of N-terminal proenkephalin (synenkephalin) immunostaining in the guinea pig organ of Corti. *Brain Res.* 358, 354-359.

- 38.- Eybalin, M., Cupo, A., and Pujol, R. (1983) Localisation ultra-structurale des immunoreactions a un anticorps met-enkephaline dans l'organe de Corti. C.R.C. Acad. Sci. (Paris) Serie III, 296, 1125-1128.
- 39.- Eybalin, M., Cupo, A., and Pujol, R. (1984) Met-enkephalin characterization in the cochlea; high performance liquid chromatography and immunoelectron microscopy. Brain Res. 305, 313-322.
- 40.- Eybalin, M., Cupo, A., and Pujol, R. (1985) Met-enkephalin-arg<sup>6</sup>-gly<sup>7</sup>-leu<sup>8</sup> in the organ of Corti; high performance liquid chromatography and immunoelectron microscopy. Brain Res. 331, 389-395.
- 41.- Eybalin, M., and Pujol, R. (1983) A radioautographic study of <sup>3</sup>H-glutamate and <sup>3</sup>H-glutamine uptake in the guinea pig cochlea. Neuroscience 2, 863-871.
- 42.- Eybalin, M., and Pujol, R. (1984) Immunofluorescence with met-enkephalin and leu-enkephalin antibodies in the guinea pig cochlea. Hearing Res. 13, 135-140.
- 43.- Eybalin, M., and Pujol, R. (1986) Choline acetyltransferase (ChAT) immunoelectron microscopy distinguishes at least three types of efferent synapses in the organ of Corti. Exp. Brain Res. in Press.
- 44.- Felix, D., and Ehrenberger, K. (1985) The action of putative neurotransmitter substances in the mammalian labyrinth. In Auditory Biochemistry. Drescher, D.G. (Ed.). Charles, C. Thomas., Springfield, Ill, pp 68-79.
- 45.- Felix, D., and Ehrenberger, K. (1982) The action of putative neurotransmitter substance in the cat labyrinth. acta Otolaryngol. 93, 101-105.
- 46.- Fex, J., and Altschuler, R.A. (1981) Enkephalin-like immunoreactivity of olivo-cochlear nerve fibers in cochlea of guinea pig and cat. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 78, 1255-1259.
- 47.- Fex, J., and Altschuler, R.A. (1985) Immunocytochemistry of the mammalian cochlea: results and expectations. In Auditory Biochemistry Drescher, D.G. (Ed.) Charles, C. Thomas, Springfield, Ill, pp 5-30.
- 48.- Fex, J., and Alstchuler, R.A., Kachar, B., Wenthold, R.J. and Zempel, J. (1986) GABA visualized by immunocytochemistry in the guinea pig cochlea in axons and endings of efferent neurons. Brain Res. 366, 106-107.
- 49.- Fex, J. and Altschuler, R.A. (1986) Neurotransmitter related immunocytochemistry of the organ of Corti. Hearing Res. 22, 249-263.
- 50.- Fex, J., Alstchuler, R.A., Wenthold, J., and Parakkal, M.H. (1982)

- Aspartate aminotransferase immunoreactivity in cochlea of guinea pig. *Hearing Res.* 7, 149-160.
- 51.- Fex, J., Kachar, B., Rubio, J.A., Parakkal, M.H., and Altschuler, R.A. (1985) Glutaminase like immunoreactivity in the organ of Corti of Guinea pig. *Hearing Res.* 17, 111-113.
- 52.- Fex, J., and Wenthold, J. (1976) Cholin acetyltransferase, glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase in the cochlea and cochlear nucleus of the guinea pig. *Brain Res.* 109, 575-585.
- 53.- Flock, A. (1967) Ultrastructure and function in the lateral line organs. In *lateral line receptors*, P. Coehn (Ed.) Indiana Univ. Press. Bloomington, In. pp 163-197.
- 54.- Flock, A., and Lam, D. (1974) Neurotransmitter synthesis in inner ear and lateral line sense organs. *Nature (London)* 249, 142-144.
- 55.- Fonnum, F. (1966) A radiochemical method for the estimation of choline acetyltransferase. *Biochem. J.* 100, 479-484.
- 56.- Fonnum, F. (1968) Choline acetyltransferase binding to and release from membranes. *Biochem. J.* 109, 389-398.
- 57.- Fonnum, F. (1969) Radiochemical micro assays for the determination of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities.
- 58.- Frizel, M., and Sjöstrand, J. (1974) Transport of proteins and cholinergic enzymes in regenerating hypoglossal neurons. *J. Neurochem.* 22, 845-850.
- 59.- Furness, D.N. and Hackney, C.M. (1985) Cross-links between stereocilia in the guinea pig cochlea. *Hearing Res.* 18, 177-188.
- 60.- Furukawa, T., and Ishii, Y., (1967) Neurophysiological studies on hearing in goldfish. *J. Neurophysiol.* 30, 1377.
- 61.- Furukawa, T., Ishii, Y., and Matsuura, S. (1972) Synaptic delay and time course of the postsynaptic potential at the junction between hair cells and eight nerve fibers in the goldfish. *Jap. J. Physiol.* 22, 617-635.
- 62.- Gacek, R.R., Nomura, Y., and Balogh, K. (1965) Acetylcholinesterase activity in the efferent fibers of the statoacoustic nerve. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 59, 541-553.
- 63.- Gacek, R.R. (1974) Morphological aspects of the efferent vestibular system. In *Handbook of Sensory Physiology*. H.H. Kornhuber (Ed.) Springer Verlag, Heidelberg, N.Y. Vol 16, pp 213-220.
- 64.- Gleissner, L., and Henriksson, N.G. (1963) Efferent and afferent activity pattern in the vestibular nerve of the frog. *Acta Otolaryngol.* 58 (Supp 2) 90-103.

- 65.- Glover, V., and Potter, L. (1971) Purification and properties of choline acetyltransferase from ox brain striate nuclei. *J. Neurochem.* 18, 571-580.
- 66.- Gold, B. I. and Roth, R. H. (1979) Glutamate decarboxylase activity in striatal slice: characterization of the increase following depolarization. *J. Neurochem.* 32, 883-888.
- 67.- Graham, L. T. (1974) Comparative aspects of neurotransmitters in the retina. In *The eye*, vol 6 (edited by Davson, H., and Graham, L. T.) pp 283-342. *Ac. Press. New York and London.*
- 68.- Greenfield, S. (1984) Acetylcholinesterase may have a novel function in the brain. *TINS.* 7, 364-368.
- 69.- Guth, P. S., Norris, C. H., Guth, S. L. Quine, D. B. and Williams, H. (1986) Cholinomimetics mimics efferent effects on semicircular canal afferent activity in the frog. *Acta Otolaryngol.* 102, 194-203.
- 70.- Guth, S. L. and Norris, C. H. (1984) Pharmacology of the isolated semicircular canal: effect of GABA and picrotoxin. *Exp. Brain Res.* 56, 72-78.
- 71.- Hebb, C. O. (1963) Formation, storage and liberation of acetylcholine In G. B. Koelle (Ed.) *Handbuch der experimentellen Pharmacologie*, vol 15 Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. pp 55-88.
- 72.- Hebb, C. O., and Silver, A. (1956) Choline acetylase in the central nervous system of man and some other mammals. *J. Physiol., Lond.* 134 718-728.
- 73.- Hebb, C. O., and Whitaker, V. P., (1958) Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase. *J. Physiol. (Lond)* 142, 187-196.
- 74.- Hersh, L. B. (1980) Studies on the kinetic mechanism and salt activation of bovine brain choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* 34, 1077-1081.
- 75.- Higuchi, T., Umekita, S. H., and Obara, S. (1980) The afferent neurotransmitter in the ampullary electroreceptors; L-glutamate mimics the natural transmitter. *Neurosc. Lett. Suppl.* 4, s7.
- 76.- Hilding, D., and Wersall, J. (1962) Cholinesterase and its relation to the nerve endings in the inner ear. *Acta Otolaryngol.* 55, 205-217.
- 77.- Hillman, D. E. (1976) Vestibular and lateral line system. In *Frog Neurobiology*. Chap 14, Llinas, R., and Precht, W. (eds). Springer-Verlag, Heidelberg, New York. pp 452-479.
- 78.- Hillman, D. E. (1969) Light and electron microscopical study of the relationships between the cerebellum and the vestibular organ of the frog. *Exp. Brain Res.* 9, 1-15.

- 79.- Hoffman,D.W.(1986) Opioid mechanism in the inner ear.In Neurobiology of Hearing; the cochlea.Altshuler,R.A.,Hoffman,D.W. and Bobbin,R.P.(Eds.).Raven Press,New York,371-382.
- 80.- Hoffman,D.W.,Altshuler,R.A. and Fex,J.(1983) High performance liquid chromatographic identification of enkephalin-like peptides in the cochlea .Hearing Res.9,71-78.
- 81.- Hoffman,D.W.Rubio,R.A.and Fex,J.(1984) Several distinct receptor binding enkephalins in olivocochlear fibers and terminals in the organ of Corti.Brain Res.322,59-65.
- 82.- Hoffman,D.W.Zamir,N.,Rubio,J.A.,Altshuler,R.A., and Fex,J.(1985) Proenkephalin and prodynorphin related neuropeptides in the cochlea.Hearing Res. 17,47-50.
- 83.- Hoover,D.B. and Hancock,J.C.(1985) Effect of facial nerve transection on acetylcholinesterase,choline acetyltransferase and <sup>3</sup>H-quinuclidinyl benzilate binding in rat facial nuclei.Neuroscience 15,481-487.
- 84.- Hudspeth,A.J.(1985) The cellular basis of hearing, the biophysics of hair cells.Science,230,745-752.
- 85.- Hudspeth,A.J.(1983) Transduction and tuning by vertebrate hair cells. Trends.Neuroscience,6(9)366-369.
- 86.- Hudspeth,A.J.,and Corey,D.P.(1977)Sensitivity,polarity and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli.Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)2047-2411.
- 87.- Ishii,Y.,Matsuura,S., and Furukawa,T.(1971) Quantal nature of transmission at the synapse between hair cells at the eighth nerve fibers.Jap.J.Physiol.19-79.
- 88.- Iturbe,A.G.,an Meza,G.(1985) Probable localization of GABA and Ach synthesis in the vestibule of streptomycin treated guinea pigs Soc.Neurosc.Abst.11,696.
- 89.- Iturbe,A.G., and Meza,G.(1986) Asymmetrical development of GABA and acetylcholine synthesis in guinea pig vestibule. Int.J.Develop. Neurosc.4(Supp 4)s32.
- 90.- Iurato,S.,Luciano,L.,Pannese,E., and Reale,E.(1971)Histochemical localization of acetylcholinesterase(AchE) activity in the inner ear. Acta Oto-laryngol.,Supp(Stockh.) .279,1-50.
- 91.- Jasser,A.,and Guth,P.(1973) The synthesis of acetylcholine by the olivocochlear bundle.J.Neurochem.44,1845-1853.
- 92.- Jenison,C.L. and Bobbin,R.P. and Thalmann,R,(1985) Potassium

- induced release of endogenous amino acids in the guinea pig cochlea. *J. Neurochem.* 44, 1845-1853.
- 93.- Klinke, R., and Evans, E.F. (1977) Evidence that catecholamines are not the afferent transmitter in the cochlea. *Exp. Brain Res.* 28, 315-324.
- 94.- Klinke, R., and Oertel, W. (1977) Evidence that GABA is not the afferent transmitter in the cochlea. *Exp. Brain Res.* 28, 311-314.
- 95.- Klinke, R., and Oertel, W. (1975) Transmitter physiology of cochlear synapses. *Exp. Brain Res. supp.* 23, 150.
- 96.- Koelle, G.B., Davis, R., Diliberto, E.G., and Koelle, W.A. (1974) Selective, near total irreversible inactivation of peripheral pseudocholinesterase (BuCHE) and acetylcholinesterase (AChE) in cats in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, 23, 175-180.
- 97.- Lam, D.M.K. (1975) Synaptic chemistry of identified cells in the vertebrate retina. *Cold Spring Harbor. SQB.* 50, 571-579.
- 98.- Lowenstein, O., and Wersall, J. (1959) A functional interpretation of electron microscopy structure of the sensory hairs in the cristae sensitivity. *Nature*, 184, 1807.
- 99.- Malthe-Sorensen, D. (1976) Molecular properties of choline acetyltransferase from different species investigated by isoelectric focussing and ion exchange adsorption. *J. Neurochem.* 26, 861-865.
- 100.- Marchi, M., Hoffman, D.W., Giacobini, E., and Fredrickson, T. (1980) Acetyltransferase activities in autonomic ganglia and iris of the chick. *Dev. Neurosc.* 33, 235-247.
- 101.- Marquis, J.K., and Fishman, E.B. (1985) Presynaptic acetylcholinesterase. *Trends in Neuroscience.* 8, 387-388.
- 102.- McGeer, P.L., McGeer, E.G., and Hattori, T. (1978) Kainic acid as a tool in Neurobiology. In *Kainic acid as a tool in Neurobiology.* McGeer, E.G., Olney, J.W., and McGeer, P.L. (Eds.). Raven Press, New York. pp 123-137.
- 103.- Meza, G. (1985) Characterization of GABA-ergic and cholinergic neurotransmission in the chick inner ear. In D.G. Drescher (Ed.) *Auditory Biochemistry.* Charles, C. Thomas, Springfield, Il. pp 80-101.
- 104.- Meza, G. (1984) Some characteristics of glutamic acid decarboxylase of the chick ampullary cristae. *J. Neurochem.* 43, 634-639.
- 105.- Meza, G., Caravez, A., and Ruiz, M. (1982) GABA synthesis in the isolated vestibullary tissue of chick inner ear. *Brain Res.* 241-157-161.
- 106.- Meza, G., Gonzalez, V. and Ruiz, M. (1985) Specific <sup>3</sup>H-gamma-aminobutyric acid binding to vestibular membranes of the chick inner ear.



Brain Res, 337, 179-183.

- 107.- Meza, G., Hernandez, C., and Ruiz, M. (1981)  $^3\text{H}$ -GABA uptake in isolated vestibullary cristae of chick inner ear. Soc. Neurosc. Abst. 7, 147.
- 108.- Meza, G., and Hinojosa, R. (1987) Ontogenetic approach to cellular localization of neurotransmitters in the chick vestibule. Hearing Res, 28, 73-85.
- 109.- Meza, G., Lopez, I., and Ruiz, M. (1984) Possible cholinergic neurotransmission in the cristae ampullares of the chick inner ear. Neuroscience Lett. 49, 93-98.
- 110.- Nakajima, Y., and Wong, D.W. (1974) Morphology of afferent synapses in the hearing goldfish. J. Comp. Neurol. 156, 403-416.
- 111.- Nistico, G., DiGiorgio, R., De Luca, G., and Macaione, S. (1979) Effects of ethanalamine-O-sulfate and gamma-acetylenic-GABA and GABA content, GAD and GABA-T in various areas of chick brain after intraventricular microinjection. J. Neurochem. 33, 343-346.
- 112.- Norris, C.H., and Guth, P.S. (1974) The release of acetylcholine (Ach) by crossed olivo-cochlear bundle (COCB) Acta Otolaryngol. 7, 318-326.
- 113.- Nowak, R., Dorn, A., Bernstein, H.G., Rinne, A., Ziegler, M., and Schlotz H.J. (1986) Immunocytochemical detection of peptides in the guinea pig cochlea. Arch. Otorhinolaryngol. 243, 36-38.
- 114.- Nowak, R., Dorn, A., Bernstein, H.G., Rinne, A., Ziegler, M., and Scholtz, H.J. (1986) Neuropeptides in macula utriculi and macula sacculi of guinea pig labyrinth and immunohistochemical study. Acta Histochem. 78, 219-221.
- 115.- Omori, H. (1987) Gating properties of the mechano-electrical transducer channel in the dissociated vestibular hair cell of the chick. J. Physiol. 387, 589-609.
- 116.- Osborne, M.P. and Thornhill, R.A. (1972) The effect of monoamine depleting drugs upon the synaptic bars in the inner ear of the bullfrog (*Rana catesbiana*) Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 127, 347-355.
- 117.- Palkovits, M., Lerant, C., Jew, J., and Williams, T. (1982) Simultaneous characterization of pre- and postsynaptic neuron contact sites in brain. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 2705-2708.
- 118.- Pickles, J.O., Comis, S.D. and Osborne, M.P. (1984) Cross-link between stereocilia in the guinea pig organ of Corti and their possible relation to sensory transduction. 15, 103-112.

- 119.- Porter, T.G., Spink, C., Martin, S., and Martin, D. (1985) Transaminations catalysed by brain glutamate decarboxylase. *Biochem. J.* 231, 705-712.
- 120.- Precht, W. (1974) Physiological aspects of the efferent vestibular system. In Korhuber, H. (Ed.) *Handbook of sensory physiology. Vol VI/I* Berlin, New York. Springer-Verlag, pp 221-236.
- 121.- Pujol, R., Lenoir, M., Robertson, D., Eybalin, M., and Johnstone, B.M. (1985) Kainic acid selectively alters auditory dendrites connected with cochlear inner hair cells. *Hearing Res.* 18, 145-155.
- 122.- Richrat, W., Kraus, H., Frome, H. (1974) Lokalizaton von  $^3\text{H}$ -aminobuter aure in der coclea. *Arch. Otolaryngol.* 208, 283-284.
- 123.- Robbins, R.C., Backnigh, R.S., and Honrubia, V. (1967) Anatomical distribution of efferent fibers in the VIIIth cranial nerve of the bullfrog (*Rana catesbiana*) *Acta Otolaryngol.* (Stockh) 64, 436-448.
- 124.- Roberts, E. (1978) New directions in GABA research I: immunocytochemical studies of GABA neurons. In *GABA neurotransmitters* (Krogsgaard-L.P. Scheel-Kruger, J., and Kofod, H. eds) pp 28-45 .Munkgaard. Copenhagen.
- 125.- Robertson, D., and Johnstone, B.M. (1978) Efferent transmitter substance in the mammalian cochlea; single neuron support for acetylcholine. *Hearing Res.* 1, 31-34.
- 126.- Rossi, M.L., Valli, P., and Cassela, C. (1977) Postsynaptic potential recorded from efferent nerve fibers of the posterior semicircular canal in the frog. *Brain Res.* 135, 67-75.
- 127.- Rossi, M.L., Prigioni, I., Valli, P., and Casela, C. (1980) Activation of the afferent epsps and spike discharge recorded from single fibers of the posterior nerve. *Brain Res.* 185, 127-137.
- 128.- Rossier, J., Spanditakins, Y., and Benda, P. (1977) The effect of  $\text{Cl}^-$  on choline acetyltransferase kinetic parameters and a proposed roel for  $\text{Cl}^-$  in the regulation of acetylcholine synthesis .*J. Neurochem.* 29, 1007-1012.
- 129.- Russell, I.J. (1971) The pharmacology of efferent synapses in the lateral line system of *Xenopus leavis*. *J. Exp. Biol.* 54, 643-658.
- 130.- Ryan, A.F., and Schwartz, I.R. (1984) Preferential glutamine uptake by cochlear hair cells: implications for the afferent cochlear transmitter. *Brain Res.* 290, 376-379.
- 131.- Schwartz, I.R., and Ryan, A.F. (1983) Differential labelling of sensory cell and neural populations in the organ of Corti following aminoacid incubations. *Hearing Res.* 9, 185-200.

- 132.- Shotwell, S.L., Jacobs, R., and Hudspeth, A.J. (1981) Directional sensitivity of individual vertebrate hair cells to controlled deflection of their hair bundles. *Ann. New York Acad. Sci.* 374, 1-10.
- 133.- Sjostrand, F.S. (1958) Ultrastructure of the retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. *J. Ultrastruc. Res.* 2, 122-124.
- 134.- Smith, C.A., Sjostrand, F.S. (1961) A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea. *J. Ultrastruc. Res.* 5, 184-192.
- 135.- Spöndling, U. (1965) Ultrastructural studies of the labyrinth in squirrel monkeys. In *First Symposium Studies of the role of the vestibular organs in the Exploration of Space*. NASA report. SP-77, 196, Washington, USGPO.
- 136.- Soto, E., and Vega, R. (1987) effects of excitatory amino acids and their analogs on the vestibular primary afferent fibers. *Sometido a Neuroscience*.
- 137.- Starr, M.S. (1973) Effect of dark adaptation in the GABA system in retina. *Brain Res.* 39, 331-338.
- 138.- Steinbach, A.B., and Bennet, M. (1971) Effects of divalent ions and drugs on synaptic transmission in phasic electroreceptors in a morayrid fish. *J. Gen. Physiol.* 58, 580-598.
- 139.- Strutz, J., Spatz, W.B., Schmidt, C.L. and Sturmer, C. (1981) Origin of centrifugal fibers to the labyrinth in the frog (*Rana esculenta*) A study with the fluorescent retrograde neural tracer fast blue. *Brain Res.* 215, 325-326.
- 140.- Tachibana, M., and Kuriyama, K. (1974) Gamma-aminobutyric acid in the lower auditory pathway of the guinea pig. *Brain Res.* 69, 370-374.
- 141.- Tapia, R y Meza-Ruiz, G. (1981) Propiedades bioquímicas de las sinapsis gabaérgicas y colinérgicas. En *temas selectos de Fisiología Celular*. A, Peña, R. Drucker, y R. Tapia Eds. UNAM, México. pp 223-240.
- 142.- Tapia, R., Sandoval, M.E. and Contreras, P. (1975) Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral activity. *J. Neurochem.* 24, 1283-1285.
- 143.- Thompson, G.C., Cortez, A.M. and Igarashi, M. (1986) GABA like immunoreactivity in the squirrel monkey organ of Corti. *Brain Res.* 372, 72-79.
- 144.- Thornhyll, R. (1972) The effect of catecholamine precursor and related drugs on the morphology of the synaptic bars in the vestibular epithelia of the frog. *Rana Temporaria, Comp. Gen. Pharmacol.* 2:89-97.

- 145.- Umekita, S.H., Matsumoto, Y., Abe, T., and Obara, S. (1980) The afferent neurotransmitter in ampullary electroreceptors: stimulus dependent release experiments refute the transmitter role of L-glutamate. *Neurosc. Lett.* 1980, Supp4:s7.
- 146.- Usami, S-I, Igarashi, M., and Thompson, G. (1987) GABA-like immunoreactivity in the chick vestibular end organs. *Brain Res.* 418, 383-387.
- 147.- Usami, S-I, Igarashi, M., and Thompson, G.C (1987) GABA-like immunoreactivity in the squirrel monkey vestibular endorgans. *Brain Res.* 417, 367-370.
- 148.- Valli, P., Costa, J., and Zucca, G. (1984) Local mechanism in vestibular receptor control. *Acta Oto-laryngol.* (Stockh.) .97, 611-618.
- 149.- Valli, P., Zucca, G., Prigioni, I., Botta, L., Casella, C., and Guth, P. (1985) The effect of glutamate on the frog semicircular canal. 330, 1-9.
- 150.- Vega, R., Soto, E., Budelli, R., and Estrada, M.T. (1987) Is GABA an afferent transmitter in the vestibular system ?. *Hearing Res* En prensa.
- 151.- Wächter, K. (1981) The regional distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in vertebrate brains of different phylogenetic levels. In G. Pepeu (Ed.) *Cholinergic mechanisms.* Plenum Press New York. pp54-71.
- 152.- Warr, W.B. (1975) Olivocochlear and vestibular efferent neurons of the feline brain stem: their location morphology and number determined by retrograde axonal transport and acetylcholinesterase histochemistry. *J. Comp Neurol.* 161, 159-182.
- 153.- Werman, R. (1966) Criteria for identification of a central nervous system transmitter. A review. *Comp. Biochem. Physiol.* 18, 745-766.
- 154.- Wërsall, J. (1956) Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullaris in the guinea pig. *Acta Oto-laryngol.* Supp. 126, 1-85.
- 155.- Wërsall, J., Flock, A., and Lundquist, R.G. (1965) Structural basis for directional sensitivity in cochlear and vestibular sensory receptors. *Cold. Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.* 30, 115-145.
- 156.- Wërsall, J. and Flock, A. (1965) Functional anatomy of the vestibular and lateral line organs. In W.D. Neff (ed.) *Contributions*

- 157.- Wérsall, J., and Bägger-Sjöback, D., (1974) Morphology of the vestibular sense organ. In Handbook of Sensory Physiology. H.H. Kornhuber (Ed.). Springer-Verlag, Heidelberg, New York. Vol 6, pp 124-170.
- 158.- Wiet, J.C., Godfrey, D.A., and Ross, D.C. and Dunn, J.D. (1986) Quantitative distribution of aspartate aminotransferase and glutaminase activities in the rat cochlea. Hearing Res. 24, 137-150.
- 159.- Yates, R.A. and Taberner, P.V. (1975) Glutamic acid GABA and their metabolizing enzymes in the frog central nervous system. Brain Res. 84, 399-407.
- 160.- Ylikoski, J., Paivarinta, H., Eranko, L., Mrena, I., and Lenhtosalo, J (1984) Is substance P the neurotransmitter in the vestibular end organs ?. Acta Otolaryngol. 97, 523-528.

A P E N D I C E

Prof. D.P. Purpura  
Brain Research  
Office of the Dean  
Albert Einstein College of Medicine  
1300 Morris Park Avenue  
Bronx, NY 10461, U.S.A.  
Tel.: (212) 430-2387

# BRAIN RESEARCH

International multidisciplinary journal devoted to  
fundamental research in the brain sciences

DEVELOPMENTAL BRAIN RESEARCH

MOLECULAR BRAIN RESEARCH

BRAIN RESEARCH REVIEWS

Dr. Graciela Meza  
Departamento de Neurociencias  
Inst. Fisiologia Celular, UNAM  
Apartado Postal 70-600  
04510 Mexico DF  
MEXICO

09/01/87 Re: MS 018847 01

Dear Author(s):

We are pleased to acknowledge receipt of your manuscript  
entitled:

Some properties of frog vestibular choline acetyltransferase and  
acetylcholinesterase. (Lopez)

It will be considered for publication in BRAIN RESEARCH at the  
earliest opportunity. Please refer to the manuscript number  
given above in any correspondence concerning this paper.

Sincerely,



Dominick P. Purpura, M.D.  
Editor

Comments:

SOME PROPERTIES OF FROG VESTIBULAR CHOLINE ACETYLTRANSFERASE AND  
ACETYLCHOLINESTERASE

I. López and G. Meza

Author for correspondence:

Graciela Meza

Departamento de Neurociencias

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Apartado Postal 70-600

04510, México D.F., México

Key words: vestibular cholinergic system-choline-  
acetyltransferase-acetylcholinesterase-frog



The efferent neurotransmitter in the vertebrate vestibular sensory periphery is believed to be acetylcholine (ACh).

In support to this assumption, the presence and some properties of choline acetyltransferase (ChAT) and of acetylcholinesterase (AChE) were investigated in the frog vestibule. It was found that ChAT activity in a homogenate of the isolated frog vestibule and AChE of frog vestibular membranes are of the same order of magnitude and have similar properties as their homologous enzymes in frog nervous tissue.

Although their precise cellular localization is at present uncertain these results indicate that ChAT and AChE of frog vestibular tissue possess properties resembling those of ChAT and AChE of nervous tissue and might be controlled in a similar manner as their brain homologous enzymes thus possibly participating in inner ear function regulation.

## INTRODUCTION

Sensory cells (hair cells) in endorgans of the vertebrate vestibular system receive efferent innervation.<sup>14-27</sup> A number of observations have indicated that in the vestibule this is mainly an inhibitory system. Inhibitory postsynaptic potentials, induced by stimulation of efferent fibers, have been described in the frog labyrinth<sup>28</sup> which indicates that hair cell-efferent communication is chemical in nature.<sup>10</sup> In vestibular organs this inhibition is probably mediated by a chemical cholinergic synapse since, as occurs in the posterior canal it was invariably suppressed by a typical Ach antagonist such as curare<sup>20-21</sup>; in addition efferent terminals of putative cholinergic nature in the vestibular system exert a tonic inhibitory influence upon the afferent activity arising from the vestibular receptor.<sup>4,9,20,22,25</sup>

Several other parameters concerning the Ach system suggests its neurotransmitter role in the vestibule. Choline acetyltransferase (ChAT) the Ach synthesizing enzyme has been found in the isolated labyrinth of fish,<sup>10</sup> chick<sup>10</sup> and guinea pigs.<sup>20</sup> A sodium and energy dependent mechanism for <sup>3</sup>H-choline uptake and a Ca-dependent release of true Ach was reported in the complete labyrinth of the frog.<sup>17</sup> Retrograde transport of <sup>3</sup>H-choline the Ach precursor, by efferent synapses has been demonstrated in the cat labyrinth.<sup>11</sup>

Histochemical experiments describe the presence of acetylcholinesterase (AChE) the Ach hydrolyzing enzyme at the efferent level in the vestibular sensory periphery of most

vertebrates.<sup>34,36,37,47</sup> In addition evidence is available showing that highly vesiculated endings coming from higher centers are selectively stained by AchE histochemical methods<sup>19</sup> and that this staining is lost after vestibular nerve section.<sup>24</sup>

Choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) are important enzymes because they synthesize and hydrolyze Ach respectively. ChAT has been demonstrated almost exclusively in nervous tissue<sup>27-31</sup> and its presence is generally accepted as a marker for cholinergic terminals<sup>32-40</sup>. In the brain the presence of ChAT has been found to parallel nervous activity<sup>19</sup>. AChE occurs in animal tissue together with other cholinesterases and simple esterases and in general its distribution parallels that of Ach in nervous tissue<sup>20</sup>. Thus the demonstration of both enzymes somewhat correlates with a cholinergic active system.

Efferent activity upon hair cells is crucial for the processing of information at this level. In the frog, the physiological experiments cited above strongly suggest that efferent neurotransmission is cholinergic<sup>1,8,20,23,25</sup>.

Recent data demonstrate ChAT in frog labyrinth and suggest AChE presence.<sup>47</sup> Therefore, knowledge of ChAT and AChE characteristics would be valuable for understanding vestibular efferent function. Thus in the present work we studied some properties of frog vestibular ChAT with respect to its pH optimum, effect of protein concentration upon enzyme activity, linearity with time of the enzymatic reaction and effect of Triton-X-100 and of phosphate and Cl<sup>-</sup> ions on the enzyme. For AChE we studied its inhibition by physostigmine sulfate.

Participation of unspecific cholinesterases in the degradation of Ach in the presence of a specific inhibitor of their activity, tetraisopropylpyrophosphoramidate (Iso-Ompa).<sup>1-30</sup> was also studied. For these purposes ChAT (acetyl-CoA:choline-o-acetyltransferase (EC 2.3.1.6) and AChE (acetylcholine acetylhydrolase, EC 3.1.1.7) were measured in the complete labyrinth of the frog, under the experimental conditions described below.

## Materials and Methods

### Materials

<sup>3</sup>H-acetylcoenzyme-A was from New England Nuclear, Boston Mass. Physostigmine sulfate (eserine sulfate), tetraisopropylpyrophosphoramidate (Iso-Ompa), acetylthiocholine, dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB), tetraphenylboron, S-acetylcoenzyme A, ethylenediaminetetra-acetate (EDTA), choline chloride, Triton X-100, 2,5 diphenyloxazole (PPO), 1,4bis2-(5-phenyloxazolyl)benzene (POPOP), bovine serum albumine were all purchased from Sigma Chemicals (St. Louis MO, U.S.A.). NaCl from Mallinkrodt, México; toluene from JTM Baker, México; acetonitrile, sodium phosphate and sodium citrate from Merck, México.

### Animals

Adult frogs (*Rana moctezuma*) were used for this study. They were sacrificed by decapitation and the vestibular apparatus was dissected as already described.<sup>41</sup>

Determination of choline acetyltransferase (ChAT) activity. For estimating ChAT activity a homogenate in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 of the pooled organs of 10 animals (400 ug protein each approximately) was prepared. The enzyme was determined in triplicate samples by the rapid radiochemical method of Fonnum<sup>22-23</sup> in a medium of the following composition (in mM, final concentration); NaCl, 300; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10; eserine sulfate 0.1; ethylenediamine-tetracetic acid (EDTA), 10; <sup>3</sup>H acetyl coenzyme-A (CoA) 0.06 with a specific activity of 850 mCi/mmol, (0.26 uCi); choline chloride, 10; and Triton X-100, 0.33%. For elucidation of the effect of protein concentration upon enzymatic activity, measurement of ChAT at four different concentrations of protein (from 0.2 mg to 0.8 mg) was performed. To investigate the linearity of the enzyme activity with regard to time, four different incubation intervals from 10 to 60 min were used. For effects of Triton X-100 the enzyme was measured in the presence of this detergent at six concentrations varying from 0.033% to 1.0%. In order to assess the similarities of this enzyme with ChAT present in brain tissue (with respect to its sensitivity to phosphate ions), the medium for ChAT quantification contained 200 instead of 10 mM phosphate.

ChAT susceptibility to chloride ions was measured in a medium in which NaCl was substituted by 300 mM sodium citrate. ChAT activity was defined as nmol of <sup>3</sup>H acetylCoA deacetylated per mg protein per minute.

Determination of AchE activity.

This was determined by Ellman's method with some modifications.<sup>16</sup> It was measured in duplicate samples of 400 ug

protein each of a crude membrane fraction which was prepared by the procedure described earlier except that the final membrane fraction was used after 24 hour of frozen instead of after 6-7 weeks.<sup>12</sup>

For AchE assay this pellet was resuspended (approximately 20 mg of tissue in 2 ml of phosphate buffer pH 8.0, 0.1M) and a 0.4 ml aliquot (0.4 mg protein approx.) of this suspension was added to a cuvette containing 2.6 ml of sodium phosphate buffer (pH 8.0, 0.1 M), 100 ul of dithiobisnitro-benzoic (DTNB) acid 0.1 M and the absorbance was measured at 412 nm. The reaction was started with the substrate (acetylthiocholine) and absorbance was recorded every minute for 20 min, at which the reaction was always linear with time AchE activity ( $\mu \times \text{min}$ ) was calculated from the above records and expressed as nmoles of substrate hydrolyzed per mg protein/min. The reaction was achieved at room temperature in a Karl Zeiss spectrometer. To determine the apparent inhibition constant ( $K_i$ ) for eserine sulfate the reaction was performed in the presence of two different concentrations of substrate (0.28 and 0.48 mM) and five different concentrations of eserine sulfate (from 0.5  $\mu\text{M}$  to 0.5 mM)  $K_i$  was calculated by the Dixon method.<sup>12</sup> To elucidate the participation of unspecific cholinesterases in the degradation of Ach we used Iso-Ompa (tetraisopropyl-pyrophosphoramidate) at five different concentrations (from 0.1  $\mu\text{M}$  to 1 mM) in the AchE assay.

The Lowry method was used for protein determination in all cases.<sup>12</sup>

## Results

### ChAT activity

ChAT activity was found to be present in a frog labyrinthine homogenate with a magnitude of 9.44 pmoles per mg protein per minute. When some of its properties were studied it was found that ChAT activity was linear for as much as 0.80 mg of protein in the reaction medium (Fig. 1). When measured at different time intervals of incubation ChAT activity increased proportionally with time for as long as 60 min (Fig. 2). ChAT was activated by the presence of detergent (Triton X-100) showing the highest ChAT activity at 0.33% concentration of Triton X-100 in the assay medium (Fig. 3). Frog vestibular ChAT as assayed at six different pH values ranging from 5.7 to 8.2 presented a typical dependence activity curve (Fig. 4). The sharp peak shown in the figure indicates a pH optimum for the enzyme of 7.4.

When phosphate concentration was elevated from 10 to 200 mM in the incubation medium ChAT activity presented a 73% decrease in regard to its control. Substitution of chloride ion for citrate in the medium resulted in a 82% diminution of the enzyme activity (Table I).

### AchE activity

AchE was present in a crude membrane fraction of the frog labyrinth with a value of 270 nmoles/mg protein/min. A remarkable inhibition of AchE activity by eserine sulfate was observed. The apparent inhibition constant ( $K_i$ ) for eserine was of 7  $\mu$ M (Fig. 5). AchE was insensitive to the effect of Iso-Ompa, an irreversible inhibitor of unspecific cholinesterase as it can be

seen in table II. Eserine shows a high inhibition (99.33%) in regard to its control, while Iso-Ompa at equimolar concentrations of eserine shows no inhibition of AChE activity.

#### DISCUSSION

In the present study some properties of ChAT and AChE of the isolated frog labyrinth are presented.

We found ChAT activity of the same order of magnitude of its homologous enzyme of the CNS in the frog.<sup>26</sup> The conditions chosen for enzyme measurement i.e. protein concentration and time of incubation were optimum according to Fig. 1 and 2. Further, absolute values of our enzyme were similar to those of frog nervous system<sup>26</sup> and retina<sup>27</sup> i.e. 9.44 pmoles/mg protein/min in frog vestibule, 16 pmoles/mg protein/min in frog telecephalon,<sup>26</sup> 30 pmoles/mg protein/min in frog retina.<sup>27</sup> In spite of the fact that it is difficult to compare results arising from studies performed in different assay conditions, frog vestibular ChAT properties seem to be similar to those of the CNS enzyme of various regions. Frog vestibular ChAT activity has a pH optimum of 7.4. This value falls within the range found for rat brain (7.2),<sup>28</sup> mouse brain (7.5)<sup>12</sup> and ox brain (7.5).<sup>29</sup> When the effect of Triton X-100 upon ChAT activity was studied we found that a concentration of 0.33% was necessary to get a maximum activity of the enzyme. Triton X-100 effect on the brain enzyme was studied by Fonnum<sup>17</sup> and Benishin.<sup>2</sup> These authors found that this agent was necessary for the enzyme determination, because ChAT is present in brain in an occluded form from which it must be released.<sup>17</sup> Although the concentration of the detergent used



for maximum liberation of the enzyme was of 0.33% instead of 0.5%<sup>12</sup> we can say that frog vestibular ChAT also needs to be freed for its measurement. A decrease of activity upon the use of higher concentrations than 0.33% cannot be explained at the moment.

Nervous system ChAT is highly sensitive to phosphate<sup>21</sup> and extremely dependent on the presence of Cl<sup>-</sup> ions in the medium.<sup>22</sup> When properties of vestibular ChAT activity with regard to its sensitivity to phosphate and its dependence on chloride were examined they were found to be identical to those described for ChAT in vertebrate neural tissue<sup>22,23</sup> and in crista ampullares of the chick inner ear i.e it is inhibited by 66% of phosphate and a 77% of diminution of the enzyme activity was observed when citrate is used in substitution of chloride ion.<sup>46</sup>

AchE, an essential enzyme of nervous tissue which rapidly terminates the action of released Ach, is present in a crude membrane fraction of the frog labyrinth with a magnitude comparable to that of nervous tissue and chick ampullary cristae (174 nmoles/mg protein/min in frog medulla oblongata<sup>26</sup>; 312 nmoles/mg protein/min in chick ampullary cristae<sup>47</sup>).

AchE is specifically reversibly inhibited both in vivo and in vitro by eserine.<sup>2,7</sup> Frog vestibular AchE is sensitive to this agent and the apparent Ki value obtained in our membrane fraction is similar to that obtained in other preparation (AchE from Electrophorus electric organs 2.5  $\mu$ M, 6.7  $\mu$ M in our preparation). Further AchE is distinguished from non-specific cholinesterases on the basis of its Iso-Ompa sensitivity.<sup>1,10,20</sup>

When we measured AChE activity in presence of Iso-Ompa, AChE in our membrane fraction never showed inhibition by this agent leading us to assume that hydrolysis of ACh is mediated mainly by AChE.

Studies of ChAT have shown that it is a specific marker for cholinergic structures. Further, its presence parallels nervous activity.<sup>22</sup> In contrast, regional measurements of AChE have not always been in accordance with the distribution of ACh and ChAT suggesting that AChE is a less specific marker for cholinergic structures.<sup>7,20</sup> On the other hand, evidence has appeared recently showing that in tissue culture, putative cholinergic, cholinesterase-bearing neurons were identified with the aid of sensitive immunostaining techniques<sup>25</sup> as these cells tend to expose the enzyme on their external surface upon application of anticholinesterase antibodies.<sup>17,27</sup> Combined studies of ChAT and AChE showed that not all esterase-positive neurons are cholinergic but the exceptions are largely confined to specific brain regions like cerebellum and substantia nigra.<sup>40-44</sup> Therefore, AChE continues to be a useful marker for presumptively cholinergic cells and it is the only cholinergic marker to be accessible in intact cells<sup>25</sup>. In the vestibule histochemical studies have shown that efferent fibers of the statoacoustic system react positively to AChE, as shown by light microscope observations, i.e. in chinchilla vestibular labyrinth under the phase contrast microscope, the reaction product of AChE was localized in the sensory areas.<sup>27</sup> Inside the neuroepithelium the reaction was observed below the basement membrane at the level of some non-myelinated nerve fibers and at some endings. By electron

microscopy, the reaction product was observed on the plasma membrane of the efferent nerve endings that contact both type I and type II hair cells<sup>27</sup>. Thus AChE activity found in the vestibular sensory areas seems to be an exclusive property of efferent elements and nicely correlates with our biochemical findings.

The demonstration in the frog vestibule of ChAT and AChE with properties similar to those of their nervous system homologous enzymes is important for understanding cholinergic efferent neurotransmission in the vertebrate stato-acoustic organs. We have evidence in the frog vestibule that ChAT might be located in efferent terminals, since this enzyme is almost completely depleted when the vestibular nerve coming from high centers is excised and its terminals allow to degenerate.<sup>21</sup> Although more direct evidence is necessitated (for instance immunocytochemistry experiments currently going on in our laboratory) if indeed ChAT and AChE were localized in efferent boutons, and were controlled as the brain homologous enzymes this might mean that efferent terminals can use Ach as their neurotransmitter whose synthesis and degradation might be important in inner ear function.

#### Acknowledgements.

I. López is a recipient of a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) fellowship. Thanks are due to Mr. Arturo Romero for technical assistance and to Miss Yolanda Díaz de Castro for kindly providing secretarial help.

Table I. Effects of phosphate or Cl<sup>-</sup> ions on ChAT activity in the frog vestibule. The figures mean values of individual experiments, run in triplicate  $\pm$  S.E.M. for the number of experiments in parentheses.

Assay condition	pmol/mg protein/min
Control	9.44 $\pm$ 0.3 (3)
200 mM phosphate	2.56 $\pm$ 0.2 (3)
Control	9.35 $\pm$ 0.2 (3)
300 mM sodium citrate	1.70 $\pm$ 0.1 (3)

Table II. Effects of eserine sulfate and Iso-Ompa on AchE activity of a frog vestibule membrane fraction. AchE activity is expressed as nmoles of substrate (acetylthiocholine) hydrolyzed per mg protein/min. The data are mean values of triplicate samples  $\pm$  S.E.M. of the number of experiments indicated in parentheses.

Control	Eserine sulfate 0.1 mM	Iso-Ompa <sup>a</sup> 0.1 mM
270.0 $\pm$ 6.0(5)	2.52 $\pm$ 0.2(5)	268.0 $\pm$ 4.0(5)

\*Other concentrations of Iso-Ompa used were of 0.5 mM and 1 mM and gave similarly no inhibition.

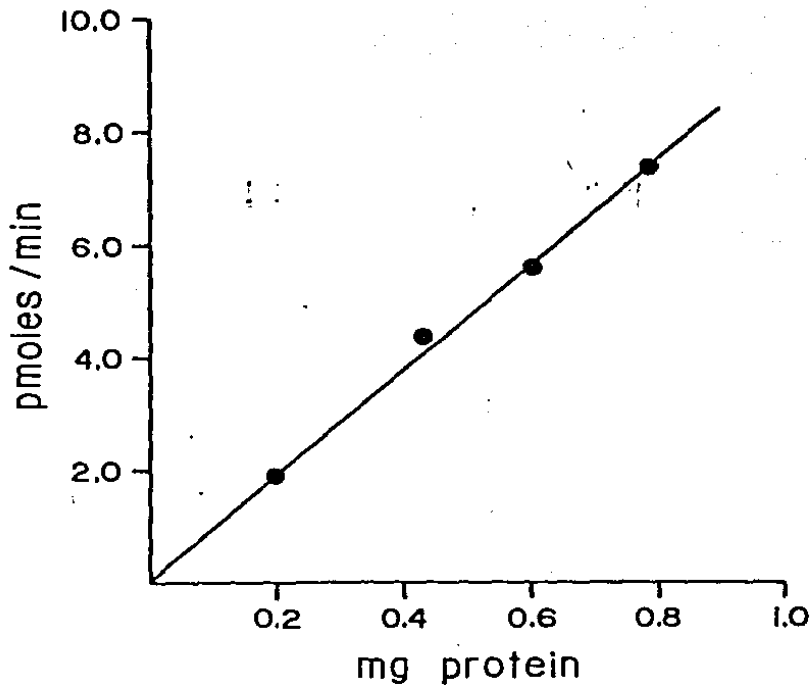


Fig. 1. Frog vestibule ChAT activity expressed as pmoles of acetylcholine synthesized/ min as a function of protein concentration. The plotted values are means of at least three independent experiments with less than 10% variation.

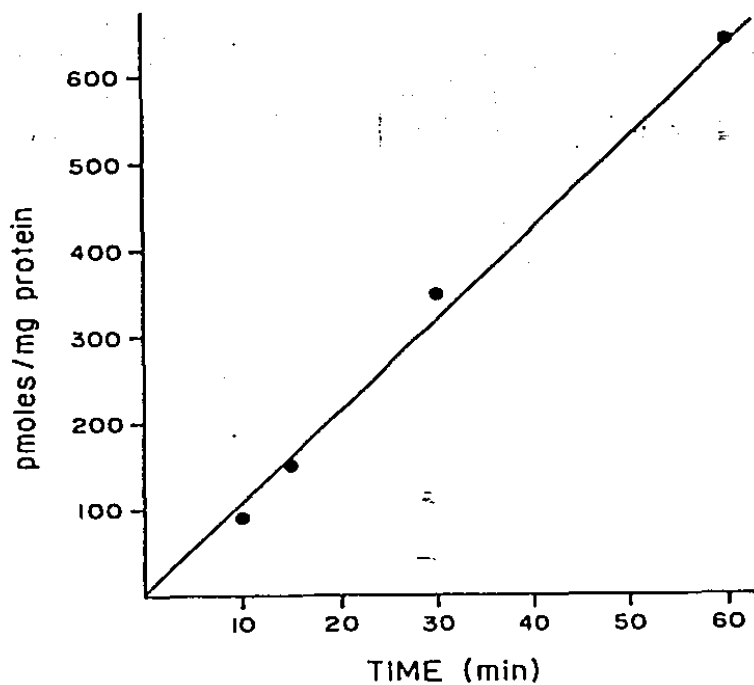


Fig. 2. Frog vestibule ChAT activity expressed as pmoles of acetylcholine synthesized/ mg protein as a function of time of incubation. The plotted values are means of at least three independent experiments which never varied more than 10%.

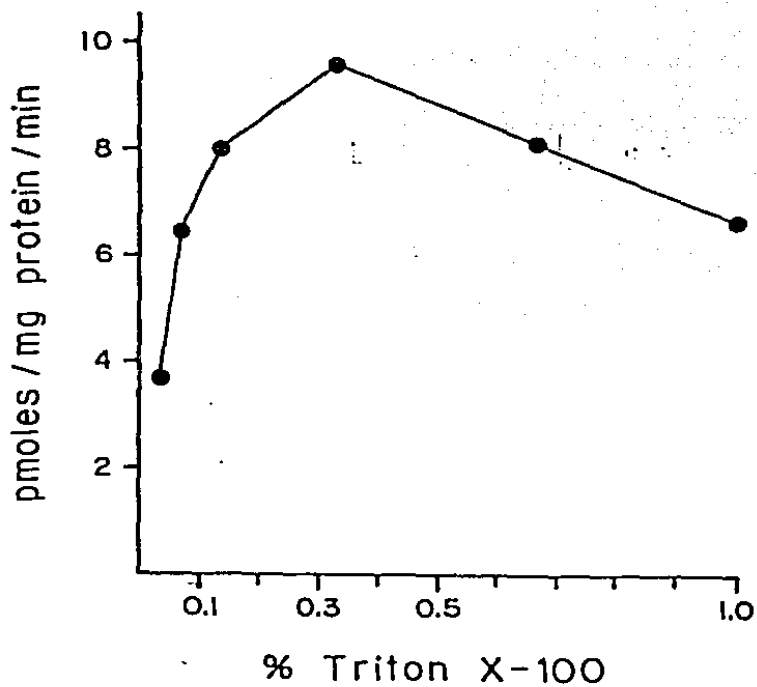


Fig. 3. Effect of concentration of Triton X-100 on ChAT activity of the frog vestibule. Each point represents mean values of three triplicate individual experiments with less than 10% variation expressed as pmoles of acetylcholine synthesized/mg protein/min.



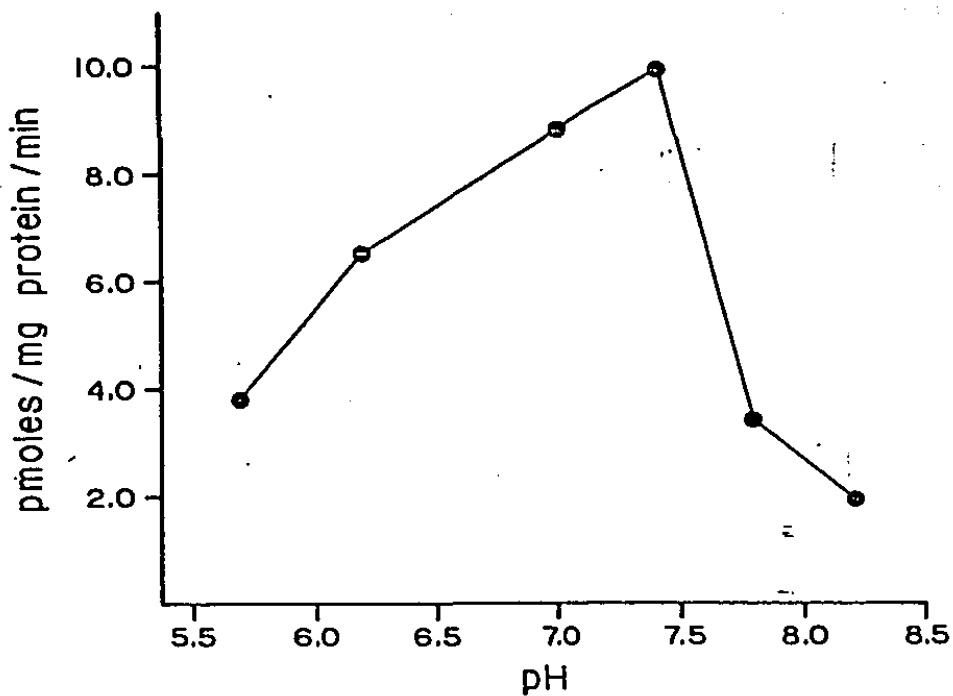


Fig. 4. Effect of pH on ChAT activity of frog vestibule. Each point represents mean values of three triplicate individual experiments with less than 10% variation expressed as pmoles of acetylcholine synthesized/ mg protein/ min.

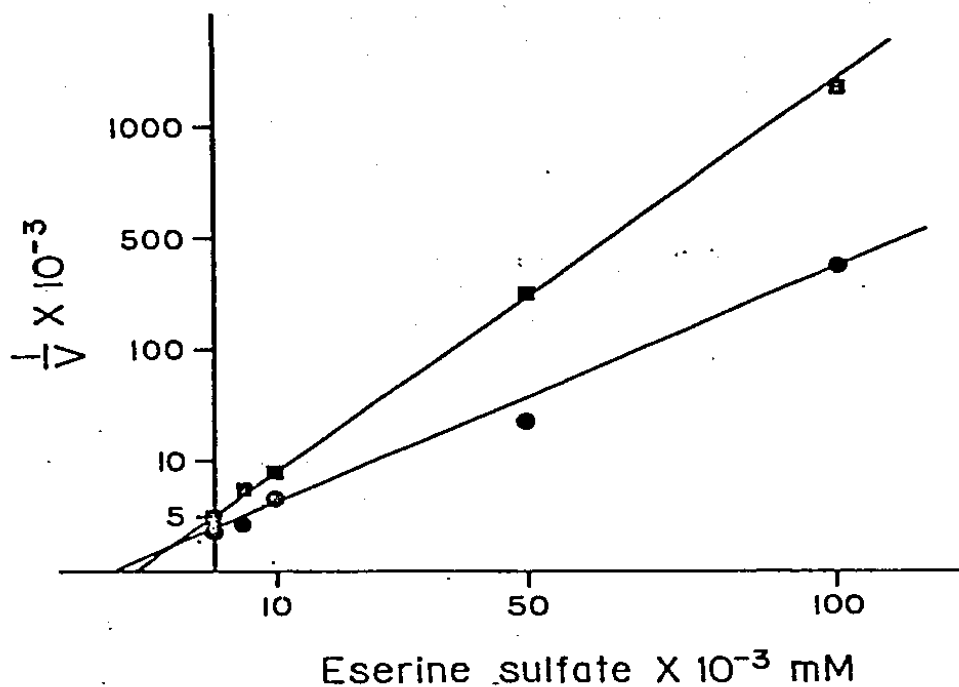


Fig. 5. Dixon plot for determination of apparent inhibition constant for eserine sulfate on AchE activity in a crude membrane fraction of the frog vestibule. The ordinate is the reciprocal of the initial velocity,  $V$  expressed as nmoles of substrate (acetylthiocholine) hydrolyzed/ mg protein/ min. The abscissas is millimolar concentrations of eserine sulfate. Each point represents means of at least three experiments run in triplicate which never varied more than 10% (■ = 0.20 mM of acetylthiocholine; ● = 0.48 mM acetylthiocholine).

## REFERENCES

1. Aldridge, W.N., The differentiation of true and pseudo-cholinesterase by organophosphorus compounds. *Biochem. J.* 53(1953)62-67.
2. Augustinsson, K.B., and Nachmansohn, D., Studies on cholinesterase VI. Kinetics of the inhibition of acetylcholine esterase. *J. Biol. Chem.* 179(1949)543-549.
3. Benishin, C.G., and Carrol, P.T., A comparison of soluble and membrane bound forms of choline-o-acetyltransferase in mouse brain nerve endings. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 25(1982)343-345.
4. Bernard, C. Cochran, S.L. and Precht, W., Presynaptic actions of cholinergic agents upon the hair cell-afferent fiber synapse in the vestibular labyrinth of the frog, *Brain Research*, 338(1985)225-236.
5. Brimijoin, S., and Rakonczay. Immunology and molecular biology of the cholinesterases: current results and prospects. *Int.Rev. of Neurobiol.* 28(1986)363-410.
6. Brugani, M., Lippa, S., Littarru, G.P., Oradei, A., and Pomponi, M., A new simple method for determining the kinetic constants of inhibited acetylcholinesterase. *Italian J. of Biochem.* 33(1984)325-332.
7. Bullock, T.H., Nachmansohn, D., and Rothenberg, M.A., Effect of inhibitors of cholinesterase on the nerve action potential. *J. Neurophysiol.* 9(1946)9-22.
8. Caston, J. and Rousell, H., Curare and the efferent

- vestibular system, *Acta Oto-laryng.* (Stockh.), 97(1984)19-26.
9. Cheney, D.L., Racagni, G., and Costa, E., Appendix II: distribution of acetylcholine and choline acetyltransferase in specific nuclei and tract of rat brain. In A. Goldberg and I. Hanin (Eds.). *Biology of Cholinergic Function*. Raven Press New York, 1976 pp. 655-659.
  10. Davis, R., Koelle, G., and Sanville, U.J., Electron microscope localization of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the ciliary ganglion of the cat., *J. Histochem. and Cytochem.* 32(1984)849-861.
  11. Dememes, D., Raymond, J. and Sans, A., Selective retrograde labelling of vestibular efferent neurons with <sup>3</sup>H-choline, *Neuroscience*, 8(1983)285-290.
  12. Dixon, M. and Webb, E.C., Enzyme inhibition and activation. Chapter VIII In M. Dixon and E.C. Webb (Eds.) *Enzymes*, Longman Group Limited London, Third edition, 1979, pp.332-467.
  13. Dohman, G.F., Histochemical studies of vestibular mechanism. In G.L. Rasmussen and W.F. Windle (Eds.), *Neural mechanisms of the auditory and vestibular system*. Charles, C. Thomas, Springfield Ill., 1960, pp. 258-275.
  14. Dohmann, G., Farkashidy, Y., and Salonna, F., Centrifugal nerve-fibers to the sensory epithelium of the vestibular labyrinth. *J. Laryngol. Otol.* 72(1958)984-991.
  15. Ekstrom, J., Acetylcholine synthesis and its dependence on nervous activity, *Experientia*. 34(1978)1247-1253.
  16. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Featherstone,

- R.M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, 7(1960) 88-98.
17. Fernández, H.L., and Stiles, R.J., Intra- versus extracellular recovery of 16s acetylcholinesterase following organophosphate inactivation in the rat., *Neuroscience Lett.* 49(1984)117-122.
  18. Flocke, A. and Lam, D., Neurotransmitter synthesis in inner ear and lateral line sense organs, *Nature*, 249(1974)142-144.
  19. Fonnum, F., A radiochemical methods for the estimation of choline acetyltransferase, *Biochem. J.* 100(1966)479-484.
  20. Fonnum, F., Choline acetyltransferase binding to and release from membranes. *Biochem. J.*, 109(1968)389-398.
  21. Fonnum, F., Radiochemical micro assays for the determination of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities, *Biochem. J.* 115(1969)465-472.
  22. Fonnum, F., A rapid radiochemical method for determination of choline acetyltransferase, *J. Neurochem.* 24(1975)407-409.
  23. Fonnum, F., Radiochemical assays for choline acetyltransferase and acetylcholinesterase. In N. Mark and R. Rodnight (eds.), *Research methods in neurochemistry*, Vol 18 Plenum Press, New York, 1975 pp. 253-275.
  24. Gacek, R.R., Nomura, Y., and Balogh, K., Acetylcholinesterase activity in the efferent fibers of the statoacoustic nerve, *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 59(1965)541-553.
  25. Gleissner, L., and Henrikson, N.C., Efferent and afferent

- activity pattern in the vestibular nerve of the frog. *Acta Otolaryng. Suppl.* 192(1963)90-103.
26. Glover, V., and Potter, L., Purification and properties of choline acetyltransferase from ox brain striate nuclei. *J. Neurochem.* 18(1971)571-580.
  27. Goudou, D., Verdier-Sahuque, M., and Rieger, F., External and internal acetylcholinesterase in rat sympathetic neurones in vivo and in vitro., *FEBS Lett.* 186(1985)54-58.
  28. Guth, P., Norris, C.H., Guth, S.L. Quine, D.B., and Williams, W.H., Cholinomimetics mimic efferent effects on semicircular canal afferent activity in the frog. *Acta Otolaryng. (Stockh.)*. 102(1986)194-203.
  29. Hebb, C.O., Formation, storage and liberation of acetylcholine-. In G.B. Koelle (Ed.), *Handbuch der experimentellen Pharmacologie*, Vol. 15, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1963, pp.55-88.
  30. Hebb, C.O., and Silver, A., Choline acetylase in the central nervous system of man and some other mammals. *J. Physiol., Lond.* 134(1956)718-728.
  31. Hebb, C.O., and Whittaker, V.P., Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase., *J. Physiol. (Lond.)*, 142(1958)187-196.
  32. Hersh, L.B., Studies on the kinetic mechanism and salt activation of bovine brain choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* 34,(1980)1077-1081.
  33. Hoover, D.B., Muth, E.A. and Jacobowitz, D.M., A mapping of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in discrete areas of rat brain. *Brain*

Research, 153(1978)295-306.

34. Ishii, T., Murakami, Y., and Balogh, K., Acetylcholinesterase activity in the efferent nerve fibers of the human inner ear. *Ann. Otol.* 76(1967)69-82.
35. Iturbe, A.G. and Meza, G., Probable localization of GABA and Ach synthesis in the vestibule of streptomycin-treated guinea pigs. *Soc. Neurosc. Abst.* 11(1985)696.
36. Iurato, S., Luciano, L., Pannese, E. and Reale, E., Acetylcholinesterase activity in the vestibular sensory areas. *Acta Oto-laryng. (Stockh.)*. 71 (1971)147-152.
37. Iurato, S., Luciano, L., Pannese, E. and Reale, E., Histochemical localization of acetylcholinesterase (AChE) activity in the inner ear, *Acta Oto-laryng., Supp (Stockh.)*, 279(1971)1-50.
38. Koelle, G.B., Davis, R., Diliberto, E.G., and Koelle, W.A., Selective, near total irreversible inactivation of peripheral pseudocholinesterase (BuChE) and acetylcholinesterase (AChE) in cats in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, 23(1974)175-180.
39. Lam, D.M.K., Synaptic chemistry of identified cells in the vertebrate retina. Cold. Spring Harbor, S.O. Biol. 50(1975)571-579.
40. Levey, A.I., Wainer, B.H., Mufson, E.J. and Mesulam, M.M. Colocalization of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the rat cerebrum, *Neuroscience*, 9(1983)9-22.
41. López, I., and Meza, G., Neurochemical evidence for afferent

- GABAergic and efferent cholinergic neurotransmission in the frog vestibule, *Neuroscience*, in press (1987).
42. Lowry, H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193(1951)265-275.
  43. Malthe-Sorensen, D., Molecular properties of choline acetyltransferase from different species investigated by isoelectric focussing and ion exchange adsorption., *J. Neurochem.*, 26(1976)861-865.
  44. Meza, G., Characterization of GABA-ergic and cholinergic neurotransmission in the chick inner ear. In D.G. Drescher (Ed.), *Auditory Biochemistry*, Charles. C. Thomas, Springfield IL, 1985 pp. 80-101.
  45. Meza, G., González-Viveros, T., and Ruiz, M., Specific  $^3\text{H}$  gamma aminobutyric acid binding to vestibular membranes of the chick inner ear. *Brain Research* 337(1985)179-183.
  46. Meza, G., López, I. and Ruiz, M., Possible cholinergic neurotransmission in the cristae ampullares of the chick inner ear, *Neurosc. Lett.* 49(1984)93-98.
  47. Meza, G., and López, I., Characterization of cholinergic neurotransmission in the frog vestibule, *J. Neurochem.* 44(1985)99c.
  48. Precht, W., Physiological aspects of the efferent vestibular system. In H. Kornhuber (Ed.), *Handbook of Sensory Physiology Vol VI/I*. Springer-Verlag, New York, 1974 pp 221-236.
  49. Raffi-Jean, O., Lyon, J., and Gacek, R., Esterase activity in cat vestibular end organs., *Arch. Otolaryngol. Head Neck*



- Surg., 113(1987)543-546.
50. Rossi, M.L., Prigioni, I., Valli, P. and Casella, C., Activation of the efferent system in the isolated frog labyrinth: effects on the afferent EPSPs and spike discharge recorded from single fibers of the posterior nerve, Brain Research, 185(1980)127-137.
  51. Rossi, M.L. and Sacchi, O., Effectiveness of some anions in sustaining the efferent inhibition of the frog labyrinth. Brain Research, 223(1982)181-185.
  52. Rossier, J., Spanditakis, Y., and Benda, P., The effect of  $Cl^-$  on choline acetyltransferase kinetic parameters and a proposed role for  $Cl^-$  in the regulation of acetylcholine synthesis. J. Neurochem. 29(1977)1007-1012.
  53. Russell, I.J., The pharmacology of efferent synapses in the lateral line system of *Xenopus laevis*. J. exp. Biol. 54(1971) 643-658.
  54. Satoh, K., Armstrong, D.M., and Fibiger, H.C., A comparison of the distribution of central cholinergic neurons as demonstrated by acetylcholinesterase pharmacohistochemistry and choline acetyltransferase immunohistochemistry., Brain Res. Bull 11(1983)693-720.
  55. Valli, P., Costa, J. and Zucca, G., Local mechanisms in vestibular receptor control, Acta Oto-laryng. (Stockh.). 97 (1984)611-618.
  56. Wachtler, K., The regional distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in vertebrate brains of different phylogenetic levels. In G.

Pepeu (Ed.), Cholinergic mechanisms, Plenum Press New York, 1981, pp. 54-71.

57. Wersall, J. Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullaris in the guinea pig. Acta Oto-laryng. (Stockh.), Supp. 126(1956)1-85.

# NEUROSCIENCE

An International Journal

Dr. R. Llinas  
Chairman, Dept. of Physiology & Biophysics  
New York University Medical Center  
550 First Avenue  
New York, NY 10016, USA  
Tel. (212) 340-5115

Date: May 22, 1987

## NOTICE OF ACCEPTANCE

To: I. Lopez and G. Meza

Your manuscript has been accepted for publication and forwarded to the Journals Production Department of Pergamon Press in Oxford. The production staff will follow the manuscript throughout its preparation for printing and will take care of any special requirements which were noted directly on the original artwork. Page proofs and reprint order forms will be sent to you within a reasonable period of time, and the production staff will schedule the article for publication.

When your paper appears in Neuroscience, its publication will indeed be noted by the editor:

  
Rodolfo Llinas

Telephone (212) 340-5415

Manuscript # A86133

Title: Neurochemical evidence for afferent GABAergic and efferent cholinergic neuromodulation in the frog vestibule.

 PERGAMON  
JOURNALS

New York • Oxford • Elmsford • Frankfurt • Sao Paulo • Sydney • Tokyo • Toronto

Neurochemical evidence for afferent GABAergic and efferent  
cholinergic neurotransmission in the frog vestibule

I. López and G. Meza\*

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,  
UNAM México

\*Author for correspondence:

Graciela Meza

Departamento de Neurociencias,

IFC, UNAM

Apartado Postal 70-600,

04510, Mexico D.F., Mexico

Abbreviations: Ach. acetylcholine; AchE, acetylcholinesterase;  
ChAT, choline acetyltransferase; EDTA, ethylenediamine-tetracetic  
acid; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; GAD, glutamate decarboxylase;  
POPOP, 1,4 [bis(2-(5-phenyloxazolyl)benzene)]; FPO, 2,5'-diphenyloxazol.

Running title: Vestibular GABAergic and Cholinergic  
neurotransmission

Abstract. Activities of both glutamate decarboxylase and of choline acetyltransferase with magnitudes similar to their homologous enzymes in frog nervous tissue were found in homogenates of the frog labyrinth. Transection of the vestibular nerve resulted in a gradual diminution of choline acetyltransferase activity until it reached an 88% decrease 6 weeks after surgery. In contrast, glutamate decarboxylase activity, did not suffer any alteration at any time after nerve excision. The presence of their enzymes of synthesis are evidence of the neurotransmitter participation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and acetylcholine in the frog vestibule; the observed decrease of choline acetyltransferase following vestibule nerve excision supports the efferent synaptic bouton localization of choline acetyltransferase. That glutamate decarboxylase is located in a cell type (or compartment) that may well be the hair cell is supported by the fact that this enzyme does not suffer any modification after surgery. These results are in accordance with an efferent cholinergic neurotransmission and of a putative afferent role of GABA in the frog vestibule.

The receptor cells (hair cells) of the vestibular sensory organs transform information about mechanical stimuli and send it through the afferent nerve fibers to the central nervous system (CNS); these hair cells also have an efferent probably inhibitory innervation from the CNS<sup>22</sup>.

It is generally accepted that both afferent and efferent neurotransmission are chemical in nature. Evidence concerning the identity of the afferent neurotransmitter in the receptoneural junction of the vestibular sensory epithelia in vertebrates is nowadays a matter of controversy: application of a catecholamine - like substance affects the presynaptic bar structure of the hair cell in the frog vestibule<sup>23</sup>. Glutamate or a glutamate-like substance increases the spontaneous and the stimulus-evoked activity of vestibular neurons in the frog<sup>24</sup> and the cat<sup>25</sup>.

Recently data have accumulated in favor of GABA as a putative vestibular neurotransmitter. Picrotoxin, a known GABA receptor blocker inhibited spontaneous and evoked activity in the afferent nerve from skate semicircular canal ampulla.<sup>26</sup> Iontophoretic application of GABA increased the spontaneous activity of single units in the macula sacculi of the cat<sup>27</sup>. The blocking by bicuculline and picrotoxin<sup>28</sup> of this response and the successful treatment with picrotoxin of patients suffering from vertigo crises of peripheral origin<sup>29</sup> may correlate with the existence of a GABA receptor in the sensory periphery of the labyrinth.

Biochemical experiments have demonstrated specific <sup>3</sup>H-GABA

binding to a crude membrane preparation of chick ampullary cristae and thus tended to confirm the presence of a synaptic GABA receptor<sup>27</sup>; a high-affinity Na<sup>+</sup> - and energy-dependent uptake system possibly representing a GABA-inactivating mechanism has been shown in chick vestibular cristae<sup>28</sup>.

Glutamate decarboxylase (GAD) the synthesizing enzyme for GABA, was found in the skate semicircular canal ampulla<sup>14</sup>, in the efferent innervation-devoid amphibian papilla<sup>14</sup> and the ampullary cristae of chicks<sup>29</sup> and guinea pigs.<sup>29-31</sup>

Either no effects or weak excitatory ones of GABA upon afferent activity in amphibian vestibule contradict the above statements.<sup>3-22-33</sup>

As to efferent neurotransmission several lines of investigation support the involvement of acetylcholine (ACh) in the vertebrate vestibule<sup>1-3-20-47-48</sup>. Efferent terminals of putative cholinergic nature in the vestibular system, exert a tonic inhibitory influence upon the afferent activity arising from the vestibular receptor.<sup>6-30-33</sup> Histochemical techniques have shown the presence of acetylcholinesterase (AChE) the ACh degrading (inactivating) enzyme, at the vestibular receptor neural junction of some vertebrates.<sup>30-31</sup> Retrograde transport of <sup>3</sup>H-choline, the ACh precursor, by efferent synapsis has been demonstrated in the cat labyrinth.<sup>7</sup> In addition, evidence is available showing that highly vesiculated endings coming from higher centers are selectively stained by AChE histochemical methods<sup>10</sup> and that this staining is lost after vestibular nerve section.<sup>17</sup>



Although the evidences described above are very valuable, some data in higher vertebrate whose vestibule contains two kinds of hair cells (types I and II) having both afferent and efferent nerve supplies<sup>20</sup> thus the drawing of conclusions is very difficult.

The vestibular labyrinth of the frog has been extensively studied from the physiological viewpoint and it contains only type II hair cells which are contacted directly by afferent and efferent boutons. Therefore, this is an ideal system, regarding its relative simplicity to investigate the neurochemistry of synaptic transmission particularly as the membranous labyrinth of the frog can be isolated easily and its biochemistry thus studied.

The demonstration of the enzyme of synthesis has been shown to be a valid criterion which must be satisfied before a substance can be accepted as a transmitter at given synapse.<sup>27</sup>

On the other hand, experimental nerve degeneration has been widely used to recognize patterns of nerve cells in the CNS.<sup>43</sup> In the frog, earlier reports have shown that excision of the eighth nerve resulted in a wallerian degeneration of the efferent fibers and an efferent synaptic degeneration.<sup>26</sup>

It is our purpose in this paper to present some biochemical evidences which permit to postulate GABA as an afferent neurotransmitter and Ach as an efferent one in the frog vestibule and to suggest their possible cellocalization.

The strategy used was the investigation of their enzymes of synthesis in a homogenate of the vestibule of normal frogs and of

frogs whose right side vestibular nerve has been surgically excised leaving the left nerve intact as a control. Therefore, in the present study we measured GAD (L-glutamate 1-carboxy-lyase E.C. 4.1.1.15) and ChAT activity (acetyl-CoA:choline-o-acetyltransferase E.C. 2.3.1.6) in normal frog's vestibules and in the right and left labyrinths of frogs after denervation of the right eighth cranial nerve at different times keeping the left side as a control.

#### Experimental procedures

Labyrinths from adult healthy frogs (*Rana moctezuma*) (50-100 g of weight) or from frogs at different time intervals after denervation of the right eighth cranial nerve were used throughout this study.

**Surgical procedure.** The procedure that has been described in the literature was essentially used<sup>26</sup> except that frogs were anesthetized by sublingual administration of 0.1 ml of a 0.1% sodium pentobarbital solution and that for prevention of a possible regeneration of the eight nerve a piece of gel foam (2 X 2 mm) was placed between the brainstem and the labyrinth. The success of the operation was monitored by examination of the characteristic effect result from denervation<sup>26, 27</sup> (the head was turned in a vertical plane relative to the body with the operated right side down. A tendency of the frog to lean toward the operated side and to extend the contralateral limbs was also observed). The animals presented this behaviour throughout experimentation time.

Normal and denervated animals were kept in the laboratory

and hand-fed 3 times a week with live wild crickets (*Sphenarium* sp.).

At days 3, 7, 15, 21 and 42 after operation the frogs were decapitated and the right and left vestibules (denervated or control respectively) were rapidly dissected out.

#### Biochemical assays

**Dissection technique.** After decapitation, the head of the frog was placed in a Petri dish containing either 10 ml of 200 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffered to pH 7.3 (GAD assay) or 10 ml of 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.4 (ChAT assay) in order to prevent a possible dehydration of the tissue. For ChAT assay 1 mM eserine sulfate was added to the medium to inhibit the action of AchE. While immersed in the respective buffer, the inferior jaw was removed from the head and the bony temporal portion containing the vestibular apparatus was isolated from the surrounding part of the skull and the brainstem, and the otic capsule was opened to expose the labyrinth. The whole labyrinth was extracted with a microforceps and placed in the GAD or ChAT assay medium. Care was taken not to include the nearby ganglion. Pools of normal frog's vestibules and of vestibules of frogs from the right (denervated) side or left side (controls) at 3, 7, 15, 21 and 42 days after denervation were homogenized in a Teflon glass grinder and used as source of either enzyme. The overall dissection time never exceeded 15 min.

#### Glutamic acid decarboxylase (GAD) assay.

It was quantified by the radiochemical method described by Albers and Brady with minor modifications<sup>1</sup>. Triplicate samples

(330 ug protein each approximately) of a homogenate of 15 pooled either normal or right or left vestibules from denervated frogs were placed in a medium containing (in mM) L-glutamic acid 10; 2 mercapto-ethanol 10; pyridoxal phosphate 0.1; potassium phosphate 200. pH 7.3. The reaction was started by addition of 30 ul of [ $^{14}$ C]-DL glutamic acid (0.24 uCi) or [ $^{14}$ C] L-glutamic acid (0.12 uCi) with a specific activity of 100 and 50 mCi/mmol respectively. After incubation was performed at 30°C for 20 min, the reaction was stopped by injection of 0.2 ml of 1.8M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  $^{14}$ CO<sub>2</sub> released was captured in 0.1 ml of hyamine hydroxide contained in a microtube which was connected with a hose to another microtube with the reaction mixture (90 ul); tubes whose reaction was stopped at zero time were used as blanks. All tubes were further incubated at 30° for 60 min for equilibration. GAD activity was expressed as nmoles of glutamic acid decarboxylated/mg protein/hr.

Choline acetyltransferase (ChAT) activity. It was determined by a slightly modified radiochemical method,<sup>15-16-40</sup>. Triplicate samples were used (400 ug protein each approximately) of 10 normal frogs (both vestibules) or of a homogenate of 20 pooled right or left vestibules of denervated frogs in a medium containing (in mM) sodium phosphate 10; choline chloride 10; eserine sulfate 0.1; ethylenediaminetetra-acetate (EDTA) 10; sodium chloride 300; Triton X-100. 0.33%; [ $^3$ H]-acetylcoenzyme A 0.06 (0.26 uCi) with a specific activity of 850 mCi/mmol giving a final volume of 322 ul. The incubation time was 15 min at 30°C. The reaction was stopped by addition of 10ml of a cold 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer to each microtube which was contained in a vial.

Afterwards, 2 ml of tetraphenylboron in acetonitrile (2 mg/ml) were added to each vial to separate  $^3\text{H}$ -acetylcholine from unreacted  $^3\text{H}$ -acetylcoenzyme-A and 8 ml of a scintillation liquid (PPO-POPOP-toluene) were added. Blanks were stopped at zero time. ChAT activity was expressed in terms of pmoles of acetylcholine synthesized/mg protein/min.

Radioactivity of both methods were estimated in a Packard Tricarb Scintillation Spectrometer.

Protein measurement. It was determined by the method of Lowry et al<sup>22</sup> using bovine serum albumine as standard.

#### Materials

DL [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] glutamic acid and [ $^3\text{H}$ ]-acetylcoenzyme-A from New England Nuclear, Boston, Mass, and Amersham, Ill, USA. Hyamine hydroxide from Amersham, Ill., USA. Eserine sulfate, tetraphenylboron; S-acetyl-coenzyme A, ethylenediaminetetraacetate (EDTA), choline chloride, Triton X-100, 2,5 diphenyloxazole (PPO), 1,4 bis(2-(5-phenyloxazolyl) benzene (POPOP), bovine serum albumine, pyridoxal phosphate, 2-mercaptoethanol and L-glutamic acid were from Sigma St. Louis Missouri, USA. NaCl from Mallinkrodt, Mexico; toluene and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  from JTM Baker, Mexico. Acetonitrile, potassium and sodium phosphate from Merck, Mexico.

#### Results

GAD and ChAT activities in normal frog's labyrinths.

Activity of glutamic acid decarboxylase is present in a homogenate of the normal frog inner ear with a magnitude of 3.76

nmoles/mg protein/hr. This value is of the same magnitude as the one obtained for GAD (as shown by other authors) in various parts of the frog nervous tissue<sup>21-27</sup>

ChAT activity in a homogenate of the normal frog labyrinth was found to be 9.44 pmoles/mg protein/min and its magnitude was similar to that of other tissues in the CNS of the frog as shown in the literature<sup>28</sup>.

GAD and ChAT activities in the labyrinth of denervated frogs.

In denervated frogs, activity of GAD was of the same magnitude in the operated side as in the control side at day 3 after denervation (3.77 control; 3.74 operated) and remained constant as long as in day 42 after operation (3.89 control; 3.94 operated) (Table I). In contrast, ChAT activity showed a dramatic drop (from 9.26 in the control side to 3.94 in the denervated one i.e. 57% decrease) as early as in the 3rd day after denervation and decreased thereafter until it dropped to 12% of the value of the control side (9.77 in the non-operated side; 1.18 in the denervated one), (88% decrease) on the 42th day after denervation (Table I).

## DISCUSSION

### Presence of GAD and ChAT activities

Glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase activities with the same magnitude as their homologous enzymes in other regions of the frog CNS<sup>21-26-27</sup>, were found in homogenates of vestibular tissue of normal and denervated frogs, thus supporting a putative neurotransmitter role of GABA and Ach. in

the frog vestibule.

GAD has been considered a good marker of GABAergic cells because its presence has been demonstrated in GABAergic neurons<sup>13</sup> and its activity may reflect sites of GABA release.<sup>21-22</sup> In vestibular tissue, earlier investigation of GAD properties led to the conclusion that it may well be a homologous enzyme to the one present in nervous tissue and therefore could be used for neurotransmitter synthesis purposes.<sup>23</sup> Although, a recent report gives some evidence of GAD's role in glutamate transamination and thus of its possible role as inactivator of this aminoacid, this is very unlikely since this study was done with purified forms of GAD and thus may not reflect "in vivo" conditions.<sup>24</sup> Besides, the released glutamate (if so occurs) would be far from the reach of GAD, essentially a cytoplasmic enzyme<sup>25</sup>; further it is widely known that glutamate's action terminating mechanism is through high affinity uptake systems.<sup>7</sup>

As for ChAT, it is generally accepted as a marker for cholinergic terminals<sup>23,24</sup> and it is considered to be a reflection of nervous activity.<sup>12</sup> Furthermore vestibular ChAT has identical properties<sup>20</sup> as those described for ChAT of vertebrate neural tissue.<sup>16,25,27</sup> Therefore the finding of GABA and Ach synthesising enzyme in the frog vestibule may be used in support of their neurotransmitter candidacy in this system.

Effects of the right eighth nerve denervation procedure on GAD and ChAT activity.

When we measured GAD activity in the vestibule of the operated frog we found that this enzyme remained constant, as it.

was in the control, from days 3 to 42 after denervation suggesting that GAD might be confined to a cell element (or compartment) that did not suffer any alteration with surgery and that could well be the hair cell. In contrast, ChAT activity was found to decline after denervation in a fashion that can be correlated to a degeneration of efferent terminals as it has been described in the literature.<sup>26, 27</sup>

ChAT is transported by slow axoplasmic flow to the nerve terminals<sup>28</sup> thus the disappearance of the nerve terminals 3 days after excision of the vestibular nerve could account for the initial 50% decrease of ChAT activity in the denervated frog labyrinth. An almost thorough decrease of efferent connections may be the explanation for the marked decrease (88%) of ChAT activity observed 42 days after denervation thus suggesting localization of ChAT in nerve terminals, in this case, efferent connections as it has been described for nervous system, in the vestibule. A complete disappearance of ChAT activity as one would expect upon degeneration of all efferent boutons was never reached; similar results were obtained in experiments in rats in which excision of the VII (facial) nerve never caused a thorough decrease of ChAT activity in efferent nerve terminals of putative cholinergic nature.<sup>27</sup> The reason for both findings is at present unknown.

The above described experiments allow to postulate the confinement of GAD to an element or cell type<sup>of</sup> the sensory epithelium possibly the hair cell and the efferent synaptic bouton localization of ChAT.

That GAD is localized in hair cells and that ChAT is



confined to efferent synaptic boutons has been also suggested by ontogenetic studies in the chick<sup>27</sup> and guinea pig<sup>28</sup> isolated vestibullary cristae. In these studies GAD appeared very early in development when hair cells are already mature whereas ChAT was measurable only when efferent boutons reach the neuroepithelium to contact hair cells.<sup>27-28</sup> Also, experiments in which vestibules of streptomycin-treated guinea pigs (showing degeneration of hair cells and no alteration of efferent boutons) lost GAD activity along with treatment and did not present any modification in ChAT activity tend to support this suggestion.<sup>29</sup>

#### Concluding remarks

In the isolated labyrinth of the frog we found GAD and ChAT activity of the same range as their homologous enzymes in the CNS of the frog. This fact gives support to the involvement of GABA and Ach as neurotransmitters in the sensory vestibular epithelium of the frog.

Transection of the right eighth nerve led to a gradual decrease and an almost complete loss of ChAT activity whereas GAD activity was not altered.

Our results, although indirect, corroborate previous reports in which Ach was postulated as an efferent neurotransmitter in the vestibular sensory periphery of vertebrates, and tend to support the afferent neurotransmitter candidacy for GABA in this system. Experiments aimed to a more direct localization of the cells of origin of GAD and ChAT in the frog labyrinth are presently in progress.

#### Acknowledgements.

1. López is a recipient of a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CoNaCyT, Mexico) Fellowship. The authors gratefully acknowledge the generous sharing of the denervation procedure by the late Wolfgang Precht and his colleagues with G.M. during a stay at the Hirnforschung Institut, Zurich.

Thanks are also due to Dr. Vicente Honrubia for his valuable suggestions on the transection method while he visited our laboratory and to Dr. Gustavo Casas and Mr. Edmundo Perez for taxonomical classification of the frogs. Miss Yolanda Diaz de Castro kindly provided secretarial help.

#### REFERENCES

1. Albers, R.W. and Brady, R.D. (1959) The distribution of glutamate decarboxylase in the nervous system of the Rhesus monkey. *J. Biol. Chem.* 234, 926-928.
2. Annoni, J., Cochran, S.L. and Precht, W. (1983) Glutamate or a related substance may be the transmitter at the hair cell-primary afferent synapse in the vestibular labyrinth of the frog. *Experientia*, 39, 628.
3. Annoni, J.M. Cochran, S.L. and Precht W. (1984) Pharmacology of the vestibular hair cell-afferent fiber synapse in the frog. *J. Neurosc.* 4, 2106-2116.
4. Bernard, C. Cochran, S.L. and Precht, W. (1985) Presynaptic actions of cholinergic agents upon the hair cell-afferent fiber synapse in the vestibular labyrinth of the frog. *Brain Res.* 238, 225-236.
5. Bobbin, R.P. and Konishi, T. (1971) Acetylcholine mimics crossed olivocochlear bundle stimulation. *Nature New Biol.* 231, 222-223.
6. Caston, J. and Rousell, H. (1984) Curare and the efferent vestibular system. *Acta otolaryngol. (Stockh)* 97, 19-26.

7. Cotman, C.W. and Hamberger, A. (1978) Glutamate as a CNS neurotransmitter. Properties of release, inactivation and biosynthesis. In *Amino acids as neurotransmitters* (Fonnum, F. ed) pp. 379-412. Raven Press, New York.
8. Dechesne, C., Raymond, J. and Sans, A. (1984) Action of glutamate in the cat labyrinth. *Annals Otol. Rhinol & Laryngol.* 93,163-165
9. Dememes, D., Raymond, J. and Sans, A. (1983) Selective retrograde labelling of vestibular efferent neurons with  $^3\text{H}$  choline. *Neuroscience* 8, 285-290.
10. Dohlman, G.F. (1960) Histochemical studies of vestibular mechanisms. In *Neural mechanisms of the auditory and vestibular system* (eds. Rasmussen, G.L. and Windle, W.F.) pp 258-275. Springfield, Ill. Charles. C. Thomas.
11. Ehrenberger, K., Benkoe, E. and Felix, D. (1982) Suppressive action of picrotoxin a GABA antagonist on labyrinthine spontaneous nystagmus and vertigo in man. *Acta Otolaryngol.* 13,269-273.
12. Ekstrom, I. (1978) Acetylcholine synthesis and its dependence on nervous activity. *Experientia.* 34,1247-1253.
13. Felix, D. and Ehrenberger, K. (1982) The action of putative neurotransmitter substances in the cat labyrinth. *Acta Otolaryngol.* (Stockh) 93,101-105.
14. Flock, A. and Lam, D. (1974) Neurotransmitter synthesis in inner ear and lateral line sense organs. *Nature* 249,142-144.
15. Fonnum, F. (1975) A rapid radiochemical method for determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* 24,407-409.
16. Fonnum, F. (1975) Radiochemical assays for choline acetyltransferase and acetylcholinesterase. In *Research Methods in Neurochemistry Vol 3* (Rodnight, R. ed) pp 253-275. Plenum Press, New York.
17. Fonnum, F. (1968) The distribution of glutamic acid decarboxylase and aspartate transaminase in subcellular fraction of rat and guinea pig brain. *Biochem. J.* 106,401-412.
18. Frizel, M. and Sjostrand, J. (1974) Transport of proteins and cholinergic enzymes in regenerating hypoglossal neurons. *J. Neurochem.* 22,845-850.
19. Gacek, R.R. Nomura, Y., and Balogh, K. (1965) Acetylcholinesterase activity in the efferent fibers of the stato-acoustic nerve. *Acta Otolaryngol.* (Stockh) 59,541-553.

20. Gisselsson, L. (1960) Effect on microphonics of acetylcholine injected into the endolymphatic space. Preliminary report. Acta Otolaryngol. (Stockh) 51, 634-638.
21. Gold, B.I. and Roth, R.H. (1979) Glutamate decarboxylase activity in striatal slice: characterization of the increase following depolarization. J. Neurochem. 32, 883-888.
22. Guth, S.L. and Norris, C.H. (1984) Pharmacology of the isolated semicircular canal: effect of GABA and picrotoxin. Exp. Brain Res. 56, 72-78.
23. Hebb, C.O. and Whittaker, V.P. (1958) Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase. J. Physiol. (Lond.), 142, 187-196.
24. Hebb, C.O. (1963) Formation, storage and liberation of acetylcholine. In Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Vol 15 (Koelle, G.B. ed) pp. 55-88. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
25. Hersh, L.B. (1980) Studies on the kinetic mechanisms and salt activation of bovine brain choline acetyltransferase. J. Neurochem. 34, 1077-1081.
26. Hillman, D.E. (1969) Light and electron microscopical study of the relationships between the cerebellum and the vestibular organ of the frog. Exp. Brain Res. 9, 1-15.
27. Hoover, D.B. and Hancock, J.C. (1985) Effect of facial nerve transection on acetylcholinesterase, choline acetyltransferase and <sup>3</sup>H quinuclidinyl benzilate binding in rat facial nuclei. Neuroscience 15, 481-487.
28. Iturbe, A. G. and Meza, G. (1985) Probable localization of GABA and Ach synthesis in the vestibule of streptomycin-treated guinea pigs. Soc. Neurosc. Abst. 11, 696.
29. Iturbe, A.G. and Meza G. (1986) Asymmetrical development of GABA and acetylcholine synthesis in guinea pig vestibule. Int. J. Develop. Neurosci. 4 ( Supp 4) S32.
30. Iurato, S. Luciano, L., Fannese, E. and Reale, E. (1971) Acetylcholinesterase activity in the vestibular sensory areas. Acta Otolaryngol. (Stockh) 71, 147-152.
31. Iurato, S. Luciano, L., Fannese, E. and Reale, E. (1971). Histochemical localization of acetylcholinesterase (AChE) activity in the inner ear. Acta Otolaryngol. (Stockh) (Supp) 279, 1-15.
32. Lowry, H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

33. Llinas, R., and Precht, W. (1969) The inhibitory vestibular efferent system and its relation to the cerebellum in the frog. *Exp. Brain Res.* 8, 16-29.
34. McNally, W.J. and Tait, J. (1925) Ablation experiments on the labyrinth of the frog. *Amer. J. Physiol.* 75, 155.
35. Meza, G. (1984) Some characteristics of glutamic acid decarboxylase of chick ampullary cristae. *J. Neurochem.* 43,634-639.
36. Meza, G., Carabez, A. and Ruiz, M. (1982) GABA synthesis in isolated vestibullary tissue of chick inner ear. *Brain Res.* 241,157-161.
37. Meza, G., Gonzalez, V.M.T. and Ruiz, M. (1985) Specific  $^3\text{H}$  - aminobutyric acid binding to vestibular membranes of the chick inner ear. *Brain Res.* 337,179-183.
38. Meza, G., Hernández, C. and Ruiz, M. (1981)  $^3\text{H}$ -GABA uptake in isolated vestibullary cristae of chick inner ear. *Soc. Neurosci. Abstr.* 7,147.
39. Meza, G. and Hinojosa, R. (1987) Ontogenetic approach to cellular localization of neurotransmitters in the chick vestibule. *Hearing Res.* (in press).
40. Meza, G., López, I. and Ruiz, M. (1984) Possible cholinergic neurotransmission in the cristae ampullares of the chick inner ear. *Neuroscience Lett* 49,93-98.
41. Nisticó, G., DiGiorgio, R.M. De Luca, G. and Macalone, S. (1979) Effects of ethanolamine-O-sulfate and gamma-acetilenic-GABA on GABA content, -GAD and GABA-T in various areas of chick brain after intraventricular microinjection. *J. Neurochem.* 33,343-346.
42. Osborne, M.P. and Thornhill, R. (1972) The effect of monoamine depleting drugs upon the synaptic bars in the inner ear of the bullfrog (*Rana catesbiana*). *Z. Zellforsch.* 127,347-355.
43. Palkovits, M., Léránth, C., Jew, J. and Williams, T.H. (1982) Simultaneous characterization of pre- and postsynaptic neuron contact sites in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 2705-2708.
44. Porter, I.G., Spink, C.D., Martin, S.B. and Martin, D.L. (1985) Transaminations catalysed by brain glutamate decarboxylase. *Biochem. J.* 231,705-712.
45. Roberts, E. (1978) New directions in GABA research I: immunocytochemical studies of GABA neurons. In *GABA-neurotransmitters* (Krogsgaard-L.P., Scheel-Kruger, J. and Kofod, H., eds). pp 28-45 Munkgaard, Copenhagen.

46. Robbins, K.C. Backnigh, R.S. and Honrubia, V. (1967) Anatomical distribution of efferent fibers in the VIIIth cranial nerve of the bullfrog (*Rana catesbiana*) Acta Otolaryngol. (Stockh) 64,436-446.
47. Rossi, M.L. Valli, P. and Casella, C. (1977) Post-synaptic potentials recorded from afferent nerve fibers of the posterior semicircular canal in the frog. Brain Res. 135, 65-75.
48. Rossi, M.L., Prigioni, I., Valli, P. and Casella, C. (1980) Activation of the efferent system in the isolated frog labyrinth: Effects on the afferent epsps and spike discharge recorded from single fibers of the posterior nerve. Brain Res. 185,127-137.
49. Rossier, J., Spanditakis, Y. and Benda, P. (1977) The effect of  $Cl^-$  on choline acetyltransferase kinetic parameters and a proposed role for  $Cl^-$  in the regulation of acetylcholine synthesis. J. Neurochem. 29,1007-1012.
50. Russell, I.J. (1971) The pharmacology of efferent synapses in the lateral line system of *Xenopus leavis*. J. Exp. Biol. 54,643-656
51. Starr, M.S. (1973) Effect of dark adaptation in the GABA system in retina. Brain Res. 39,331-338.
52. Tapia, R., Sandoval, M.E. and Contreras, P. (1975) Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral activity. J. Neurochem. 24,1283-1285.
53. Valli, P. Costa, J. and Zucca, G. (1984) Local mechanisms in vestibular receptor control. Acta Otolaryngol. (Stockh) 97,611-618.
54. Valli, P., Zucca, G., Prigioni, I., Botta, L., Casella, C. and Guth, P.S. (1985) The effect of glutamate on the frog semicircular canal. Brain Res. 330,1-9.
55. Vega, R., Soto, E., Budelli, R. and González-Estrada, M.I. (1987) Is GABA an afferent transmitter in the vestibular system? Hearing Res. (in press).
56. Wachtler, K. (1981) The regional distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetyl cholinesterase in vertebrate brains of different phylogenetic levels. In Cholinergic Mechanisms (Pepeu, G. eds). pp 54-71 Plenum Press. New York.
57. Werman, R. (1966) Criteria for identification of a central nervous system transmitter. A review. Comp. Biochem. Physiol. 18,745-766.
58. Wersall, J. (1956) Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullaris in the

guinea pig. Acta Otolaryngol. (Stockh) Suppl 126.1-65.

59. Yates, R.A. and Taberner, P.V. (1975). Glutamic acid GABA and their metabolizing enzymes in the frog central nervous system. Brain Res. 84,399-407.

Table 1 GAD and ChAT activity in homogenates of control and denervated frogs labyrinth\*

GAD ACTIVITY

DAY	CONTROL SIDE	DENERVATED SIDE	% CONTROL†
3	3.77 ± 0.16 (5)	3.74 ± 0.11 (5)	100 ± 1.63
7	3.82 ± 0.12 (5)	3.86 ± 0.20 (5)	100 ± 1.20
15	3.75 ± 0.12 (3)	3.77 ± 0.03 (3)	100 ± 0.75
21	3.70 ± 0.09 (3)	3.65 ± 0.10 (3)	100 ± 0.45
42	3.89 ± 0.10 (3)	3.94 ± 0.20 (3)	100 ± 2.25

ChAT ACTIVITY

3	9.26 ± 0.34 (5)	3.94 ± 0.17 (5)	42.64 ± 1.76 (57.36)‡
7	9.63 ± 0.16 (5)	3.64 ± 0.32 (5)	40.08 ± 4.08 (59.92)‡
15	9.84 ± 0.50 (3)	3.49 ± 0.20 (3)	35.67 ± 3.00 (64.33)‡
21	9.48 ± 0.51 (4)	3.14 ± 0.34 (4)	31.40 ± 3.40 (68.60)‡
42	9.77 ± 0.30 (3)	1.18 ± 0.17 (3)	12.10 ± 1.77 (87.90)‡

\*Activity of GAD is expressed as nmoles/mg protein/hr ± S.E.M. of the experiments shown in parentheses. ChAT activity is reported as pmoles/mg protein/min S.E.M. for the number of experiments which appear in parentheses. † expressed as percent of the value found in the control side (non-denervated side). ‡ Percent diminution with respect to control (non-denervated) side.



CHARACTERIZATION OF CHOLINERGIC NEUROTRANSMISSION IN THE  
FROG VESTIBULE. G. Mesa\* and I. López, Dept. Neurociencias  
CIFE, UNAM 04510, México, D.F.

The efferent neurotransmitter in the vertebrate vestibular sensory periphery is believed to be acetylcholine (ACh). In support to this assumption, neurochemical parameters concerning the ACh system were measured using the isolated frog vestibule as a model.

Choline acetyltransferase (CAT) and acetylcholinesterase (AChE) were quantified in homogenates of the frog vestibule in suitable incubation medium by the Fonnum and Ellman methods respectively.  $^3\text{H}$ -choline uptake and  $^3\text{H}$ -ACh release were measured in the complete labyrinth of the frog, in Ringer, pH 7.4 at 30°C; for  $^3\text{H}$ -ACh release, 48 mM  $\text{K}^+$  was used as depolarizing agent.  $^3\text{H}$ -ACh was separated from  $^3\text{H}$ -choline by phosphorylation of this latter.

CAT and AChE activity in homogenates of the frog vestibule were found in similar magnitudes as their homologous enzymes in the frog nervous tissue. A sodium and energy dependent mechanism for  $^3\text{H}$ -choline uptake and a Ca-dependent release of trur ACh could be detected in the complete labyrinth of the frog.

These results may be taken as a fulfillment of the criteria to implicate ACh as a neurotransmitter in the frog vestibule, although the precise localization of its system can not be assessed at present.

(Partially supported by PCEBNA-020857 of CONACyT, México).

*J. Neurochem.*, Vol. 44, Suppl., 1985

334.6 BIOCHEMICAL STUDIES ON THE CHOLINERGIC NEUROTRANSMISSION OF THE PACG VESTIBULE. G. Mesa, P. Cuadras\* and J. Lopez\* Dept. Neurociencias, CIPIC UNAM Apdo Postal 70-600 04510 Mexico, D. F.

Efferent neurotransmission in the frog vestibule is possibly cholinergic as evidenced by electrophysiological and histochemical techniques. However, no biochemical approach has been explored to assess this assumption. Some of the biochemical criteria often used in trying to implicate a substance as a neurotransmitter candidate are the demonstration of its synthesis and of the presence of its inactivating mechanism. Acetylcholine (ACh) is synthesized with the participation of choline acetyltransferase (CHAT) and its removal from the vicinity of the synapse is carried out through its hydrolysis by acetylcholinesterase (AChE). Choline, product of this hydrolysis, is rapidly taken up by the presynapse and used for ACh synthesis. Therefore as a mean to demonstrate ACh participation in neurotransmission we decided to measure CHAT, AChE and choline transport in the frog isolated vestibule. The complete vestibule was dissected out from adult frogs (*Rana pipiens*). CHAT was measured by the Fonnus method using  $^3\text{H}$ -AcetylCoA as substrate. In homogenates of the frog tissue AChE was determined in a membrane fraction of the frog vestibule by the Ellman method following the hydrolysis of acetylthiocholine used as substrate at 412 nm in the spectrophotometer. Choline transport was assessed by measuring the uptake of  $^3\text{H}$ -choline (0.5  $\mu\text{M}$ ) of whole frog vestibule incubated in frog Ringer solution either in the presence of  $\text{K}^+$  or when this ion was substituted by choline chloride. All incubations took place at 30°C. CHAT activity was of 0.06 nmoles/min/mg protein and it was depressed by 80% when measured in the absence of chloride. AChE was of 0.01 nmoles/min/mg protein and it was inhibited by 100% when incubated with 10  $\mu\text{M}$  eserine.  $^3\text{H}$ -choline was accumulated by frog vestibule 10-fold in an hour and it was highly depressed when  $\text{K}^+$  was omitted from the incubation medium or when it took place at 4°C. These evidences support the involvement of acetylcholine in neurotransmission in the frog vestibule. Experiments aimed to locate the cells responsible for the activities observed performed in distinct organs composing the frog vestibule are presently underway.

Supported in part by Grant PCERBNA020897 of CONACYT (Mexico)

207.14

POSSIBLE EFFERENT NEUROTRANSMISSION IN THE INNER EAR OF THE FROG  
 C. Mera, I. López and A. Ferriz-Velasco, Dept. Neurociencias, CICE UNAM  
 Apdo. Postal 70-600 04510 México, D.F. (CM and IL), Div. Developmental  
 Biology, Unidad de Investigación Bioméd. Occidente, I.M.S.S. Cuadela-  
 Jara, Jal. MEXICO (AFV)

Neurotransmission in the sensory periphery of the vestibular system is chemical in nature; the efferent neurotransmitter is apparently acetylcholine (ACh). In earlier studies we demonstrated choline acetyltransferase (ChAT) activity in homogenates of frog vestibule and choline transport in the whole vestibule of this anfibian (1); however with this type of experiments, the cell of origin of these biochemical parameters can not be assessed. With the purpose of localization of the ACh-utilizing cell by elimination of certain population of terminals, we used Millman model (2) in which the VIII cranial nerve of the frog was excised and degeneration of efferent nervous fibers was observed. We utilized adults frogs (*Rana pipiens*) in which denervation of the right VIII cranial nerve was performed leaving the left nerve intact as control. We determined ChAT activity as previously described (3) in the frog vestibule after 3, 7 and 15 days of surgery. For morphological studies the right and left vestibules obtained from denervated frogs were fixed "in situ" with cacodylate buffered-1% osmium tetroxide, dehydrated and embedded in epoxy resins. One micrometer thick sections were collected on glass slides and stained with toluidine blue for examination under light microscope. We observed gradual decreased of the activity with time after denervation until it reached 50% of ChAT present in the control side. Morphological study of vestibular nerves in the vicinity of receptor zones revealed a Wallerian degeneration of some nerve fibers randomly distributed among normal looking fibers. Various bouton-like nerve endings appeared markedly basophilic at the basal portion of receptor zones. No structural alterations were seen at both, the receptor areas and the vestibular nerve trunks of the non-denervated vestibule of operated frogs, of both vestibules obtained from non-operated animals. Thus apparently the only affected structures are the efferent endings. These biochemical and morphological results show that ChAT in the inner ear of the frog appears to be localized at least in 50% of efferent terminals which probably use ACh as mediator at the level of the sensory periphery of vestibular system.

1.-Neurosci. Abs. 10, 1137, 1984.

2.-Exp. Brain Res. 9, 1-15, 1969.

3.-Neurosci. Lett. 49, 93-97, 1984.

Supported in part by Grant PCCBNA020897 of CONACYT (México)

177. POSSIBLE CELLS OF ORIGIN OF GABA AND ACETYLCHOLINE SYNTHESIS IN THE FROG VESTIBULE. \*I. Lopez, G. Meza. Dept. Neurociencias, IFC UNAM, Apdo. Postal 70-600, 04510 Mexico, D.F., Mexico.

Neurotransmission in the sensory periphery of the vestibular system is chemical in nature. GABA and acetylcholine (Ach) have been implicated as afferent and efferent neurotransmitters, respectively. With the aim of supporting this implication, we have measured the enzymes of synthesis of these neurotransmitters: glutamic acid decarboxylase (GAD) for GABA and choline acetyltransferase (ChAT) for Ach, in homogenates of the whole vestibule in the frog. To localize the cells of origin of these enzymes by elimination of certain populations of terminals, we used a model in which the eighth cranial nerve (right side) of the frog is excised and degeneration of efferent nerve fibers and terminals has been observed. We utilized adult frogs (*Rana moctezumae*) in which denervation of the right cranial nerve was performed, leaving the left nerve intact as control. We determined GAD and ChAT activity as already reported (Meza, *Neurochem.* 43:634, 1984; Meza et al. *Neurosci. Lett.* 49:93, 1984) in both left and right frog vestibules 3, 7, 15 and 21 days after surgery. For morphological studies the right and left vestibules obtained from denervated frogs were fixed in *in situ* with cacodylate-buffered 1% osmium tetroxide, dehydrated, and embedded in epoxy resins; one-micrometer thick sections were collected on glass slides and stained for examination under light microscope.

We observed that GAD activity in the operated side was of the same magnitude as the control side at day 3 after denervation and remained constant until day 21 after operation. The value for ChAT activity in the denervated labyrinth dropped to 55% 3 days after surgery, with respect to the control side, and gradually decreased to 35% of the control vestibule at day 21. In the innervated side, a morphological study of the vestibular fibers in the vicinity of receptor zones revealed a wallerian degeneration of some fibers randomly distributed among normal looking fibers. A normal appearance of the fibers was observed in the control side. These biochemical and morphological results show that GAD appears to be localized in some cells (most probably the hair cells) of the epithelium that did not suffer any alteration after the excision and that ChAT is probably located in efferent endings, which degenerate with denervation, GABA and Ach being their respective neurotransmitters. Electron microscopy studies to corroborate this statement are now in progress.

Association For Research in Otolaryngology, Tenth midwinter research meeting. Feb 1-5, 1987, pp 142 .