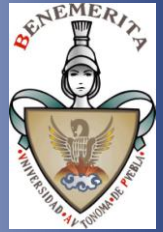


**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Instituto de Fisiología
Laboratorio de Neurofisiología Sensorial**



**Tesis: Modulación dopaminérgica de la actividad
de las neuronas aferentes cocleares en la rata**

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias

Presenta: MC Catalina Valdés Baizabal

Directores: DC Enrique Soto y DC Rosario Vega

Julio 2014

ÍNDICE

Resumen	4
Introducción	6
Cóclea	6
Órgano de Corti	7
Funcionamiento general de la cóclea	8
Células receptoras	8
Inervación de las células ciliadas	9
Inervación eferente de las CCE	10
Inervación aferente de las CCE	11
Inervación eferente de las CCI	12
Inervación aferente de las CCI	12
Ganglio espiral	13
Corrientes iónicas de las neuronas del ganglio espiral	14
Corriente de calcio	14
Corriente de sodio dependiente de voltaje (I_{Na})	14
Corriente de potasio (I_K)	15
Corriente catiónica activada por hiperpolarización (I_h)	16
Otras corrientes iónicas	17
Colocalización de neurotransmisores	17
Dopamina	19
Receptores dopaminérgicos	21
Dopamina y receptores dopaminérgicos en el oído interno	26
Planteamiento del problema	31
Hipótesis	31
Objetivo general	31
Objetivos particulares	32
Metodología	32
Aislamiento y cultivo de neuronas del ganglio espiral	32
Fármacos	33
Soluciones	33
Registro electrofisiológico	34
Fijación de voltaje	34
Fijación de corriente	35
Análisis estadístico	36
Resultados	37

Fijación de voltaje. Corriente de sodio aislada	37
Fijación de corriente	54
Discusión	59
Conclusiones	69
Referencias	70

RESUMEN

El órgano de Corti es el órgano receptor del oído interno en el que hay dos tipos de células sensoriales, células ciliadas internas y células ciliadas externas, las cuales se diferencian por su posición dentro de éste, ultraestructura, disposición de los cilios e innervación. Las células ciliadas internas son innervadas aferentemente por neuronas tipo I y eferentemente por neuronas que provienen del haz olivococlear superior lateral, mientras que las células ciliadas externas son innervadas por neuronas aferentes tipo II y por neuronas eferentes provenientes del haz olivococlear superior medial.

Cuando las células ciliadas internas se despolarizan ante un estímulo mecánico liberan glutamato hacia la terminal aferente tipo I sobre la cual hacen contacto las eferentes laterales que liberan sustancias químicas transmisoras, entre ellas, dopamina.

Las neuronas aferentes tipo I expresan receptores dopaminérgicos y se ha propuesto que la dopamina y los agonistas dopaminérgicos ejercen un efecto protector sobre dichas neuronas ante estímulos sonoros intensos o en condiciones de hipoxia, ambas relacionadas con fenómenos de excitotoxicidad secundaria a la activación de receptores glutamatérgicos. Estudios con registros de potenciales de campo sugieren que la dopamina disminuye la tasa de disparo de las neuronas aferentes cuando ésta es inducida por NMDA o AMPA. También está descrito que la activación de receptores glutamatérgicos aumenta la liberación de dopamina vía un mecanismo mediado por GABA.

En mi trabajo de maestría reportamos que la dopamina modula las corrientes iónicas de las neuronas aisladas del ganglio espiral de forma dependiente de la concentración y particularmente demostramos que la corriente de sodio aislada disminuye de forma significativa.

Sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción de la dopamina a nivel celular, motivo por el cual decidimos abordar este problema mediante el estudio de los efectos de la dopamina y sus agonistas sobre la corriente de sodio y proponer modelos que expliquen los mecanismos y alcances del control central dopaminérgico de la entrada aferente en la vía coclear. Nuestra hipótesis es que la activación de receptores dopaminérgicos en las neuronas aferentes cocleares modula de forma inhibitoria a la corriente de sodio activada por voltaje constituyendo un sistema de control de la ganancia de dichas neuronas, a través de un mecanismo mediado por proteínas G.

Para comprobar dicha hipótesis nos planteamos estudiar la modulación de la corriente de sodio por activación de receptores dopaminérgicos y evaluar la participación de vías intracelulares para establecer una propuesta de mecanismo de acción en neuronas aferentes cocleares en cultivo primario. Se utilizaron ratas de 8 o 9 de edad postnatal sin distinción de género, así como herramientas farmacológicas. Los

experimentos fueron realizados mediante la técnica de fijación de voltaje y fijación de corriente en configuración de célula completa.

Como resultados encontramos disminución significativa de la corriente de sodio con la aplicación de dopamina de tal modo que hay una dependencia sigmoidea de la concentración en la instalación del efecto y no es totalmente bloqueado con los antagonistas. Así mismo encontramos disminución de la corriente de sodio con la aplicación de los agonistas para cada familia de receptores. En condiciones de fijación de corriente encontramos que el agonista D1, dihidrexidina, produce una reducción significativa en la descarga de potenciales de acción. De acuerdo a las herramientas usadas para evaluar el mecanismo de acción intracelular, los resultados hasta ahora apuntan a un efecto mediado por proteínas G con una participación de PKA.

INTRODUCCIÓN

La audición humana comienza con la interacción de la energía sonora (mecánica) en el oído. La cóclea transforma dicha energía mecánica, en señales eléctricas que finalmente activan la vía auditiva y proyectan a la corteza auditiva, tras un complejo procesamiento que se realiza en varios relevos subcorticales. Este proceso tiene una participación fundamental en los procesos psíquicos superiores particularmente los relacionados con el lenguaje hablado. El proceso fisiológico de la audición implica un conjunto de procesos de orden molecular, y celular actuando en armonía.

Cóclea

La cóclea consiste de tres tubos membranosos o escalas adyacentes en forma de caracol, llamadas escala vestibular, escala timpánica y escala media; está revestida por hueso laminar, que a su vez es parte del hueso temporal (Raphael y Altschuler, 2003), y como eje central tiene una columna ósea, el modiollo.

La escala vestibular y timpánica, están llenas con perilinfa, líquido que tiene una composición iónica que remeda otros fluidos extracelulares. Entre estas escalas se localiza la escala media que está llena de la endolinfa, un fluido de composición inusual (con alta concentración de potasio) que baña la porción apical del órgano de Corti. En la base de la cápsula ótica hay dos aberturas: la ventana oval en la escala vestibular y la ventana redonda en la escala timpánica. Cerca del ápex de la cóclea se comunican ambas escalas, vestibular y timpánica en un área que se denomina helicotrema. La membrana basilar separa la escala media de la escala timpánica y sobre ella se asienta el órgano de Corti. Las propiedades mecánicas de la membrana basilar no son uniformes, sino que cambian de manera progresiva a lo largo de ella (Dallos *et al.*, 1996; Raphael y Altschuler, 2003). En su extremo apical, el ancho de la membrana basilar humana es mayor que en la base del caracol y el rango de frecuencias está tonotópicamente distribuido a lo largo del ducto coclear de la base al ápex de tal forma que en la base de la cóclea es la región donde se detectan las frecuencias altas mientras que en el ápex se detectan las frecuencias bajas (Figura 1) (Dallos *et al.*, 1996; Robles y Ruggero, 2001; Soto *et al.*, 2003). Por el contrario el laberinto óseo disminuye su ancho de la base al ápex (Dallos *et al.*, 1996; Robles y Ruggero, 2001).

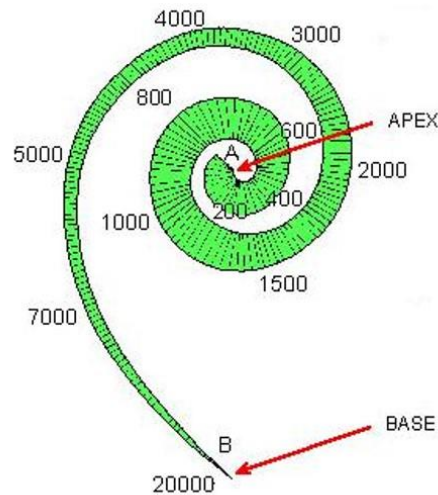


Fig. 1 Distribución tonotópica de frecuencias en la cóclea (expresadas en Hz). Los sonidos graves activan la parte apical, en tanto que los agudos estimulan la región basal de la cóclea. (tomado de Port 2007).

Órgano de Corti

El órgano de Corti se considera el órgano receptor del oído interno y su análisis estructural fino ha permitido identificar varios tipos celulares, así como especular y probar experimentalmente sus funciones (Raphael y Altschuler, 2003). Está formado en su extremo superior por la membrana tectoria y por abajo por la membrana basilar. En su parte central destacan las células sensoriales (células ciliadas internas y externas) cuyas especializaciones apicales son responsables de la detección de estímulos y de la transducción sensorial. Adyacente a las células ciliadas sensoriales están las células especializadas para el soporte mecánico y metabólico. En el lado endolinfático del limbus espiral, las células parecen tener una función secretora y ser responsables de la formación de la membrana tectoria (Figura 2). Algunas células separan los compartimentos que contienen la endolinfa y la perilinfa y otras transportan iones y pueden participar en la formación y mantenimiento de esos dos fluidos. En su extremo basal, con especializaciones sinápticas características, las células ciliadas contactan con las fibras nerviosas aferentes y eferentes (Dallos *et al.*, 1996).

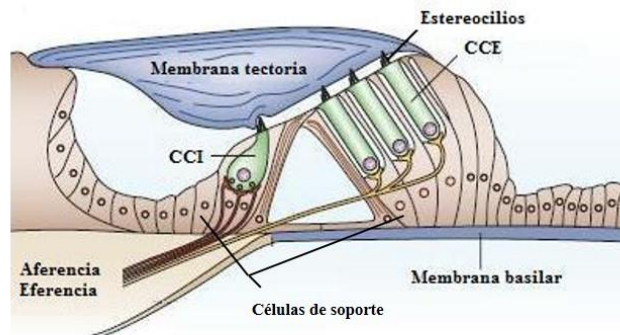


Fig. 2 Esquema de la estructura del órgano de Corti. Se observan los siguientes componentes: la membrana tectoria, las células ciliadas internas (CCI), las células ciliadas externas (CCE), células de soporte, fibras nerviosas (aferentes y eferentes) y la membrana basilar (modificado de Robert y Hackey, 2006).

Funcionamiento general de la cóclea

Cuando la membrana basilar oscila en respuesta a un sonido, arrastra consigo al órgano de Corti produciendo que la parte central se desplace como una bisagra en relación a la membrana tectoria. Entonces un desplazamiento hacia arriba de la membrana basilar, determina que los cilios sean desplazados por la acción de la membrana tectoria, causa de la despolarización de las células mientras el movimiento hacia abajo provoca su hiperpolarización (Dallos *et al.*, 1996). Es así como se transducen las vibraciones mecánicas en señales eléctricas. De las células ciliadas se libera el neurotransmisor y éste a su vez depolariza a las terminales aferentes que le contactan.

Células receptoras

Existen dos tipos de células sensoriales, células ciliadas internas (CCI) y externas (CCE), que pueden ser diferenciadas por su posición en el órgano de Corti, ultraestructura, disposición de los cilios e inervación. Aunque las células sensoriales difieren estructural y funcionalmente, también tienen algunas similitudes. Ambos tipos celulares tienen un conjunto de cilios que se proyectan de la superficie apical de las células sensoriales hacia el espacio endolinfático. En la superficie apical de cada célula, los cilios están en varias hileras dispuestas en forma de "U" (CCI) o "W" (CCE) (Dallos *et al.*, 1996).

Las CCE tienen forma cilíndrica y se organizan en tres filas a lo largo del ducto coclear, aunque en algunas ocasiones hay cuatro o cinco filas especialmente en las vueltas apicales o en mamíferos especializados en oír bajas frecuencias. La longitud de estas células varía lo largo de la cóclea, en relación con la tonotopía. Su núcleo es redondo y está localizado en la porción basal del cuerpo (Figura 3).

Las CCI tienen forma de pera con un núcleo localizado en el centro (figura 3). Están dispuestas en una fila a lo largo del ducto coclear y están en contacto con células

pilares internas y células falángicas (Raphael y Altschuler, 2003). Funcionalmente existen diferencias importantes entre ellas, ya que las células CCE no hacen un contacto estrecho con la membrana tectoria, tienen una peculiar capacidad contráctil dependiente de voltaje y, más que como receptores, se les ha caracterizado como células efectoras relacionadas con los procesos de selectividad de frecuencias y amplificación coclear. De hecho su innervación es predominantemente eferente y tienen escasa innervación por neuronas aferentes (solamente el 5% a pesar de que el número de CCE es 3 o más veces el de CCI). Las CCI son consideradas como los receptores primarios del sonido, su función es absolutamente esencial para los procesos auditivos.

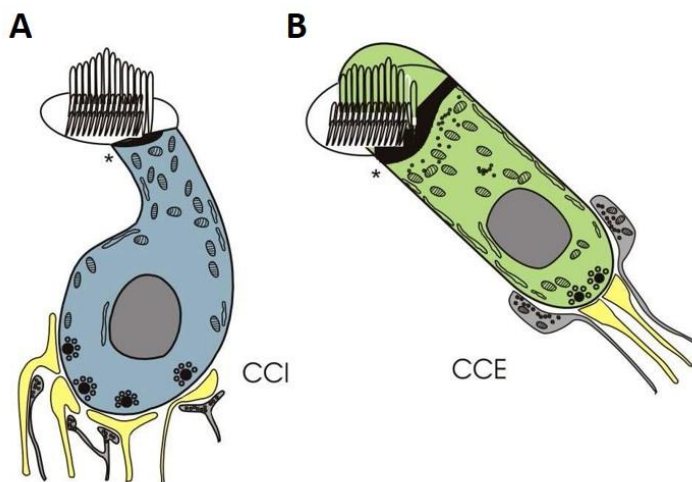


Fig. 3 Células ciliadas del órgano de Corti. Esquema de las células ciliadas internas y externas que muestra la forma característica de los cilios, el núcleo y su innervación. Las células en color amarillo contactando a las ciliadas representan a las neuronas aferentes y las grises corresponden a las eferentes. A) Para las células ciliadas internas las aferentes son tipo I y las eferentes provienen del haz olivococlear superior lateral, y B) para las células ciliadas externas son aferentes tipo II y las eferentes provienen del haz olivococlear superior medial.

Inervación de las células ciliadas

La sinaptogénesis de las CCI y CCE, empieza muy temprano en la cóclea de los mamíferos: se pueden observar claras diferencias sinápticas alrededor de 10 días antes del inicio de la función auditiva, las CCI parecen tener un estado avanzado de maduración comparado con las CCE. Además, la sinapsis en la CCI tiene menores cambios durante el desarrollo, que la sinaptología de las CCE (Pujol, 1985).

Los cambios en el desarrollo de las CCI, si es que los hay, conciernen a una reducción de la ramificación de las aferentes o una disminución en el número de contactos presinápticos. Las terminales eferentes con vesículas a nivel de CCI se observan alrededor del mismo tiempo que las sinapsis aferentes. En las eferentes la maduración se caracteriza por la desaparición con la edad de conexiones directas entre eferentes y CCI. En el estado adulto, las eferentes hacen contacto casi exclusivamente con las dendritas aferentes (Pujol, 1985).

La sinaptogénesis en las CCE sigue un modelo completamente distinto al de las CCI. El primer estado, alrededor de 10 días antes del inicio de la función, se caracteriza porque la base de las CCE está rodeada completamente por dendritas aferentes y

puede haber algunas especializaciones presinápticas en las CCE (Pujol, 1985), por lo que se le ha denominado como “estado de célula sensorial”. El primer cambio en las células ciliadas externas es una rápida y marcada disminución en el número de especializaciones presinápticas. Hasta cerca del momento en que se pueden registrar los potenciales cocleares, no se reconocen terminales eferentes bajo las CCE. Cuando llega el momento en que pueden registrarse dichos potenciales, las CCE aún están rodeadas por aferentes pero adicionalmente, ya hay eferentes haciendo sinapsis axodendríticas transitorias con algunas de ellas. Se observa, entonces, una clase de competición sináptica; las terminales eferentes alcanzan finalmente las membranas de las CCE y parecen estar empujando fuera la mayoría de las dendritas aferentes, las cuales se retraen. El estado final de maduración se caracteriza por una predominancia de sinapsis eferentes, con unas pocas dendritas aferentes (Pujol, 1985).

Respecto al desarrollo de la función coclear, mediante el registro de los potenciales microfónicos así como la determinación del umbral en que aparece la selectividad a las frecuencias, en la tabla 1 se muestra la cronología del desarrollo de la cóclea.

Tabla 1. Tiempo en que inicia la función coclear en que se completa el desarrollo anatómo-funcional de la cóclea. (ddn = días después de nacer; dan = días antes de nacer; man = meses antes de nacer). Modificada de Pujol, 1985.

Especie	Inicio de la función coclear	Cóclea madura
Ratón	10 – 12 ddn	16 – 18 ddn
Rata	9 – 11 ddn	16 – 18 ddn
Conejo	5 ddn	20 – 25 ddn
Perro	4 ddn	
Gato	Al nacer	15 – 20 ddn
Cobayo	15 – 12 dan	5 ddn
Hombre	5 man	2 man

Inervación eferente de las CCE

Las CCE están directamente bajo la influencia de neuronas eferentes mediales que hacen contacto directo sobre sus superficies basolaterales (Pujol, 1994) (figura 4). Las fibras nerviosas eferentes de las CCE provienen del complejo olivar superior medial y consisten de dos subtipos morfológicos: fibras largas que contienen mitocondrias y neurotúbulos (tipo I) y fibras pequeñas que contienen neurofilamentos (tipo II). Pedemonte y Narins reportan que la densidad de fibras tipo I disminuye de la base al

ápex, correspondiendo a la frecuencia de dispersión a lo largo de la membrana basilar. La densidad de fibras eferentes tipo II es máxima en la base y el ápex y mínima en la parte media de la cóclea. Ésta mínima densidad, curiosamente, corresponde a la región de la membrana basilar donde está localizado el rango de frecuencia de máxima sensibilidad (Pedemonte y Naris, 1999).

En general la mayoría de las fibras eferentes terminan en la primera fila de CCEs existiendo además una graduación de la base al ápex, con el mayor número de terminales en la base, el máximo número de 9 terminales eferentes por CCE está en la región entre 6 y 24 kHz (Liberman *et al.*, 1990). También se ha observado que hay una disminución en el número de terminales de la primera a la tercera fila de las CCEs. (Liberman *et al.*, 1990). Varios son los neurotransmisores implicados en el sistema eferente, de las cuales la acetilcolina es la más importante. También se ha determinado la participación de GABA, CGRP (Raphael y Altschuler, 2003) y péptidos opioides (Fex *et al.*, 1981; Jongkamonwivat *et al.*, 2003; Kho *et al.*, 2006). Así mismo, se describieron fibras que contienen serotonina como sustancia neuroactiva y que constituyen una innervación coclear antes desconocida, distinta a la eferente medial y que contacta a las células ciliadas externas (Gil-Loyzaga *et al.*, 2000).

Inervación aferente de la CCE

Las neuronas que inervan las células ciliadas externas son las aferentes tipo II (Figura 4). Éstas corresponden al 5 % del total de las neuronas del ganglio espiral, aproximadamente. Cada fibra aferente se subdivide en la parte dendrítica, y sus botones hacen sinapsis con varias CCEs. A su vez, cada CCE hace sinapsis con muchas fibras aferentes tipo II (Pedemonte y Naris, 1999). Se considera que una sola fibra puede recibir información de entre 6 y 100 CCEs, usualmente de la misma hilera. Al igual que con otras características, hay una gradación morfológica en el número de terminales sinápticas por CCE de aproximadamente 3 por célula en la base a 15 por célula en el ápex de la cóclea (Liberman *et al.*, 1990).

La mayoría de las células ganglionares tipo II hacen sinapsis con las CCEs de la primera hilera que son las que a su vez tienen el mayor número de contactos sinápticos. Un menor porcentaje de estas células son más ramificadas y hacen contacto con la tercera hilera de CCEs. (Liberman *et al.*, 1990).

Se considera que el neurotransmisor liberado de la base de la CCE hacia la aferente postsináptica es el glutamato (Pedemonte y Naris, 1999).

Inervación eferente de las CCI

Las fibras eferentes que contactan a las CCIs forman terminales finas que no hacen contacto directo sobre la célula ciliada, sino con la neurona aferente que la inerva (Figura 4). Este tipo de inervación viene del complejo olivar superior lateral (Pujol, 1994), en el cual hay dos poblaciones de neuronas (ratón), unas son las neuronas principales, las cuales se relacionan con la detección de diferencias en la intensidad interaural y otra población la constituyen las neuronas eferentes del sistema olivococlear lateral que proyectan hacia la cóclea. Las neuronas olivococleares laterales poseen una prominente corriente saliente transitoria I_A . Ambos tipos neuronales reciben entrada sináptica glutamatérgica y glicinérgica (Sterenborg *et al.*, 2010). Las neuronas del sistema olivococlear tienen numerosas terminales eferentes, característicamente repletas de vesículas sinápticas, contactando a todas las CCIs. Se han descrito que estas neuronas eferentes liberan diversos neurotransmisores tales como: acetilcolina, dinorfina, CGRP, encefalinas, GABA, péptidos opioides y dopamina (Raphael y Altschuler, 2003). También hay fibras que contienen serotonina que constituyen una inervación distinta a la eferente lateral y que contacta las células ciliadas externas (Gil-Loyzaga *et al.*, 2000).

Inervación aferente de las CCI

Las células ciliadas internas reciben inervación aferente constituida por neuronas aferentes tipo I, las cuales son gruesas y mielinizadas (Figura 4). Su población en el ganglio espiral corresponde aproximadamente al 95% del total de las neuronas (Pujol, 1994). Cada axón inerva una sola célula ciliada, pero cada CCI hace contacto sináptico con varias neuronas aferentes, constituyendo un sistema altamente divergente (Pedemonte y Naris, 1999).

Las sinapsis entre células ciliadas internas y neuronas aferentes tipo I tienen una delgada membrana presináptica y una densa membrana postsináptica. A su vez en la hendidura sináptica se observan filamentos y material granular (Pedemonte y Naris, 1999). Se considera que el principal neurotransmisor involucrado en esta sinapsis es el glutamato (Raphael y Altschuler, 2003; Eybalin, 1993).

No todas las fibras postsinápticas son idénticas morfológicamente, ni reciben la misma cantidad de sinapsis eferentes. Eso hace que entre ellas haya diferencias fisiológicas así como cambios en el umbral y frecuencias de descarga. Las fibras gruesas de bajo umbral y alta frecuencia de descarga espontánea se agrupan cercanas a las células pilares internas, las finas de alto umbral y baja frecuencia de descarga se encuentran en la cara modiolar de las CCIs (Pedemonte y Naris, 1999).

La selectividad en la frecuencia de las neuronas del ganglio espiral está determinada, primariamente, por la localización de la célula ciliada interna inervada sobre el eje tonotópico de la cóclea proporcionando un código de lugar para cada frecuencia. La densidad de inervación varía a lo largo de la cóclea (Meyer *et al.*, 2009).

En un estudio en ratones y gerbos se estableció que es en la región media de la cóclea donde hay mayor número de sinapsis aferentes por CCI (17 en ratón y 24 en gerbos) y declinan hacia el ápex y la base. La mayor parte de contactos sinápticos aferentes se ubican en la región basal de las CCI. Aun cuando son diferentes sustancialmente en número las sinapsis en las CCI, difieren muy poco en su estructura, no hay diferencias significativas en el tamaño y forma de las sinapsis en listón, ni en la longitud de la densidad postsináptica entre sinápsis mediococlear y apical (Meyer *et al.*, 2009).

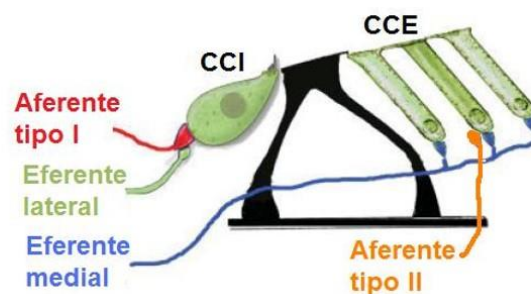


Fig. 4 Esquema de la inervación de las CCI y las CCE. Las CCI son inervadas por terminales aferentes tipo I y por eferentes laterales, mientras que las CCE son inervadas por aferentes tipo II y por eferentes mediales (Modificado de Fitzakerley 2007)

Ganglio espiral

En el modiollo están acomodados los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales de primer orden (formando el complejo ganglio espiral) (Szabó *et al.*, 2002). Como ya se mencionó, la mayoría de las neuronas (95%) son células del ganglio espiral tipo I (Spoendlin, 1972; 1985). Desde el punto de vista funcional en registros de la actividad eléctrica de las neuronas del ganglio espiral se pueden distinguir dos tipos de patrones de disparo de potenciales de acción, un grupo de neuronas que adaptan rápidamente, es decir, que disparan uno o pocos potenciales de acción en respuesta a la inyección de corriente y otro grupo de neuronas que dispara múltiples potenciales de acción en respuesta a esa misma inyección de corriente (Mo y Davis, 1997). Desde el punto de vista morfológico, Mo y Davis describen 3 tipos de neuronas: bipolares, pseudomonopolares y un pequeño grupo de neuronas más grandes en comparación con las estándar (Figura 5).

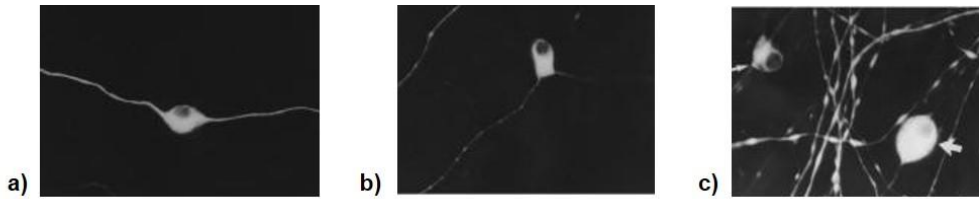


Figura 5. Neuronas del ganglio espiral en cultivo. a) neuronas bipolares, b) neuronas pseudomonopolares y c) neuronas de soma grande (tomado de Mo y Davis, 1997).

Corrientes iónicas de las neuronas del ganglio espiral

Corriente de calcio (I_{Ca})

Yamaguchi y Ohmori en 1990 describieron dos tipos de corrientes de Ca^{2+} en neuronas del ganglio espiral de pollo, una corriente que presenta inactivación y otra que no presenta inactivación. La primera tienen un bajo umbral de activación (-70 mV) y se ha propuesto que corresponde a la corriente LVA (low voltage activated) probablemente de tipo T, mientras que la segunda, tiene similitudes con los canales de Ca^{2+} tipo L pues carecen de una cinética de inactivación o es muy lenta, cuentan con alto umbral de activación (< -50 mV), el Ba^{2+} tiene mayor permeabilidad que el Ca^{2+} , son sensibles a nifedipina 3 μ M y se bloquean por Cd^{2+} 20 μ M (Yamaguchi y Ohmori, 1990).

La corriente de calcio en neuronas del ganglio espiral de cobayo se activa a potenciales de membrana de alrededor de -60 mV. El curso temporal del decaimiento de la corriente de calcio es lento, lo cual sugiere que los canales de calcio que se expresan en neuronas de cobayo también son tipo L (Hisashi *et al.*, 1995; Rusznák y Szúcs, 2009).

Corriente de sodio dependiente de voltaje (I_{Na})

Las neuronas del ganglio espiral tienen una corriente de sodio dependiente de voltaje que se activa entre -60 y -40 mV, dependiendo de la especie, su activación es rápida, así como también su inactivación y su recuperación de la inactivación que tiene una constante de tiempo de 7.5 ms. Dicha corriente es bloqueada con tetrodotoxina (TTX). El pico de la corriente puede variar entre -30 y -4 mV (Yamaguchi y Ohmori, 1990; Moore *et al.*, 1996; Lin 1997; Rusznák y Szúcs, 2009). En nuestro laboratorio, se registró la corriente de sodio de las neuronas del ganglio espiral con un potencial de sostenimiento a -100 mV y se observó que la corriente se activa alrededor de -40 mV e invierte alrededor de 40 mV. La amplitud máxima de la corriente la encontramos entre -10 y -20 mV (Valdés-Baizabal, 2009).

La corriente de sodio es fundamental para alcanzar el umbral para la generación del potencial de acción (Cantrell y Catterall, 2001). A nivel molecular se conoce que la

familia de canales de sodio dependientes de voltaje contiene nueve miembros llamados Nav1.1 – Nav1.9, con diferentes perfiles de expresión y en las neuronas del ganglio espiral algunas de estas subunidades están estratégicamente localizadas en sitios de la neurona para propagar potenciales de acción hacia el núcleo coclear en respuesta a la estimulación acústica. Las subunidades Nav1.6 y 1.7 se localizan sobre los cuerpos de las neuronas del ganglio espiral, principalmente sobre las tipo I. El Nav 1.6 también se expresa en los nodos de Ranvier adyacentes a los cuerpos bipolares mielinizados de dichas neuronas. El Nav 1.1 se expresa sobre procesos axonales. En procesos eferentes de la cóclea se expresa el 1.1, el 1.2 y el 1.7 (Hossain *et al.*, 2005; Rusznák y Szúcs, 2009; Fryatt *et al.*, 2009; Eckrich *et al.*, 2012).

Si bien se ha descrito tal distribución de los canales de sodio en las neuronas aferentes y en procesos eferentes, luego de ciertas condiciones tal como ototrauma acústico que genera una moderada pérdida de audición, puede haber cambios en la distribución de las proteínas. Los cambios detectados tanto a nivel molecular mediante RT-PCR como por inmunohistoquímica, midiendo los niveles de RNAm y la localización de las proteínas respectivamente, apuntan a que la subunidad 1.1 disminuye su expresión en axones, pero aumenta su expresión en dendritas y la subunidad 1.7 aumenta su expresión en los cuerpos celulares de las neuronas del ganglio espiral (Fryatt *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2012). Se considera que estos cambios plásticos en la expresión de las subunidades de los canales de sodio pueden contribuir a mantener la funcionalidad de la vía auditiva luego de la pérdida de la audición (Kuba *et al.*, 2010).

Corriente de potasio (I_K)

La mayoría de las células tipo I del ganglio espiral de la rata tienen corrientes salientes típicas de potasio (Moore *et al.*, 1996). Una de las corrientes que expresan estas células es la corriente de potasio tipo rectificador retardado. Dicha corriente se activa a potenciales más positivos que -50 mV, se suprime al reemplazar el potasio intracelular por Cs⁺ y puede bloquearse por exposición extracelular a tetraetilamonio (TEA) 20 mM, (cobayo) (Valverde *et al.*, 1992; Santos-Sacchi, 1993). Las neuronas del ganglio espiral expresan las subunidades Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4, Kv1.6, Kv3.1, Kv3.4, Kv4.2 t Kv4.3 de los canales de potasio (Rusznák y Szúcs, 2009).

Las neuronas del ganglio espiral expresan la corriente tipo A, que se bloquea con 4-AP. La corriente tiene una alta sensibilidad a la aplicación de dicho fármaco (0.01-1 mM) y constituye alrededor del 60% de la corriente saliente total que se activa alrededor del potencial de reposo. Dicha corriente tiene una cinética de inactivación rápida y permanece aún en presencia de altas concentraciones de TEA (10-30 mM) (Jagger y Housley, 2002; Valverde *et al.*, 1992).

También se ha reportado un componente sensible a dendrotoxina-1 (DTX-1), que constituye alrededor del 30 % de la corriente saliente total, éste tiene una activación rápida a potenciales de membrana más positivos a -50 mV y muy poca inactivación (Szabó *et al.*, 2002; Rusznák y Szúcs, 2009).

En 1997, Lin observó un tipo de relación corriente-voltaje que es consistente con la presencia de la corriente de potasio dependiente de calcio en neuronas del ganglio espiral (Lin, 1997). La corriente se activa a -60 mV e incrementa linealmente en amplitud entre -50 mV y 30 mV. Así mismo, en nuestro laboratorio se obtuvieron evidencias de dicha corriente en las neuronas del ganglio espiral, como resultado del registro de la corriente saliente con soluciones con y sin calcio extracelular (De la Rosa 2009).

Corriente catiónica activada por hiperpolarización (I_h)

Las neuronas del ganglio espiral del cobayo expresan una corriente catiónica entrante activada por pulsos hiperpolarizantes (Szabó *et al.*, 2002). Las propiedades de la corriente activada por hiperpolarización son similares a otras I_h en diferentes tipos de células. Algunas de estas características incluyen: (1) umbral de activación cercano al potencial de reposo (-70 mV), (2) activación voltaje y tiempo dependiente sin inactivación, (3) la conductancia incrementa con la hiperpolarización, (4) una despolarización lenta durante la inyección de corriente de hiperpolarización, (5) un disparo de rebote después de la inyección de corriente hiperpolarizante, (6) bloqueo reversible por baja concentración externa de calcio, pero no de bario, (7) un potencial de inversión de -36 mV, (8) permeabilidad a sodio y potasio y (9) regulación por AMPc (Chen, 1997; Mo y Davis, 1997). Esta corriente se ha propuesto actúa como marcapaso contribuyendo a la actividad espontánea en las fibras nerviosas aferentes auditivas primarias (Chen, 1997).

La I_h es una corriente medida por canales HCN (por sus siglas en inglés hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated). Está activa en reposo y es modulada por los niveles intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), acorta los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs) y es un buen candidato para permitir una rápida y confiable señalización en esta primera sinapsis en la vía auditiva en rata (Yi *et al.*, 2010).

Las dendritas aferentes de las neuronas tipo I del ganglio espiral expresan las subunidades HCN1, HCN2 y HCN4. La expresión de las subunidades HCN1 y HCN3 muestra dependencia de la posición de las células a lo largo del eje del modiolos (4 y 3 veces mayor, respectivamente, en el tercio apical que en el basal); sin embargo no hay diferencia en la expresión de proteínas para los canales HCN2 y HCN4 a lo largo del eje de la cóclea (Yi *et al.*, 2010; Bakondi *et al.*, 2009). Electrofisiológicamente, la I_h en las

terminales dendríticas es bloqueada con el ZD7288, y por CsCl y BaCl₂ (Yi *et al.*, 2010) y puede ser modulada por las neurotrofinas NT-3 y BDNF (por sus siglas en inglés de Brain-derived neurotrophic factor) (Needham *et al.*, 2012).

Otras corrientes iónicas

Otras corrientes que se han reportado en las neuronas del ganglio espiral son las que pasan a través de los canales vanilloides TRPV's (transient receptor potential cation channel) de los cuales se expresan predominantemente las subunidades TRPV 1 y 2 (Rusznák y Szúcs, 2009), así como las corrientes activadas por protones con expresión de subunidades ASIC2 (acid-sensing ion channels) (Peng *et al.*, 2004).

Colocalización de neurotransmisores

Existe consenso en que la acetilcolina es un transmisor de la sinapsis eferente lateral y medial en la cóclea, sin embargo el GABA, sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP) están extensamente colocalizados con acetilcolina en las terminales olivococleares en las áreas adyacentes a las CCI y CCE del ratón. Además hay evidencias de inmunorreactividad para la enzima tirosina hidroxilasa, que cataliza la reacción de síntesis de dopamina (DA), adrenalina y noradrenalina (NA). Se considera que la transformación de DA a NA y adrenalina no se produce en las neuronas eferentes debido a la falta de las enzimas que catalizan dichas reacciones, dopamina-β-hidroxilasa y feniletanolamina-n-metiltransferasa (Altschuler, *et al.*, 1986; Gil-Loyzaga, 1995; Liu, 1997; Safieddine, *et al.*, 1997; Niu *et al.*, 2004; Maison *et al.*, 2003), sin embargo, en homogeneizado coclear de rata se ha determinado la presencia de noradrenalina. Así mismo, hay evidencias inmunocitoquímicas de la presencia de péptidos opioides, encefalinas y dinorfinas, en la cóclea (Fex *et al.*, 1981; Jongkamonwivat *et al.*, 2003; Kho *et al.*, 2006; Hoffman *et al.*, 1985).

GABA es el neurotransmisor que inhibe la respuesta al glutamato en las neuronas del ganglio espiral y se han detectado la expresión de receptores GABAA alfa 2 y GABAB. (Lin *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2004). Respecto a la expresión de receptores a SP, se sabe que las neuronas del ganglio espiral se expresan funcionalmente tres tipos de receptores, el NK1-3 (receptores a neurokinina) (Ito *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004). La SP tiene un efecto dual en las neuronas del ganglio espiral; evoca la liberación de calcio intracelular (antes del inicio de la audición) a través de la vía de la fosfolipasa C (PLC) y activa una conductancia catiónica no selectiva acoplada a proteínas G, mediante un mecanismo independiente de PLC, lo cual puede relacionarse con una acción trófica y neuromoduladora respectivamente (Ito *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004).

Las neuronas del ganglio espiral expresan tanto receptores muscarínicos (M3, M5 y M1) como nicotínicos (alfa 5-7 y beta 2 y 3) (Saffiedine et al., 1996; Morley et al., 1998; Popa et al., 2000; Khan et al., 2002). Se considera que la activación de receptores muscarínicos activa una conductancia catiónica no selectiva para regular la excitabilidad neuronal (Ito y Dulon, 2002).

Hay evidencias electrofisiológicas de la modulación de la corriente de calcio a través de la activación de los receptores opioides de los tipos Kappa (KOR), Mu (MOR), Delta (DOR) y receptores a orfanina (ORL-1) (De la Rosa, 2009) en las neuronas del ganglio espiral, así como evidencias inmunocitoquímicas de la expresión de los MOR tanto en neuronas del ganglio espiral como en fibras (Jongkamonwiwat *et al.*, 2006). En el órgano de Corti, la sinaptofisina colocaliza con MOR, DOR y KOR, lo cual sugiere que los receptores y péptidos están principalmente localizados en las fibras eferentes. Estos resultados sugieren que los péptidos opioides pueden modular directamente su misma liberación actuando sobre receptores opioides, o por modulación de otros neurotransmisores para regular las señales eferentes (Jongkamonwiwat *et al.*, 2006).

Como antes se mencionó, si bien no se ha encontrado la enzima que cataliza la conversión de la DA en NA, en cultivos de neuronas del ganglio espiral se ha determinado que la respuesta al GABA es modulada por NA, disminuyéndola de manera reversible y de una manera dependiente de la concentración. Dicho efecto es mediado por activación de los adrenorreceptores $\alpha 2$ a través de un mecanismo mediado por PKA. Así, la NA reduce el efecto inhibitorio del GABA y consecuentemente aumenta la excitabilidad de las neuronas del ganglio espiral (Zha *et al.*, 2007).

Las sustancias antes mencionadas fueron encontradas en proyecciones bien caracterizadas que corresponden a las fibras nerviosas laterales y mediales y terminales que conectan dendritas aferentes tipo I y células ciliadas externas, respectivamente. La serotonina se incluye en la lista de sustancias neuroactivas en la cóclea pues está presente en homogeneizado coclear de la rata (Vicente-Torres *et al.*, 2002). Sin embargo, las vías serotoninérgicas parecen formar una vía separada y altamente especializada, cuyo papel funcional está aún pendiente de definirse con claridad (Gil-Loyzaga *et al.*, 2000). Mediante inmunocitoquímica se detectó la presencia de serotonina en las células tipo I y tipo II de ratón de 30 días. La inmunorreactividad se observa en el citoplasma (Long *et al.*, 2008).

En las neuronas del ganglio espiral, adicionalmente, hay inmunoreactividad al polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PAACP) bajo las células ciliadas internas y externas en el órgano de Corti. Dicho polipéptido juega un papel en la neuromodulación y neuroprotección asociados con la neurotransmisión

glutamatérgica y colinérgica. Hay también expresión del receptor 1 de dicho polipéptido (PAC1-R) en las aferentes tipo I (Drescher *et al.*, 2006).

Este trabajo se enfoca en el estudio de la participación de la dopamina en la modulación de la actividad de las neuronas aferentes cocleares.

Dopamina

La dopamina pertenece al grupo de las catecolaminas porque tiene un grupo catecol (un anillo de benceno con dos grupos hidroxilos y un grupo amino). El precursor de las catecolaminas es el aminoácido tirosina. Por una serie de reacciones, la tirosina es convertida en L-dopa y ésta en dopamina (Thompson, 2000; Figura 6).

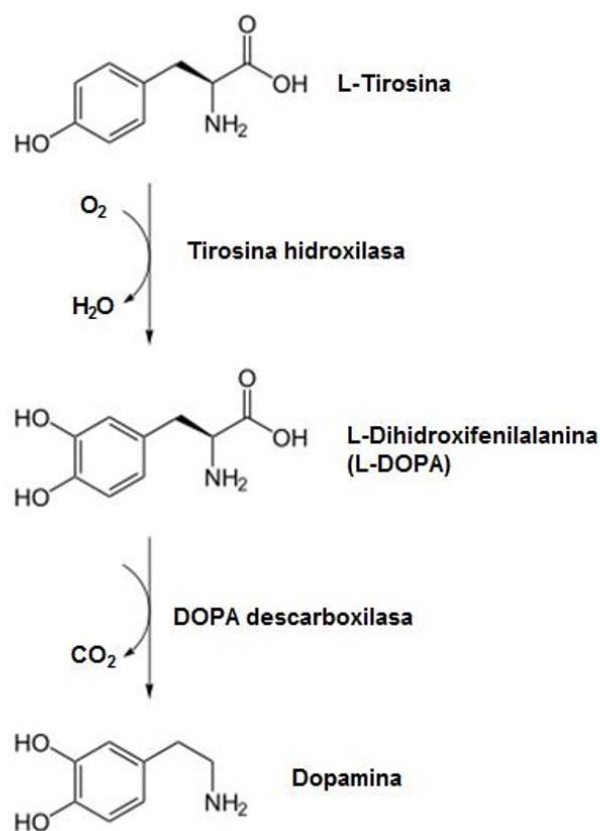


Figura 6. Vía para la síntesis de la dopamina. La tirosina hidroxilasa (TH) convierte a la dopamina en levodopa (L-DOPA), cuya subsecuente descarboxilación produce la dopamina.

La dopamina participa en el control de una variedad de funciones: actividad locomotora, cognición, emotividad y afectividad, alertamiento, reforzamiento positivo, ingesta de alimentos y agua, y regulación neuroendócrina. Tiene también múltiples papeles en la periferia como un modulador de la función cardiovascular, liberación de catecolaminas, secreción de hormonas, tono vascular, función renal, y motilidad gastrointestinal (Tabla 2). Las alteraciones en la transmisión dopaminérgica se han

asociado a trastornos del sistema nervioso central (SNC), tales como la enfermedad de Parkinson, al síndrome de Tourett y la hiperprolactinemia, así como a trastornos psicóticos que incluyen a la esquizofrenia y la dependencia a drogas como la cocaína y las anfetaminas (Missale *et al.*, 1998; Bahena-Trujillo *et al.*, 2000; Purves *et al.*, 2001).

Tabla 2. Distribución y funciones de receptores dopaminérgicos a nivel periférico (Tomado de Missale *et al.*, 2010).

Tejido	Tipo de receptor	Función
Vasos sanguíneos		
Adventicia	Familia D2	Inhibición de la liberación de norepinefrina
Media	Familia D1	Vasodilatación
Intima	Familia D2	Desconocida
Glándula adrenal		
Glomerulosa	Familia D1	Desconocida
	Familia D2	Inhibición de la secreción de aldosterona
Medula	Familia D1	Estimulación de la liberación de epinefrina/norepinefrina
	Familia D2	Inhibición de la liberación de epinefrina/norepinefrina
Riñón		
Glomérulos	Familia D1	Incremento de la tasa de filtración
Aparato yuxtaglomerular	Familia D1	Estimulación la secreción de renina
Túbulo proximal	Familia D1	Inhibición de la reabsorción de sodio
Limbo ascendente del asa de Henle	Familia D1	Inhibición de la reabsorción de sodio
Ducto colector cortical	Familia D1	Inhibición de la reabsorción de sodio
	Familia D2	Inhibición de la acción de vasopresina
Ganglio simpático/terminales	Familia D2	Inhibición de la liberación de norepinefrina
Corazón	D4	Desconocida

Parte importante de los fármacos psicoactivos que producen refuerzo positivo es que aumentan el nivel de dopamina liberada en las terminales de las proyecciones del área ventral tegmental. Algunos fármacos lo hacen bloqueando el transportador de dopamina. Así, tanto la cocaína como la anfetamina elevan el nivel de dopamina en el núcleo accumbens bloqueando el transporte de dopamina, prolongando el tiempo que la dopamina permanece en la hendidura sináptica (Kandel, 1991).

Receptores dopaminérgicos

Las técnicas de clonación molecular han permitido identificar cinco tipos de receptores dopaminérgicos los cuales poseen siete dominios transmembranales y se encuentran acoplados a proteínas G. Los siete dominios transmembrana están unidos de forma alterna por asas citoplasmáticas y extracelulares y la región amino terminal corresponde a un dominio extracelular glicosilado (Figura 7) (Bahena-Trujillo, *et al.*, 2000; Missale, *et al.*, 1998).

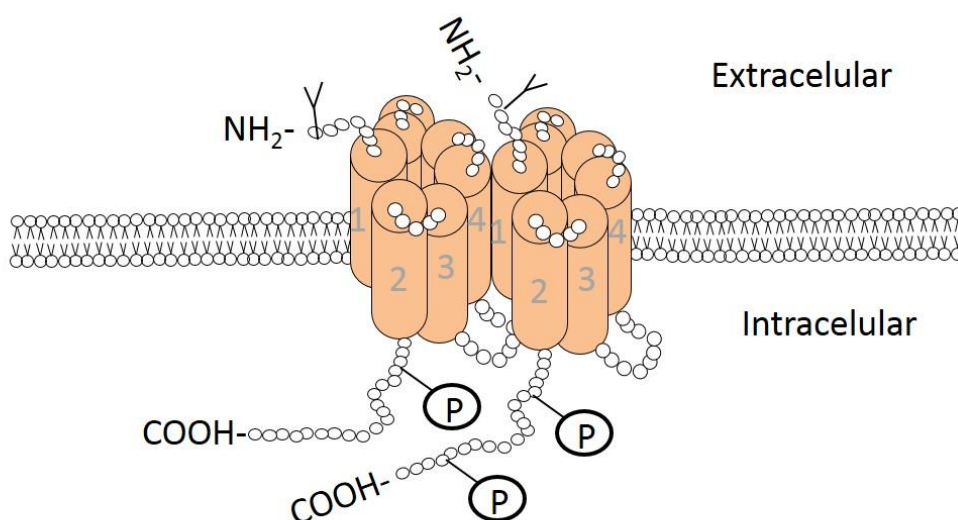


Fig 7 Receptores dopaminérgicos. Representación general de un dímero de receptor dopaminérgico con siete dominios transmembrana y asa citoplasmática carboxilo terminal (con sitios de fosforilación) y asa extracelular amino terminal (con sitios de glicosilación)

Desde el punto de vista farmacológico se dividen en dos grandes familias: D1 (receptores D1 y D5) y D2 (receptores D2, D3 y D4). En la tabla 3 se presenta un perfil farmacológico de los receptores dopaminérgicos.

La activación de los receptores D1, típicamente conduce a la activación de proteínas Gs con la consecuente producción de AMPc por estimulación de una o varias isoformas de la enzima adenilciclase, localizada en la membrana celular. También se ha reportado que en la corteza cerebral prefrontal, la activación del receptor D1 induce la producción de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) y diacilglicerol (DAG), por estimulación de una fosfolipasa C que cataliza la hidrólisis del 4,5-difosfato de fosfatidilinositol (PIP₂). La activación de receptores D5 estimula la adenilato ciclase, vía las proteínas Gs y produce un aumento del AMPc (Bahena-Trujillo, *et al.*, 2000; Missale, *et al.*, 1998).

De manera general y primaria se sabe que la generación de AMPc mediada por receptores de la familia D1, activa la PKA, sin embargo, hay una vía alterna que es

dependiente de AMPc pero que no es mediada por PKA y que involucra la proteína de intercambio activada por AMPc, EPAC (por sus siglas en inglés Exchange Protein Activated by Cyclic AMP) (Undieh, 2010).

Los receptores D2 están acoplados a proteínas G α i o G α o, sensibles a la toxina de *B. pertussis*. La activación de estos receptores modula corrientes iónicas, en particular las activadas por voltaje inhibiendo canales de calcio (posiblemente mediado por proteínas G α o) o facilitando la apertura de canales de K $^{+}$ mediado por proteínas G α i. En líneas celulares transfectadas con el cDNA que codifica para los receptores D2, la estimulación del mismo provoca la formación de IP $_3$ y movilización de calcio a partir de depósitos intracelulares (Bahena-Trujillo, *et al.*, 2000; Missale, *et al.*, 1998). El receptor D3 es típicamente un autoreceptor presente en las terminales dopaminérgicas, donde regula la síntesis y liberación de dopamina. La modulación por activación de estos receptores puede deberse a varios mecanismos como la inhibición de la actividad de AMPc, la reducción de corrientes de Ca $^{2+}$ que fluyen a través de canales activados por voltaje y la potenciación de corrientes salientes de K $^{+}$, efectos todos mediados por proteínas G α i/G α o. La activación de estos receptores también estimula la hidrólisis de PIP $_2$ (formación de IP $_3$ y DAG) por activación del intercambiador Na $^{+}$ /H $^{+}$. La activación del receptor D4 inhibe la producción de AMPc. Otros efectos funcionales acoplados a la activación del subtipo D4 incluyen la liberación de ácido araquidónico y la extrusión de iones H $^{+}$ por estimulación del intercambiador Na $^{+}$ /H $^{+}$. Estas acciones se encuentran mediadas por proteínas G del tipo G α i o G α o (Bahena-Trujillo, *et al.*, 2000; Missale, *et al.*, 1998).

Con base en lo anterior, en general se considera que los receptores que pertenecen a la familia D1 están acoplados a proteínas G α s y estimulan la formación de AMPc como mecanismo principal de transducción de señales y que los receptores que pertenecen a la familia D2 inhiben la formación de AMPc, activan canales de potasio y reducen la entrada de iones calcio a través de canales dependientes de voltaje, lo cual es mediado por proteínas G α i y G α o (Kebabian y Calne, 1979; Bahena-Trujillo, *et al.*, 2000; Missale *et al.*, 1998). Sin embargo, se han descrito contraejemplos a esta generalización. En el núcleo subtalámico la activación de receptores D4 disminuye la liberación de GABA y también se ha sugerido que los receptores D5 modulan la neurotransmisión GABA y ambos receptores, GABAa y D5 muestran interacción directa proteína-proteína en el hipocampo (Inoue *et al.*, 2006). Es decir, existen otros mecanismos bajo los cuales se ejercen los efectos de la activación de los receptores dopaminérgicos, en este caso, las interacciones proteína-proteína.

Tabla 3. Perfil farmacológico de los receptores dopaminérgicos (tomado de Missale *et al.*, 2010).

	Familia D1		Familia D2		
	D1	D5	D2	D3	D4
Antagonistas					
(+)-Butaclamol	+++	++	+++	ND	++
Clorpromazina	+	+	+++	++	++
Clozapina	+	+	+	+	++
<u>Eticlopride</u>	-	-	++++	ND	+++
Haloperidol	+	+	++++	++	+++
Nafadotrina	ND	ND	+++	++++	+/-
Nemonaprida	ND	ND	++++	++++	++++
Raclopride	-	ND	+++	+++	+/-
<u>SCH-23390</u>	++++	++++	+/-	+/-	+/-
(-)-Sulpiride	-	-	++	++	++
Espiperona	+	+/-	++++	+++	++++
Agonistas					
Apomorfina	+/-	+	+++	++	+++
Bromocriptina	+	+	+++	+++	+
<u>Dopamina</u>	+/-	+	+	++	++
Fenoldopam	+++	+++	++	ND	+
7-OH-DPAT	+/-	ND	++	+++	+/-
<u>Quinpirole</u>	-	ND	+/-	++	++
SKF-38393	+++	++++	+	+/-	+/-

Los receptores de la familia D1 (D1 y D5) se caracterizan por tener un asa i_3 corta que une al dominio 5 con el 6 y una región carboxilo terminal grande y se acoplan a G_s . Los receptores de la familia D2 (D2, D3 y D4) tienen características inversas, un asa i_3 larga y el extremo carboxilo terminal corto y se acoplan a proteínas G_i (Bahena-Trujillo, *et al.*, 2000; Missale, *et al.*, 1998).

Entre familias, difieren los receptores de la familia D1 de los de la familia D2 en el número de aminoácidos tanto de la tercera asa citoplasmática como del terminal carboxilo, pero entre familias existe una alta homología de secuencias de aminoácidos de los dominios transmembranales. Entre el receptor D1 y el D5 existe una homología del 80 %, entre el D2 y el D3, la homología es del 75 % y entre el D2 y el D4 es del 53 % (Missale *et al.*, 2010).

La presencia de los distintos subtipos de receptores DA ha sido determinada mediante la combinación de técnicas de unión de radioligandos, que detectan sitios de unión, y de hibridación *in situ*, que detecta a los diferentes RNA mensajeros que codifican la síntesis de los subtipos de receptores dopaminérgicos.

Casi todos los modelos que existen para receptores acoplados a proteínas G funcionan en forma de monómeros; sin embargo, se han descrito que algunos receptores acoplados a proteínas G son dímeros. Por lo tanto, algunos receptores dímeros son las principales especies interactuando con hormonas, neurotransmisores y drogas (Franco *et al.*, 2007). De hecho se ha propuesto que los receptores DA son parte de complejos moleculares altamente organizados, donde diferentes receptores y proteínas están agrupados interactuando. Esos heterómeros tienen farmacología, señalización y propiedades de tráfico particulares. La heteromerización de receptores acoplados a proteínas G, aumenta las posibilidades combinatorias diferentes llevando a un nivel inesperado de diversidad dentro de esta familia de receptores. Estudios bioquímicos, estructurales y farmacológicos sugieren que cada receptor despliega propiedades únicas, incluyendo afinidad por la DA y especificidad por el acople a proteínas G, y muestran una distribución neuronal peculiar (Missale *et al.*, 2010).

Recientemente se ha reportado que los receptores DA pueden interactuar directamente con miembros de la misma familia de receptores y con familias de receptores divergentes estructuralmente, para formar heterómeros con propiedades funcionales y farmacológicas únicas. Los heterómeros representan nuevas entidades, es evidente que esa heterodimerización incrementa la heterogeneidad dentro de los subtipos de receptores dopaminérgicos. La heterodimerización a menudo afecta las propiedades de unión de ligando de los receptores interactuando y altera la potencia de agonistas en la generación de señales intracelulares. La heterodimerización también puede generar otros sitios de unión y puede representar un nuevo mecanismo de modulación de tráfico mediado por agonistas, ya sea por aumento o disminución de la internalización y desensibilización del receptor. Hay razones para interpretaciones equívocas de los datos ajustados a receptores dímeros si se asume que son monómeros. El ajuste de los datos usando un modelo basado en dímeros proporciona, no solo la constante de disociación en equilibrio para unión de alta y baja afinidad al receptor dímero, sino también un índice de cooperatividad que refleja la comunicación molecular entre monómeros dentro del dímero. El índice de cooperatividad es una herramienta valiosa que permite interpretar y cuantificar, por ejemplo, el efecto de reguladores alostéricos (Missale *et al.*, 2010; Franco *et al.*, 2007).

Algunos grupos de trabajo sugieren que el receptor dopaminérgico D1 forma heterómeros con receptores de la misma familia y con receptores divergentes estructural y funcionalmente y mediante el uso de diferentes estrategias experimentales, han demostrado la existencia de heterómeros D1-NMDA y D1-D3, tanto en células transfectadas como en células del estriado (Missale *et al.*, 2010), así como otros heterómeros.

Los receptores D1 y D3 están altamente colocalizados en neuronas estriatonigrales y hay evidencias de que esos receptores pueden interactuar. La estimulación de D1 induce, de hecho, la expresión de RNAm de D3 en el estriado de rata y la coactivación de D1 y D3 en la superficie del núcleo accumbens aumenta sinérgicamente la expresión del gen de sustancia P. La formación de AMPc estimulada por dopamina es más potente en células que expresan el heterómero D1-D3 que en células que solo expresan el D1 (Fiorentini *et al.*, 2008), sugiriendo que la heteromerización D1-D3 resulta en una potenciación de la activación de adenilato ciclasa mediada por D1 (Missale *et al.*, 2010).

El receptor D1 interactúa con ambos NR1 y NR2A, pero no con NR2B, que son subunidades del NMDA. En particular, se demostró que el dominio C-terminal del receptor D1 interactúa con la región C-terminal de la subunidad NR1 y que dos dominios distintos en la región C-terminal del D1 están involucrados en la interacción con subunidades específicas del NMDAR (Missale *et al.*, 2010).

Los receptores a adenosina y dopamina en los ganglios basales han sido fundamentales para demostrar la existencia de receptores heterómeros y las consecuencias funcionales de tales interacciones moleculares. Los heterómeros formados por receptores D1 y D2 y por receptores a adenosina A1 y A2A también ocurren en células estriatales y abren nuevas perspectivas para comprender por qué dos receptores, con efectos aparentemente opuestos, se expresan en la misma neurona y en las terminales nerviosas (Franco *et al.*, 2007). También hay evidencia de coexistencia de dos interacciones antagonísticas entre receptores A2A y D2 en las neuronas encefalinérgicas y GABAérgicas (Ferré *et al.*, 2008).

La técnica llamada Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy secuencial (SRET) permite la identificación de heterómeros formados por tres proteínas diferentes. Usando SRET se identificaron complejos de receptores canabinoides CB1, D2 y A2A en células del estriado de la rata (Carriba *et al.*, 2008).

También se ha demostrado la presencia de heterodímeros de receptores metabotrópicos a glutamato mGlu(5)R y a dopamina D2 en células HEK. Mediante una combinación de técnicas se detectó la presencia de oligómeros receptores que contienen más de dos protómeros, receptores mGlu(5)R, D2 y adenosine A2A (Cabello *et al.*, 2009). Los tres receptores se codistribuyen en la membrana plasmática extrasináptica de las mismas espinas dendríticas asimétricas, aparentemente glutamatérgicas, sinapsis estriatales. También experimentos de coimmunoprecipitación demuestran la existencia de una asociación de mGlu(5)R, D2 y A2A en homogenado de estriado de rata (Cabello *et al.*, 2009).

También se ha investigado la existencia de heterómeros de receptores D1-H3 y sus características bioquímicas en células de mamífero transfectadas (Ferrada *et al.*, 2009). Mediante ensayo de transferencia de energía de resonancia bioluminiscente y ensayos de unión, confirmaron que los receptores D1 y H3 pueden heteromerizarse (Ferrada *et al.*, 2009). Los heterómeros D1-H3 constituyen el único dispositivo que puede producir directamente señalización dopaminérgica e histaminérgica hacia la vía MAPK en una manera independiente de Gs y dependiente de Gi. Un antagonista de una de las unidades receptores en el heterómero D1-H3 puede inducir cambios conformacionales en la otra unidad receptora y bloquear señales específicas originadas en el heterómero (Ferrada *et al.*, 2009).

Dopamina y receptores dopaminérgicos en el oído interno

El grupo de investigación de Karadaghy en 1997 reportó la presencia de receptores D2_{largo} y D3 en la cóclea pero los transcritos de los receptores D2_{corto} y D4 no amplificaron, sugiriendo que en la cóclea esas isoformas no se expresan.

Por otra parte, mediante análisis inmunocitoquímico y de la expresión de genes que codifican para los receptores D1 a D5, usando el procedimiento RT-PCR en cóclea de rata, se determinó que todos los subtipos de receptores a dopamina están presentes en las células del ganglio espiral, y potencialmente regulan la neurotransmisión aferente (Inoue, *et al.*, 2006).

En el 2012, el grupo de trabajo de Maison *et al.*, corroboran que en las neuronas del ganglio espiral se expresan todos los subtipos de receptores dopaminérgicos excepto el D3 (Maison *et al.*, 2012).

Mediante marcaje con anticuerpos anti-TH en el cobayo se ha demostrado que las fibras dopaminérgicas que inervan la cóclea se originan en la oliva superior lateral, tienen una organización tonotópica que se refleja en el hecho de que las fibras dopaminérgicas en la cóclea son mucho más densas en la parte basal y en la segunda vuelta disminuyendo su densidad en la tercera vuelta y prácticamente ausentes en la parte apical de la cóclea. Estas observaciones implican que las neuronas dopaminérgicas del haz olivococlear producen una supresión selectiva de las altas frecuencias (Niu y Canlon, 2002; Mulders y Robertson, 2004). Esta distribución de las fibras dopaminérgicas del cobayo contrasta con lo encontrado en el ratón, en el que la distribución de receptores fue uniforme de la base al ápex de las células ciliadas (Darrow *et al.*, 2006). Usando doble tinción se ha determinado que no hay, o es mínima, la coexpresión de TH con marcadores colinérgicos. Se ha calculado que únicamente el 10 a 20% de las terminales eferentes son TH positivas (Darrow *et al.*, 2006). Se ha observado que la inmunoreactividad a TH se proyecta bajo las células ciliadas internas

y nunca en las externas. La innervación con TH es discontinua de tal modo que una región localizada de alta densidad de terminales, puede estar combinada con regiones sin inmunoreactividad (Figura 8).

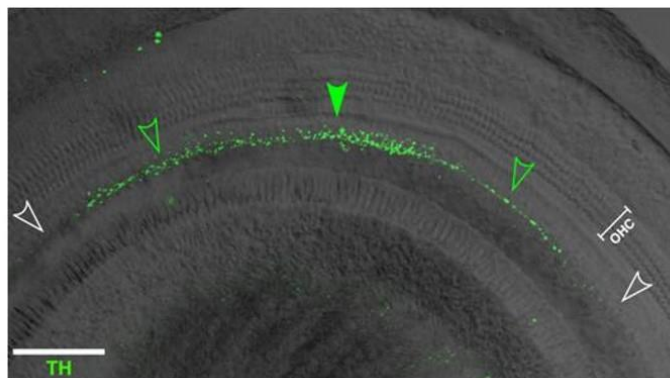


Fig. 8 Imagen confocal que muestra inmunoreactividad a tirosina hidroxilasa en la cóclea de ratón. Se intercalan regiones de alta intensidad de marcaje, con regiones de baja o nula intensidad (Tomado de Darrow *et al.*, 2006).

La presencia de dopamina y noradrenalina en la cóclea de rata adulta, así como durante el desarrollo postnatal se estudió por HPCL (cromatografía líquida de alta resolución) acoplado con detección electroquímica. El contenido coclear de dopamina aumenta gradualmente después del nacimiento. Al día 30, el contenido de dopamina y noradrenalina es de alrededor de 5 veces, con respecto del día uno (Gil-Loyzaga y Parés-Herbute, 1989).

Se sugiere que la dopamina liberada de las fibras eferentes olivococleares laterales en la cóclea de mamíferos podría actuar como sustancia neuroprotectora ante procesos de isquemia y trauma por exposición al ruido ya que inhibe el efecto tóxico del eflujo de glutamato de las células ciliadas internas (Halmos, *et al.*, 2000; Gil-Loyzaga, 1995). Agonistas selectivos a receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR 2/3) incrementan significativamente la liberación de dopamina de manera dosis-dependiente por lo cual se ha propuesto que la activación de los mGluRs inicia un mecanismo neuroprotector (Doleviczényi *et al.*, 2005). La activación de receptores dopaminérgicos puede regular la función de receptores NMDA a través del acople a proteínas G y activación de PKA o PKC. Sin embargo, se sabe que aparte de hacerlo por vías de señalización asociadas a proteínas G, puede hacerlo a través de una interacción proteína-proteína entre sitios de la porción carboxilo terminal intracelular del receptor D1 (D1-t2, D1-t3) con subunidades del receptor NMDA (NR1-1a, NR2A) (Lee *et al.*, 2002; Pei *et al.*, 2004). El efecto protector de piribedil, un agonista D3/D2/D1, durante el trauma acústico o isquemia sugiere que esta modulación corresponde a la prevención de

excitotoxicidad (Gil-Loyzaga *et al.*, 1994; d'Aldin, *et al.*, 1995, 1997; Pujol, *et al.*, 1993; Gáborján, *et al.*, 1999).

El potencial de acción compuesto en respuesta al sonido es una medida indirecta de la actividad de las fibras del nervio auditivo. Una disminución en su amplitud indica que menos fibras nerviosas están descargando en sincronía en respuesta a un tono. Esta situación puede ser debida a una supresión o un incremento en la tasa de disparo espontáneo de una fibra única. La aplicación intracoclear de dopamina reduce el potencial de acción compuesto (PAC) del nervio auditivo e incrementa la latencia N1. N1 corresponde a un potencial generado por neuronas auditivas secundarias situadas en el núcleo coclear. En contraste, hay muy poco cambio en los potenciales que reflejan la actividad de las células ciliadas (por ejemplo en los potenciales de sumación y los microfónicos cocleares). Sorprendentemente la aplicación de antagonistas de la dopamina de la familia D1, el SCH-23390 (R-(+)-8-chloro-2,3,4,5-tetrahydro-3-methyl-5-phenyl-1H-3-benzazepine-7-ol), y de la familia D2, eticlopride también disminuyen la amplitud del PAC sin cambiar el potencial de sumación ni el microfónico coclear. El estudio ultraestructural de la cóclea luego de que ha sido perfundida con eticlopride muestra que algunas de las dendritas aferentes se hinchan, lo cual sugiere que la marcada reducción en el rango de disparos puede reflejar signos tempranos de excitotoxicidad. Los resultados sugieren que la dopamina puede ejercer una inhibición tónica de la actividad del nervio auditivo y que la dopamina endógena actúa en las sinapsis axodendríticas de las nervio auditivo vía receptores D1 y D2 (Ruel *et al.*, 2001).

La aplicación de dopamina tiene muy poco efecto sobre la tasa de disparo aferente espontáneo. En contraste, el disparo inducido por NMDA o AMPA puede ser disminuido por la dopamina de manera dosis-dependiente. La acción de dopamina sobre los disparos inducidos por agonistas al glutamato puede ser bloqueada por agonistas D1 y D2. Esto indica que la acción de dopamina puede ser mediada por ambos subtipos de receptores D1 y D2 (Oestreicher *et al.*, 1997).

La dopamina y agonistas dopaminérgicos a los receptores de las familias D1 y D2 reducen la amplitud del potencial de acción e inducen una despolarización transitoria lenta de las neuronas aferentes cocleares tipo I en el ratón. Agonistas de las familias D1 y D2 inducen de manera dosis-dependiente una corriente entrante que es bloqueada reversiblemente por antagonistas. La corriente entrante es bloqueada por TTX, implicando canales de Na⁺ (Sun y Salvi, 2001). Debido a la falta de disponibilidad de agonistas y antagonistas específicos para los receptores D4 y D5, no ha sido descrito el papel de éstos en la cóclea.

Recientemente se ha descrito en ratones con delección de cada uno de los cinco subtipos de receptores dopaminérgicos que con la delección de receptores de la familia

D1 (D1 y D5) hay una disminución del umbral de respuesta para altas frecuencias y el umbral está elevado para todas las frecuencias en los animales con delección del receptor D2 (Maison *et al.*, 2009). Los animales con delección de receptores D2, D4 y D5 muestran un aumento en la vulnerabilidad al ruido.

Administrando diferentes antagonistas a los canales de calcio se determinó cuáles de éstos participan en el proceso de liberación de dopamina en el oído interno. Tanto bloqueadores de canales tipo T (NiCl) así como de canales tipo L no modificaron la liberación de dopamina. Finalmente los canales de calcio tipo N están relacionados con la transmisión mediada por dopamina entre fibras eferentes olivococleares laterales y dendritas aferentes (Gáborján y Vizi, 1999; Lin 1997).

En nuestro trabajo (tesis de maestría) encontramos que la dopamina (10 nM - 100 μ M) disminuye de forma dependiente de la concentración la corriente entrante que se observa en las corrientes totales y, resultados preliminares (n = 6) indican que la corriente de sodio aislada disminuye significativamente al aplicar dopamina a una concentración de 30 μ M (Valdés-Baizabal, 2009).

Por otro lado usando la técnica de superfusión de microvolumen in vitro, se estudió la influencia de los antagonistas de receptores serotoninérgicos 5-HT (6) y 5-HT (7) pueden influir en la liberación de dopamina en la cóclea de cobayo, en condiciones control y de isquemia (Doleviczényi *et al.*, 2008). El antagonista del receptor 5-HT no fue efectivo, pero el SB-271046, que bloquea el receptor 5-HT, incrementó la liberación de dopamina coclear. Para comprender por qué el bloqueo de un receptor excitador resulta en un incremento en vez de una disminución en la función, se investigó la posible participación de un mecanismo neuronal indirecto a través de la liberación de dopamina. Se estudió el efecto de glutamato y de serotonina y los datos experimentales sugieren que cuando la CCl libera glutamato, este se une a receptores mGlu sobre la terminal eferente GABAérgica. Esto hace que disminuya la liberación de GABA y por lo tanto aumenta la liberación de DA. Por otra parte, la 5-HT interactúa con su receptor sobre la terminal eferente GABAérgica, aumenta la liberación de GABA y por lo tanto disminuye la liberación de DA. La activación de los receptores de serotonina modula entonces la liberación de DA de las eferentes olivococleares laterales indirectamente por la disminución en el tono inhibitorio GABAérgico sobre las terminales nerviosas dopaminérgicas (Doleviczényi *et al.*, 2008).

La perfusión perilinfática de agonistas y antagonistas específicos D1, D5 y D2, pero no los D3 producen una supresión de los potenciales provocados cocleares. Además, se observó una supresión sostenida de las amplitudes del potencial de sumación, los potenciales microfónicos y DPOAE por el bloqueo del receptor D2, lo cual sugiere que los receptores dopaminérgicos pueden influir en otras estructuras cocleares

aparte de las dendritas aferentes primarias (Garrett *et al.*, 2010). Aunque el RNAm y las proteínas del receptor D3 han mostrado estar presentes en la cóclea de rata y ratón, en este estudio no se encuentran cambios en la respuesta evocada por sonido seguido por la perfusión de los compuestos que actúan sobre los receptores D3 (Garrett *et al.*, 2010).

El agonista al receptor D1/5, SKF-81297, reduce la amplitud del potencial de acción compuesto lo cual sugiere que esos receptores son inhibidores sobre la respuesta evocada por sonido (Garrett *et al.*, 2010). Los antagonistas a receptores D1/5 no producen cambios significativos en la amplitud del potencial de acción compuesto. Eso se interpreta como que hay poca o nula liberación tónica de dopamina sobre los receptores D1/5 (Garrett *et al.*, 2010).

Los datos con antagonistas al receptor D2 indican una influencia excitadora de la liberación tónica de dopamina sobre esos receptores. Adicional a eso, los antagonistas también causan cambios en el potencial de sumación, en los microfónicos cocleares y en los DPOAEs, sugiriendo una acción separada de la liberación tónica de dopamina sobre las CCE (Garrett *et al.*, 2010).

Aunque los receptores dopaminérgicos no se han reportado sobre las células ciliadas cocleares, hay terminales eferentes bajo las células ciliadas internas en los gatos, así que es posible que la dopamina pueda actuar directamente sobre las células ciliadas internas vía una conexión directa o alternativamente, vía difusión de las terminales eferentes laterales a la región de las CCI (Garrett *et al.*, 2010).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La respuesta de las neuronas aferentes ante la entrada sináptica proveniente de las células ciliadas, así como su actividad basal, es modulada por varias sustancias que se liberan de la terminal eferente. Dichas sustancias son acetilcolina, GABA, dinorfinas, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, encefalinas y dopamina.

Se ha propuesto que los receptores dopaminérgicos se expresan en las neuronas aferentes tipo I y se sugiere que la dopamina y sus agonistas ejercen un efecto protector sobre la neurona aferente ante estímulos intensos o condiciones como hipoxia que se han relacionado con excitotoxicidad secundaria a la activación de receptores glutamatérgicos. Estudios con registros de potenciales de campo demuestran que la dopamina disminuye la tasa de disparo de las neuronas aferentes cuando ésta es inducida por NMDA o AMPA de manera dependiente de la dosis (Oestreicher *et al.*, 1997). También se ha demostrado que la activación de receptores glutamatérgicos aumenta la liberación de dopamina vía un mecanismo GABAérgico. En mi trabajo de maestría se encontró que la dopamina modula corrientes iónicas de manera dependiente de la concentración y que la corriente de sodio aislada, en neuronas aferentes cocleares, disminuye de forma significativa y consistente a concentración 30 μM de dopamina. Si bien a la dopamina se le ha asociado un efecto neuroprotector, se desconoce su mecanismo de acción a nivel celular en las neuronas aferentes cocleares, motivo por el cual abordamos este problema a través del estudio de sus efectos y de sus agonistas sobre la corriente de sodio y mediante el uso de herramientas farmacológicas evaluar la participación de vías intracelulares y proponer modelos que expliquen los mecanismos y alcances del control central dopaminérgico de la entrada aferente en la vía coclear.

HIPÓTESIS

La activación de receptores dopaminérgicos en las neuronas aferentes cocleares modula de forma inhibitoria la corriente de sodio activada por voltaje constituyendo un sistema de control de la ganancia de dichas neuronas, a través de un mecanismo en el que participan proteínas G.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la modulación de la corriente de sodio por activación de receptores dopaminérgicos y evaluar la participación de vías intracelulares para establecer una propuesta de mecanismo de acción.

OBJETIVOS PARTICULARES

En neuronas aferentes tipo I del ganglio espiral

- Estudiar el efecto de dopamina sobre la corriente de sodio aislada y construir la curva dosis efecto.
- Estudiar los efectos de agonistas para las familias D1 y D2 aplicando A-68930 (*cis*-(±)-1-(Aminomethyl)-3,4-dihydro-3-phenyl-1H-2-benzopyran-5,6-diol hydrochloride), agonista de la familia D1 y quinpirole, agonista de la familia D2 sobre la corriente de sodio.
- Establecer la especificidad de los efectos observados mediante el uso de antagonistas para las familias de receptores. SCH-23390 como antagonista de la familia D1 y eticlopride como antagonista de la familia D2.
- Estudiar el efecto de agonistas de las familias D1 y D2 sobre la actividad eléctrica de las neuronas aferentes en condiciones de fijación de corriente.
- Estudiar el efecto de agonistas de las familias D1 y D2 sobre la morfología/forma del potencial de acción.
- Estudiar la participación de proteínas G en el efecto que produce el A-68930 mediante el uso de GDP-β-S.
- Estudiar la participación del AMPc y de PKA en el efecto ejercido por el A-68930 mediante la aplicación de 8-Br-AMPc que es un análogo de AMPc y mediante la aplicación de H89, que es un bloqueador de PKA.
- Estudiar la participación de PKC en el efecto ejercido por el A-68930 mediante el uso de NPC-15437, que es un bloqueador de PKC.

METODOLOGÍA

Aislamiento y cultivo de neuronas del ganglio espiral

Para el cultivo de neuronas del ganglio espiral se usaron ratas Long-Evans CII de 8-9 días de edad posnatal. Éstas fueron anestesiadas con sevofluorano para su posterior decapitación y una vez decapitadas se procedió de manera macroscópica a remover la piel de la cabeza, el maxilar inferior, el cráneo y el encéfalo. Bajo microscopio estereoscópico se identificó la cápsula ótica y se disecó el ganglio espiral. Los ganglios obtenidos recibieron un tratamiento enzimático durante 30 minutos con tripsina porcina y colagenasa IA, a concentración de 1.25 mg/ml cada una, disueltas en medio L-15. Transcurridos los 30 minutos se enjuagaron los ganglios con medio L-15 fresco, se disociaron con pipeta Pasteur y se centrifugaron a 400 rpm durante 5 minutos y este procedimiento de enjuague, disociación y centrifugación se realizó tres veces, retirando

el sobrenadante y adicionando medio fresco entre cada una de las veces. Las neuronas aisladas se sembraron en gotas en vidrios colocados en cajas Petri y pretratados con 100 µg/ml de poly-D-lysina con 2 ml de medio L-15 modificado (suplementado con 10% suero bovino fetal (BFS), 500 UI de penicilina, 15.7mM NaHCO₃, 15.8mM HEPES y ajustado a un pH de 7.4). Así se mantuvieron en una atmósfera de 95% aire – 5% CO₂, incubando a 37°C por un periodo de entre 18-24 horas hasta el registro, en el cual las placas de cultivo se montaron sobre el microscopio de contraste de fases (Limón *et al.*, 2005).

Fármacos

Se usó dopamina preparada en condiciones de mínima luz, disolviendo en solución extracelular adicionada con ácido ascórbico a una concentración 100 µM. Los agonistas A-68930 (agonista de la familia D1) y quinpirole (agonista de la familia D2), se prepararon al momento de realizar el experimento disolviéndolos en solución extracelular. También se utilizó el antagonista de la familia D1 SCH-23390 y el antagonista de la familia D2, el eticlopride, para determinar la especificidad de los efectos de los agonistas. También se usaron 8-Br-AMPC, H89, NPC-15437 y GDP-β-S adquiridos en Sigma Aldrich, de los cuales el primero se preparó en solución extracelular y los otros tres en la solución intracelular.

Soluciones

Para registros de fijación de corriente se usaron soluciones normales cuya composición consistió en lo siguiente:

La solución extracelular normal contiene (en mM): C₂H₅O₄SNa 140, CaCl₂ 1.8, K-Gluconato 5.4, MgCl₂ 1.2 y HEPES 10. La intracelular normal contiene: C₂H₅O₄SNa 10, CaCl₂ 0.134, K-Gluconato 125, HEPES 5 y EGTA 10.

Para el registro de la corriente de sodio se modificaron las soluciones con bloqueadores de las demás corrientes. La solución extracelular para aislar la corriente de sodio tiene los siguientes componentes (en mM): CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, HEPES 10, NaCl 90, TEA-Cl 45 y 4-AP 10. La solución intracelular contiene: HEPES 5, EGTA 8, NaCl 10, TEA-Cl 10, CsCl 30 y CsF 100. La solución intracelular fue adicionada con ATP, GTP y fosfocreatina y la extracelular con glucosa y las soluciones extracelulares se llevaron a un pH de 7.4 y las intracelulares a 7.2.

Registro electrofisiológico

Para el registro electrofisiológico usamos la técnica de fijación de voltaje en su configuración de célula completa así como fijación de corriente. Las células se bañaron todo el tiempo que duró el experimento con solución extracelular y para el registro se emplearon pipetas de vidrio obtenidas con un estirador de pipetas horizontal (P 2000, Sutter Inst.), con una resistencia de 2 a 4 M Ω . Las pipetas fueron llenadas con la solución intracelular. Al momento de tocar la célula, se procedió a formar un sello de alta resistencia succionando ligeramente con la boca. Una vez formado el sello de alta resistencia (mayor a 1 G Ω), se succionó de modo rápido y corto hasta romper la membrana celular y establecer contacto eléctrico con el interior de la neurona y así formar la configuración de célula completa. La resistencia de acceso se compensó al 80%. Para el registro se utilizó un amplificador (Axopatch 200B) y una tarjeta de adquisición analógico-digital, Digidata 1440A (Axon Inst.). La frecuencia de muestreo se hizo a 20 kHz. Se usó un dispositivo de perfusión de cambios rápidos (aproximadamente 20 ms) mediante un motor de pasos y tubos de perfusión cuadrados (Warner SF-77B), lo que produce un flujo laminar uniforme alrededor de la célula en registro con posibilidad de perfundir varias soluciones o fármacos diferentes a cada célula.

Fijación de voltaje

Para el estudio de la activación de la corriente de sodio los pulsos de voltaje parten de -100 mV ya que a este voltaje tenemos disponibles todos los canales para ser activados y se dan pulsos crecientes de 10 en 10 mV desde -110 hasta 50 mV para ver la activación en función del voltaje. La duración de este prepulso es de 100 ms para además tener la posibilidad de ver si hay corriente persistente. Con los datos de medición de la corriente al pico en el prepulso se construyó la curva corriente voltaje y la curva de conductancia. Del pulso de prueba que va a -20 mV se medirá la conductancia, que es una medida directa de la probabilidad de apertura de los canales, y se construirá la curva de inactivación de estado estable (Figura 9A). El voltaje de -20 mV se eligió porque es el valor de voltaje en el cual se aprecia la mayor amplitud de la corriente de sodio.

Para estudiar el curso temporal del efecto de dopamina sobre la corriente de sodio aislada se dieron pulsos partiendo de un voltaje de sostenimiento a -70 mV, luego va a -100 mV y luego a un voltaje de -20 mV durante 100 ms de forma repetitiva cada 6s. De esta forma se registró la corriente control y su modificación luego de la aplicación del fármaco y su recuperación (Figura 9B).

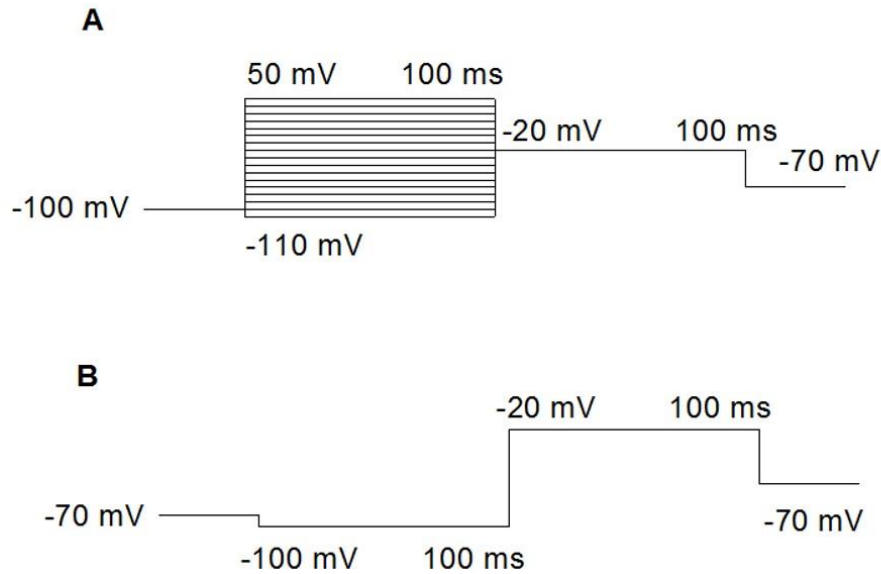


Fig. 9 Protocolos para el aislamiento de la corriente de sodio. A) Protocolos de pulsos crecientes con delta de 10 mV para el aislamiento de corriente de sodio. B) Pulso fijo para corriente de sodio aislada.

Fijación de corriente

Los protocolos para fijación de corriente fueron los que se muestran en la figura 12. El primero es un protocolo de pulsos que va de -100 pA a 500 pA, con un voltaje de sostenimiento a -80 mV y una duración de 200 ms (Figura 10A), y también se muestra un pulso fijo de 400 pA con duración de 3 ms (Figura 10B).

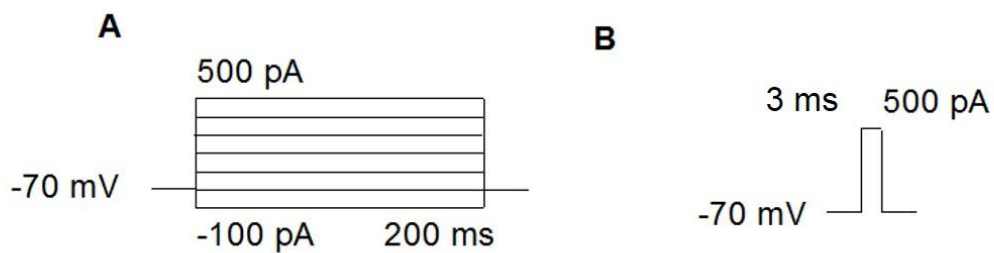


Fig. 10 Protocolos de fijación de corriente A) Pulso para registro de fijación de corriente dando pasos desde -600 pA hasta 800 pA, con deltas de 100 pA. B) Pulso fijo corto diseñado para producir un solo potencial de acción.

Para estudiar el efecto de agonistas D1 y D2 sobre la actividad producida por pulsos de corriente (y eventualmente sobre la actividad espontánea), se aplicó un protocolo control y luego el mismo protocolo en presencia del fármaco.

Para el estudio de la actividad eléctrica en fijación de corriente se midió la frecuencia de descarga de las neuronas y para el estudio de los potenciales de acción, en que las neuronas se mantuvieron a un potencial de membrana de -80 mV, se midió

la amplitud del potencial (medida desde el voltaje de sostenimiento al pico máximo de despolarización), las duración se midió al 50% y la posthiperpolarización se calculó como la diferencia entre el voltaje hiperpolarizante luego del potencial de acción y el voltaje cuando el potencial ha regresado a su valor de reposo (potencial de membrana) con inyección de corriente constante. El umbral, la tasa de despolarización y la tasa de repolarización se midieron usando un gráfico de plano de fases, esto es, graficando la derivada del voltaje respecto al tiempo (dV/dt), contra el voltaje (Figura 11).

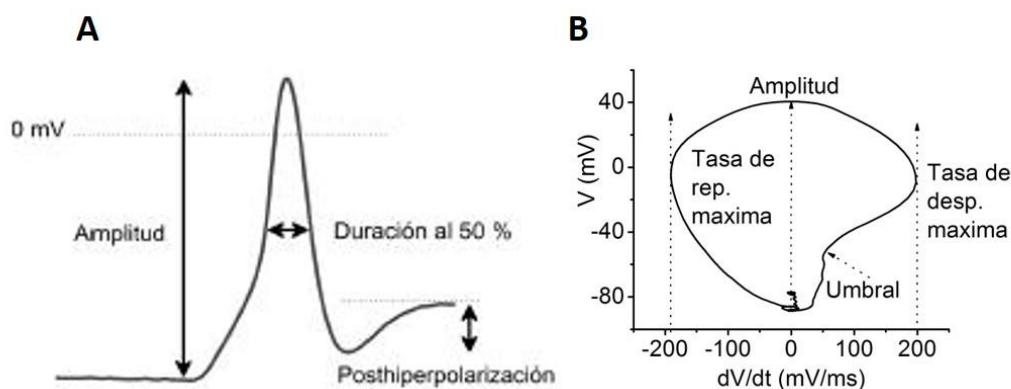


Fig. 11 Parámetros medidos del potencial de acción. A) Trazo de un potencial de acción en donde se indican los parámetros que se miden y B) gráfico de plano de fase de un potencial de acción.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores se reportan como el promedio \pm el error estándar. Los registros se analizaron usando el pClamp versión 10.2 y las curvas corriente contra voltaje y las de activación e inactivación fueron elaboradas con el programa Origin 8. El análisis estadístico se realizó usando el programa MINITAB 14. La diferencia entre las condiciones control y aplicación de los fármacos se evaluaron con la prueba t de Student pareada, considerando una diferencia significativa con una $P < 0.05$, para todos los casos se indica el valor de P . Para comparar entre grupos de series diferentes se usó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney U.

RESULTADOS

Fijación de voltaje. Corriente de sodio aislada.

Para comprobar que con las soluciones que usamos registramos corriente de sodio, realizamos dos series experimentales, una en la que aplicamos tetrodotoxina (TTX) a concentración 100 nM que es un bloqueador del poro del canal de sodio y otra en la que aplicamos nifedipina a concentración 10 μ M y níquel a concentración 100 μ M. Los dos últimos fármacos son bloqueadores de los canales de calcio tipo L y T respectivamente.

Como resultado obtuvimos que al aplicar la TTX la corriente de sodio es bloqueada completamente (Figura 12A, B). Por otra parte, al aplicar níquel y nifedipina no hay cambios en la amplitud de la corriente de sodio respecto al control (Figura 12C, D)

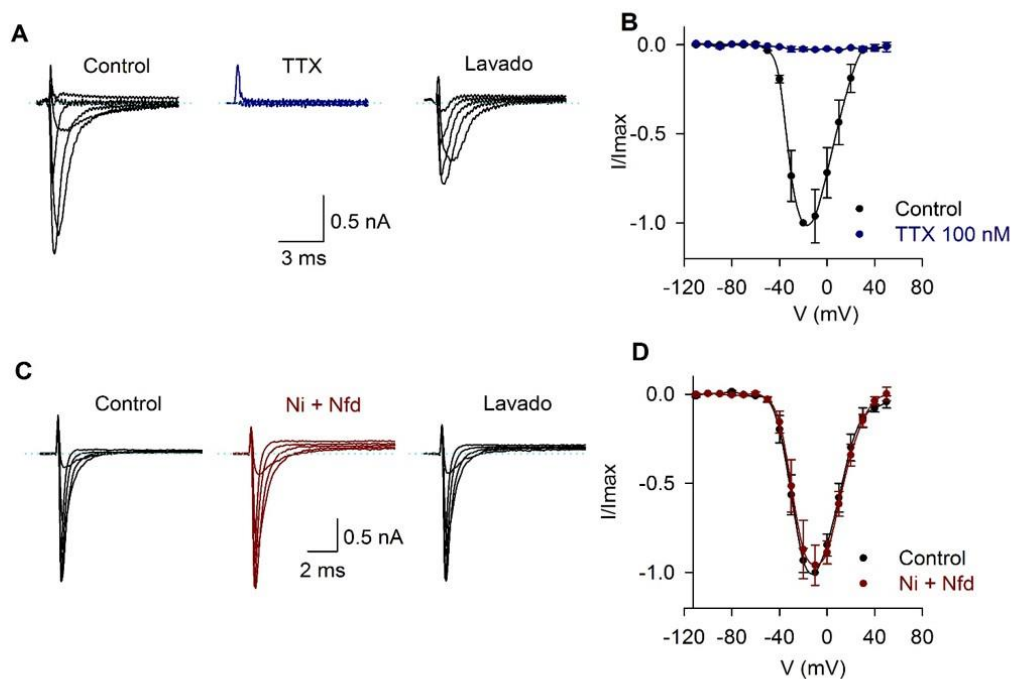


Fig 12. Registro de la corriente de sodio. A) Trazos de registro de la corriente de sodio en condiciones control, con aplicación de TTX y el lavado. B) Curva corriente contra voltaje del bloqueo de la corriente de sodio con TTX. C) Trazos de registro de la corriente de sodio en condiciones control, con la aplicación de níquel y nifedipina y el lavado. D) Efecto de los bloqueadores de la corriente de calcio sobre la corriente de sodio.

Esto demuestra que la corriente que registramos es una corriente típica de Na^+ sensible a TTX y que en este componente rápido de entrada de corriente no hay una contribución significativa de corriente de Ca^{2+} .

La capacitancia del total de células que hemos registrado ($n = 380$) es de 9 ± 0.5 pF. En 137 tuvimos el dato acerca del sitio del ganglio al cual corresponden ya sea basal o apical. Analizamos si había diferencias entre los dos grupos y no hubo encontrando

que las células de la porción basal tienen un promedio de 8 ± 0.4 pF y las de la porción apical tienen 8 ± 0.3 pF (Figura 13A). En la figura 13B presentamos un histograma de distribución de la capacitancia. Realizando un análisis de la densidad de corriente encontramos que ésta tiene una distribución normal ($R = 0.93$) con un promedio de 216 ± 13 pA/pF (Figura 13C). Encontramos que no hay correlación entre la amplitud de la corriente de las células y su capacitancia ($R = 0.0126$; $S = 0.074 \pm 0.05$; Figura 13D).

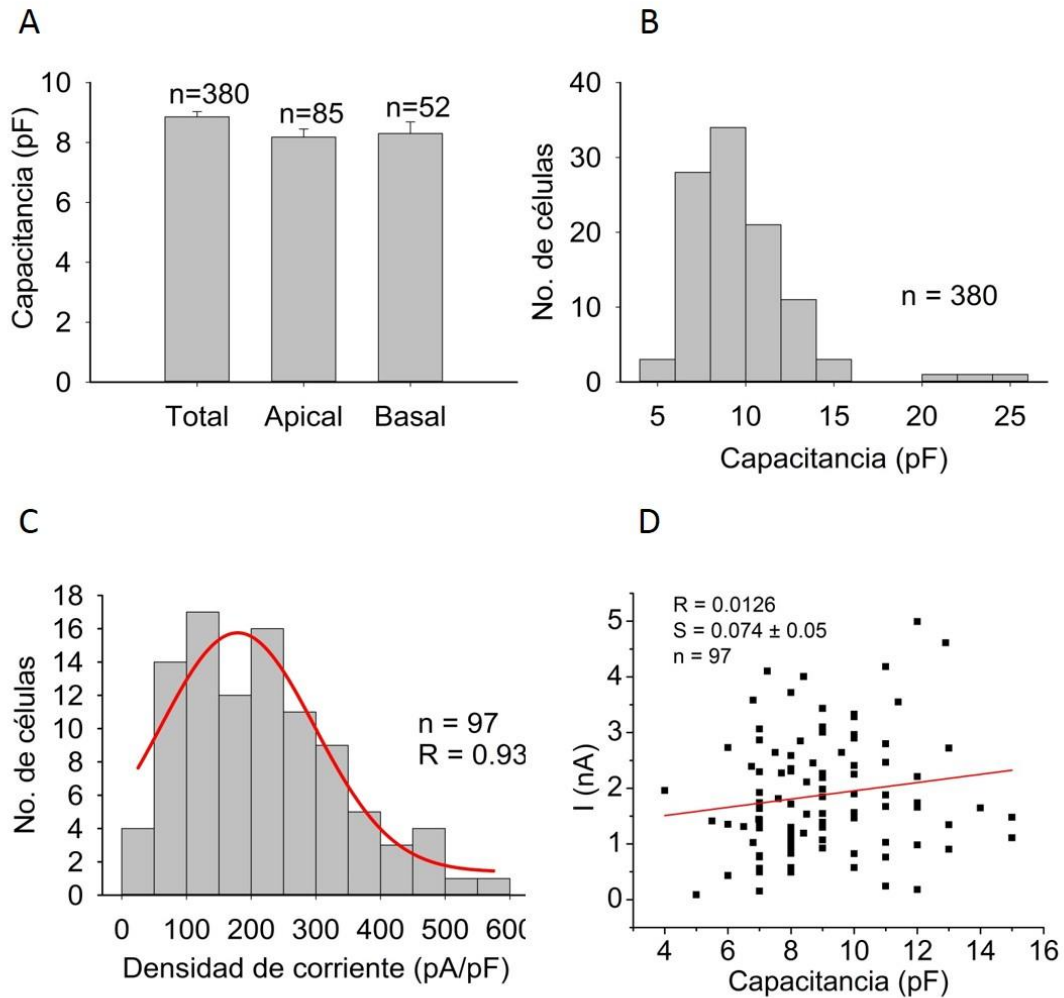


Fig. 13. Capacitancia de las neuronas del ganglio espiral. A) Barras que muestran el promedio \pm el error estándar de la capacitancia de las células. La primera barra es el total de neuronas, la segunda corresponde a las células que se identificaron como pertenecientes a la porción apical y la tercera corresponde a las células que se identificaron como pertenecientes a la porción basal. B) Histograma de distribución de la capacitancia con un promedio de 9 ± 0.5 pF. C) Histograma de distribución de la densidad de la corriente de sodio. Tiene una distribución normal (línea continua), con un promedio de 216 ± 13 pA/pF. D) Diagrama de correlación entre capacitancia y amplitud de corriente ($R = 0.0126$; $S = 0.074 \pm 0.05$).

Probamos diferentes concentraciones de dopamina (1 nM – 100 μ M) para estudiar su efecto sobre la corriente de sodio aislada. Encontramos que hay una disminución en la amplitud de dicha corriente y a continuación describimos el efecto para cada una de las concentraciones estudiadas. En todos los casos evaluamos la

amplitud de la corriente, la densidad de corriente, el voltaje medio y la pendiente de activación y de inactivación. Para la amplitud de corriente y la densidad de corriente, se presentan los datos de los voltajes a los cuales hay cambios significativos.

Efecto de la dopamina (DA) sobre la corriente de sodio

La DA a la concentración 1 nM ($n = 6$) no produjo cambios en la amplitud, en la densidad de corriente, en el $V_{1/2}$ ni en la pendiente de activación. El $V_{1/2}$ de inactivación se desplazó de -71 a -78 mV ($P = 0.029$) y la pendiente no se modificó

Con la aplicación de DA 100 nM ($n = 7$) la corriente de sodio disminuye al voltaje -20 mV un $17 \pm 5\%$ ($P = 0.011$). No hay cambios en la densidad de corriente, en el $V_{1/2}$ ni en la pendiente de activación. El $V_{1/2}$ de inactivación se desplaza 12 mV hacia potenciales más negativos ($P = 0.001$) de -71 a -83 mV, aunque la pendiente de inactivación no cambia.

La aplicación de DA 1 μ M ($n = 10$) no produce cambios en la amplitud, densidad de corriente, $V_{1/2}$ ni en la pendiente de activación. El $V_{1/2}$ de inactivación se desplaza de -72 a -80 mV ($P = 0.016$) y la pendiente no se modifica

El uso de la DA en concentración de 3 μ M ($n = 6$) produce una disminución de la amplitud de la corriente de sodio a -40 mV de $54 \pm 6\%$ ($P = 0.025$), a -30 mV ($58 \pm 8\%$, $P = 0.01$), a -20 mV ($42 \pm 10\%$, $P = 0.01$) y a -10 mV ($36 \pm 12\%$, $P = 0.036$). La densidad de corriente disminuye a los voltajes -50 mV ($57 \pm 18\%$, $P = 0.027$), -40 mV ($54 \pm 6\%$, $P = 0.008$), -30 mV ($58 \pm 8\%$, $P = 0.049$) y -20 mV ($42 \pm 10\%$, $P = 0.009$). No hay cambios significativos ni en el $V_{1/2}$ ni en la pendiente de activación. El $V_{1/2}$ de inactivación se desplaza de -77 a -86 ($P = 0.012$) sin que se modifique la pendiente (Figura 15).

Con la DA 10 μ M ($n = 9$) la amplitud de la corriente disminuye a los voltajes de -30 mV a 10 mV con su máximo efecto en -20 mV donde disminuyó $43 \pm 8\%$ ($P = 0.001$). La densidad de la corriente disminuye a los voltajes de -20 mV y hasta 20 mV con su máximo efecto a -20 mV donde disminuyó $43 \pm 9\%$ ($P = 0.003$). No hubo cambios en el $V_{1/2}$ ni en la pendiente de activación ni de inactivación.

Con la DA 100 μ M ($n = 8$) la amplitud de la corriente de sodio disminuyó a los voltajes de -30 a 30 mV con máximo efecto a -20 mV donde disminuyó $49 \pm 4\%$ ($P < 0.001$). La densidad de corriente disminuyó desde -30 mV hasta 30 mV con máximo efecto a -20 mV ($49 \pm 4\%$, $P < 0.001$). El $V_{1/2}$ de inactivación se desplaza de -71 a -85 mV ($P < 0.001$). No hubo cambios en el valor de la pendiente inactivación y no hubo cambios en el $V_{1/2}$ ni en la pendiente de activación.

A continuación se presenta la curva concentración-respuesta contra porcentaje de disminución en la que la concentración efectiva cincuenta es 2.5×10^{-6} M. (Figura 14).

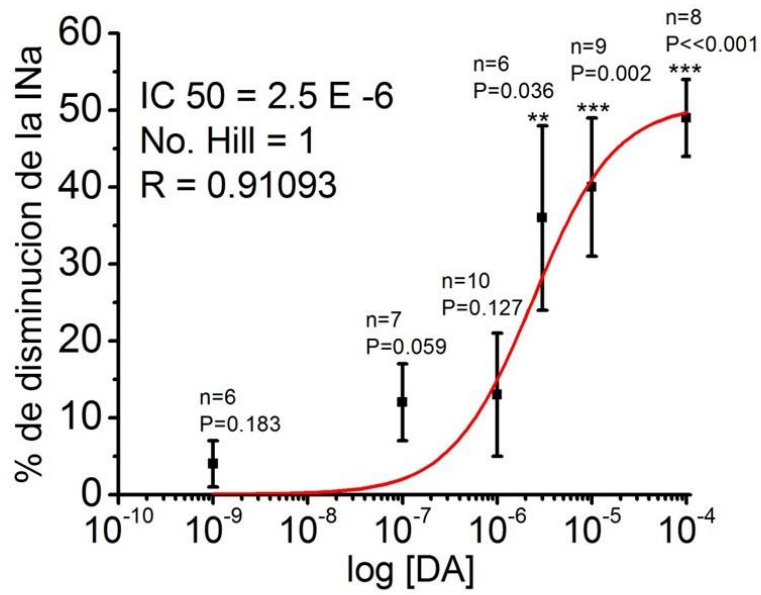


Fig 14. Curva dosis-efecto de la aplicación de dopamina a diferentes concentraciones. Los puntos fueron ajustados a una curva sigmoideal basada en la ecuación de Hill ($y = V_{max} (x^n / k^n + x^n)$, donde n es el número de Hill y k es la IC50).

La siguiente muestra los efectos de la DA a la concentración 3 μ M, que es la concentración que se probó que es más cercana a la IC50 obtenida (Figura 15).

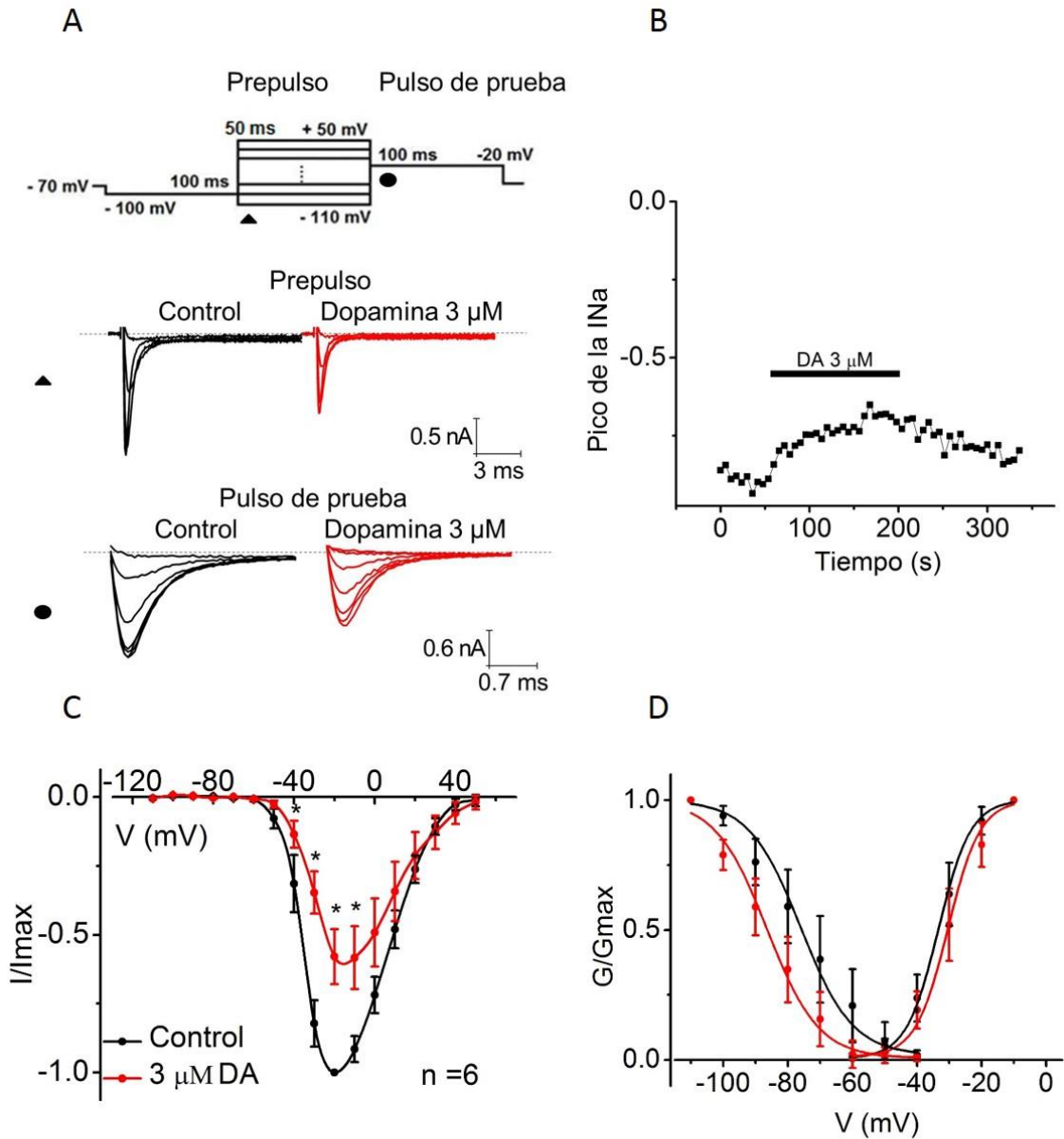


Fig 15. Efecto de la aplicación de dopamina 3 μM sobre la corriente de sodio. A) Protocolo de fijación de voltaje que se usó para estudiar la I_{Na} . Los símbolos en el protocolo y a la izquierda de los trazos indican dónde se realizó la medición y el trazo obtenido respectivamente. Los trazos son registros de la corriente de sodio en el prepulso y en el pulso de prueba. B) Curso temporal de la amplitud al pico de la corriente de sodio medida a -10 mV. La barra negra indica el tiempo de aplicación del fármaco. C) Curva corriente contra voltaje de la corriente de sodio. D) Curvas de activación y de inactivación de la conductancia de sodio. En ambos casos los puntos representan el valor medio \pm ES y la línea continua el ajuste a los datos usando una ecuación Boltzmann.

El efecto de DA 100 μM es parcialmente bloqueado por antagonistas de la familia D1 y D2

Al aplicar 100 μM de DA, coaplicando los antagonistas de la familia D1 y D2 (eticlopride 1 μM + SCH-23390 300 nM) hay una disminución significativa en un rango de voltaje de -20 mV a 0 mV con el efecto máximo a -20 mV donde disminuye un $18 \pm 6\%$ ($P = 0.029$) (Figura 16A, B). Un efecto similar se obtuvo para la densidad de corriente. La activación

no cambió de modo significativo y la curva de inactivación se desplaza de -70 mV a -75 mV ($P = 0.019$) sin cambiar la pendiente (Figura 16C).

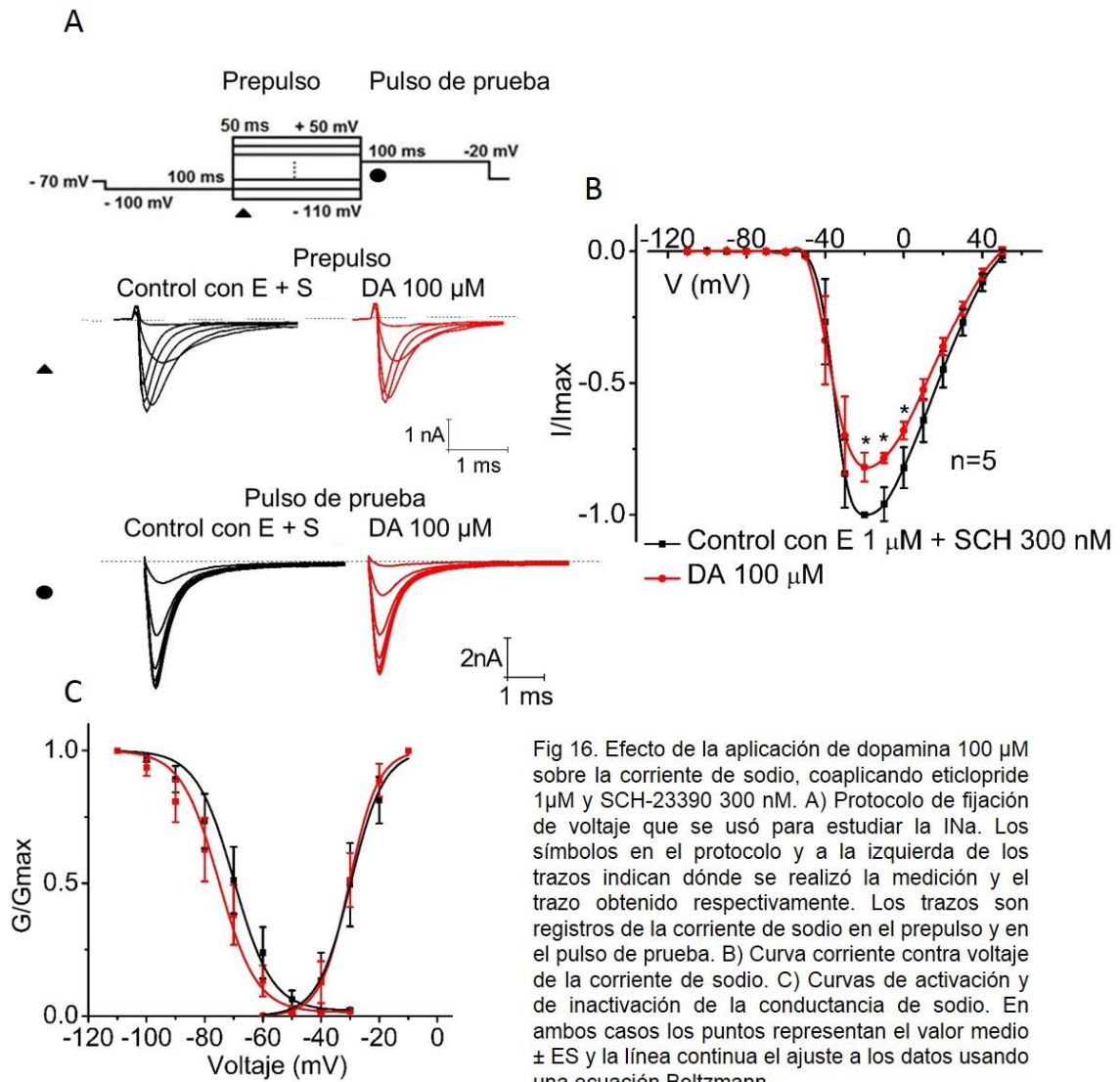


Fig 16. Efecto de la aplicación de dopamina 100 μ M sobre la corriente de sodio, coaplicando eticlopride 1 μ M y SCH-23390 300 nM. A) Protocolo de fijación de voltaje que se usó para estudiar la INa. Los símbolos en el protocolo y a la izquierda de los trazos indican dónde se realizó la medición y el trazo obtenido respectivamente. Los trazos son registros de la corriente de sodio en el prepulso y en el pulso de prueba. B) Curva corriente contra voltaje de la corriente de sodio. C) Curvas de activación y de inactivación de la conductancia de sodio. En ambos casos los puntos representan el valor medio \pm ES y la línea continua el ajuste a los datos usando una ecuación Boltzmann.

Si bien los antagonistas no bloquean completamente el efecto de dopamina, el porcentaje de disminución es menor y diferente significativamente que la disminución que se obtiene bloqueando a los receptores (Figura 17).

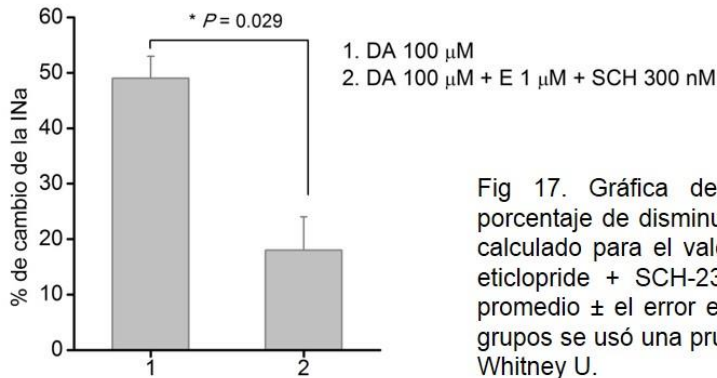


Fig 17. Gráfica de barras que representa el porcentaje de disminución de la corriente de sodio, calculado para el valor a -20 mV, con DA y DA + eticlopride + SCH-23390. Se presentan como el promedio \pm el error estándar. Para comparar entre grupos se usó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney U.

A continuación abordamos el estudio de agonistas y antagonistas por familia de receptores. Usamos el A-68930 a concentración 300 nM, que es un agonista de la familia D1 y el SCH-23390 300 nM, antagonista de dicha familia. Así mismo usamos el quinpirole a concentración 1 μ M, que es un agonista de la familia D2. Presentamos los resultados de la misma manera que presentamos los resultados con aplicaciones de dopamina.

El A-68930 (agonista de la familia D1) disminuye la amplitud de la corriente de sodio

La aplicación de A-68930 300 nM ($n = 14$) reduce la corriente de sodio a los voltajes -30 a 30 mV con máximo efecto a -10 mV de $29 \pm 4\%$ ($P < 0.001$) pero sin mostrar una dependencia de voltaje. Algo similar sucede en la curva de la densidad de corriente. No hubo cambios en el $V_{1/2}$ de activación ni en la pendiente. El $V_{1/2}$ de inactivación se desplazó de -74 mV a -81 mV ($P < 0.001$) sin cambios en la pendiente de inactivación (Figura 18).

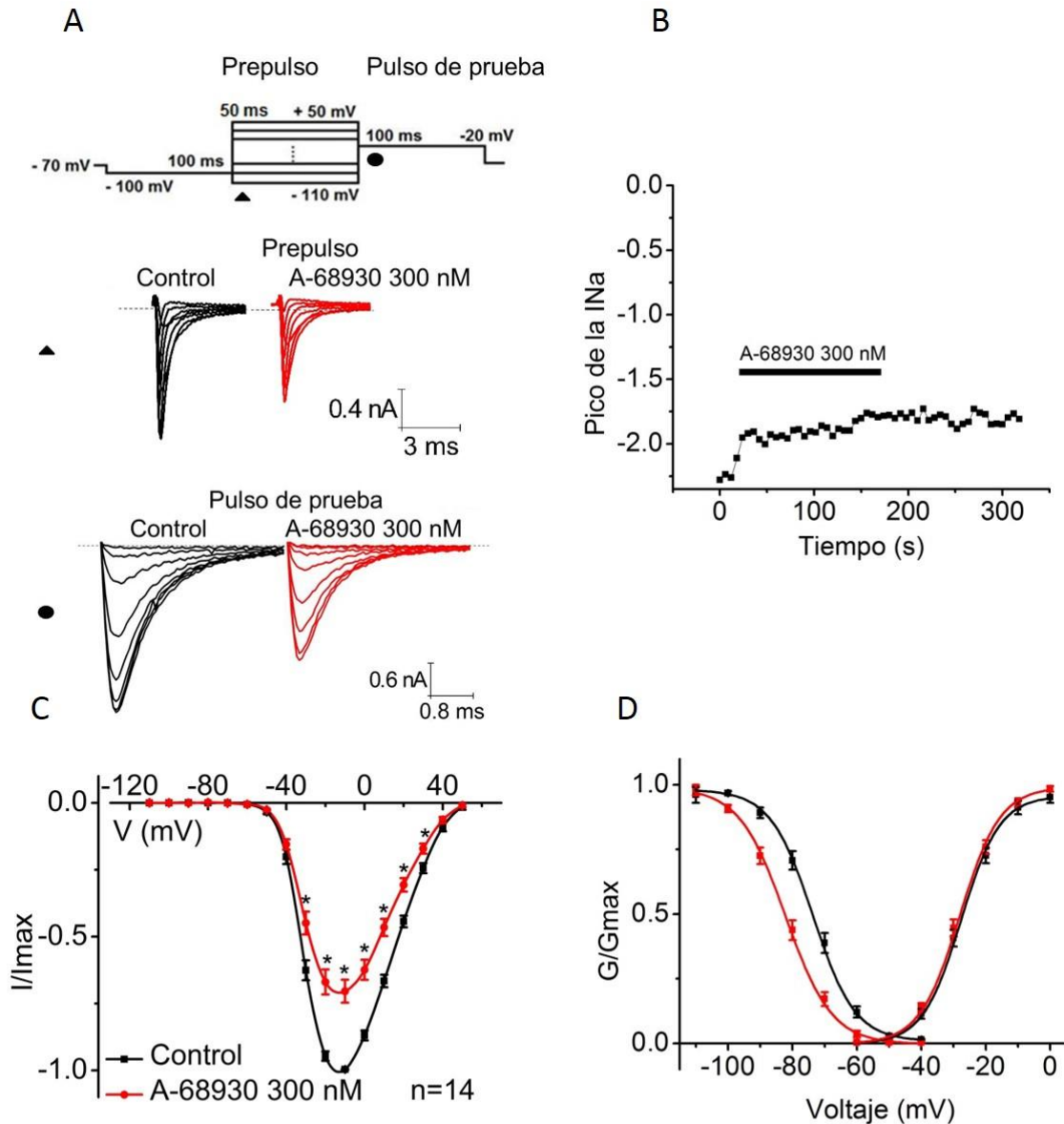


Fig 18. Efecto de la aplicación de A-68930 300 nM sobre la corriente de sodio. A) Protocolo de fijación de voltaje que se usó para estudiar la INa. Los símbolos en el protocolo y a la izquierda de los trazos indican dónde se realizó la medición y el trazo obtenido respectivamente. Los trazos son registros de la corriente de sodio en el prepulso y en el pulso de prueba. B) Curso temporal de la amplitud al pico de la corriente de sodio medida a -10 mV. La barra negra indica el tiempo de aplicación del fármaco. C) Curva corriente contra voltaje de la corriente de sodio. D) Curvas de activación y de inactivación de la conductancia de sodio. En ambos casos los puntos representan el valor medio \pm ES y la línea continua el ajuste a los datos usando una ecuación Boltzmann.

El SCH-23390 no bloquea el efecto de A-68930 sobre la INa

En la siguiente serie experimental ($n = 5$) preaplicamos el antagonista SCH-23390 (antagonista de la familia D1) 300 nM para ver si antagoniza el efecto del A-68930. Encontramos que el SCH23390 ejerce un efecto por si solo como se describe a continuación.

Al aplicar el SCH-23390 la amplitud de la corriente de sodio disminuyó significativamente a los voltajes en el rango de -30 a 40 mV con una inhibición de $31 \pm$

3% ($P = 0.001$) a 0 mV. Al coaplicar el SCH-23390 con el A-68930 encontramos que se produce una inhibición adicional de la amplitud de la corriente que es significativa en el rango de -40 a 30 mV con una inhibición a -10 mV de $29 \pm 3\%$ ($P = 0.001$). La densidad de corriente también disminuye con la aplicación del SCH-23390 de forma similar. No hay cambios en el valor de $V_{1/2}$ ni en la pendiente de activación y el $V_{1/2}$ de inactivación se desplaza de -73 mV a -83 mV ($P < 0.001$) al aplicar SCH-23390 y al coaplicarlo con el A-68930 se desplaza de -83 a -87 ($P = 0.016$). En la pendiente de inactivación no hay cambios (Figura 19).

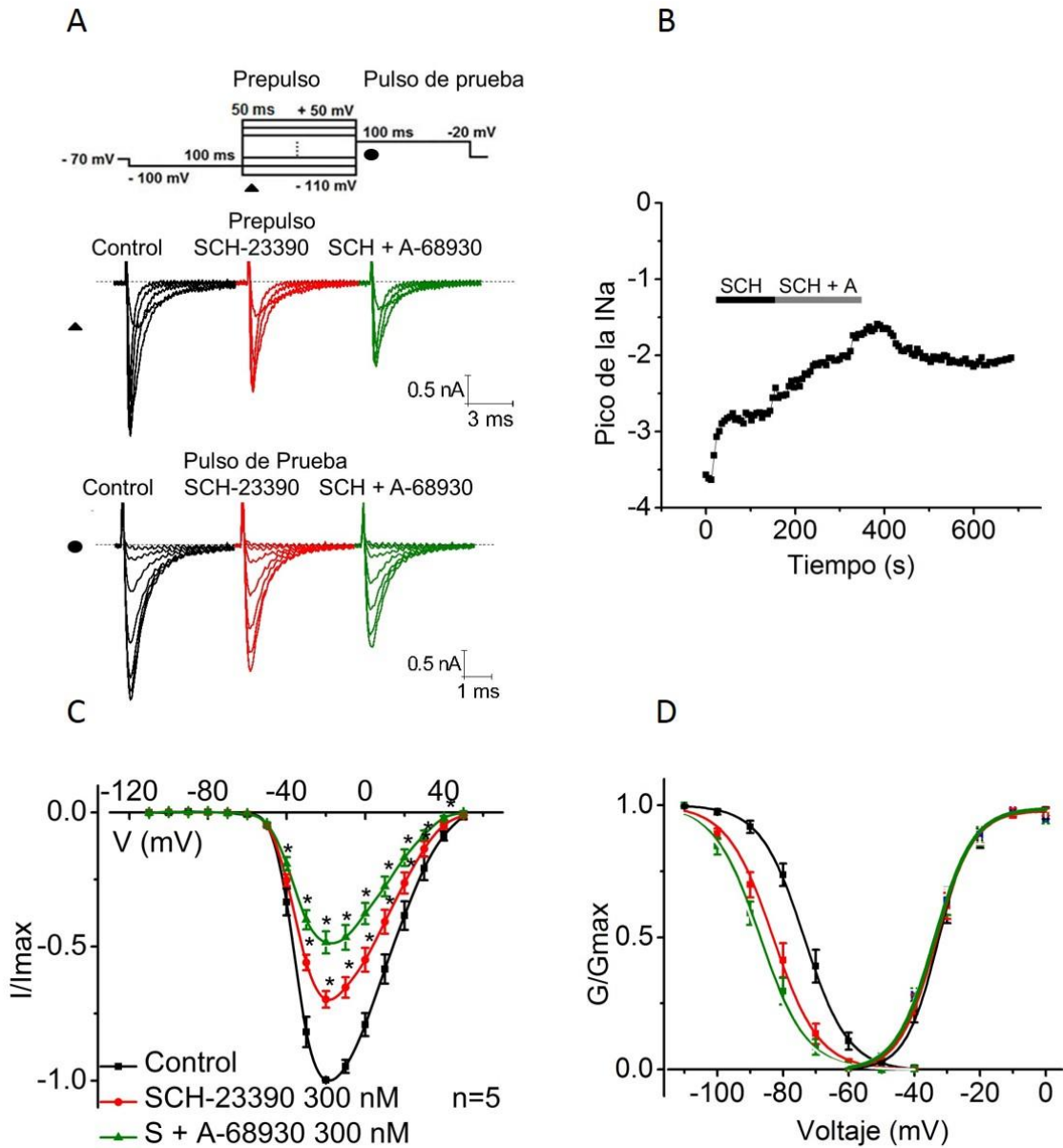


Fig 19. Efecto de la aplicación de A-68930 300 nM y de SCH-23390 300 nM sobre la corriente de sodio. A) Protocolo de fijación de voltaje que se usó para estudiar la INa. Los símbolos en el protocolo y a la izquierda de los trazos indican dónde se realizó la medición y el trazo obtenido respectivamente. Los trazos son registros de la corriente de sodio en el prepulso y en el pulso de prueba. B) Curso temporal de la amplitud al pico de la corriente de sodio medida a -10 mV. La barra negra indica el tiempo de aplicación del fármaco. C) Curva corriente contra voltaje de la corriente de sodio. D) Curvas de activación y de inactivación de la conductancia de sodio. En ambos casos los puntos representan el valor medio \pm ES y la línea continua el ajuste a los datos usando una ecuación Boltzmann.

El quinpirole disminuye la amplitud de la INa

El quinpirole 1 μ M, agonista de la familia D2 de los receptores dopaminérgicos, disminuye la amplitud de la corriente de sodio de forma significativa a todos los voltajes (n = 10). El porcentaje de disminución a -10 mV fue de $28 \pm 6\%$ ($P = 0.001$). La densidad

de corriente se comportó de forma similar. El voltaje medio de activación y de inactivación no cambiaron (Figura 20).

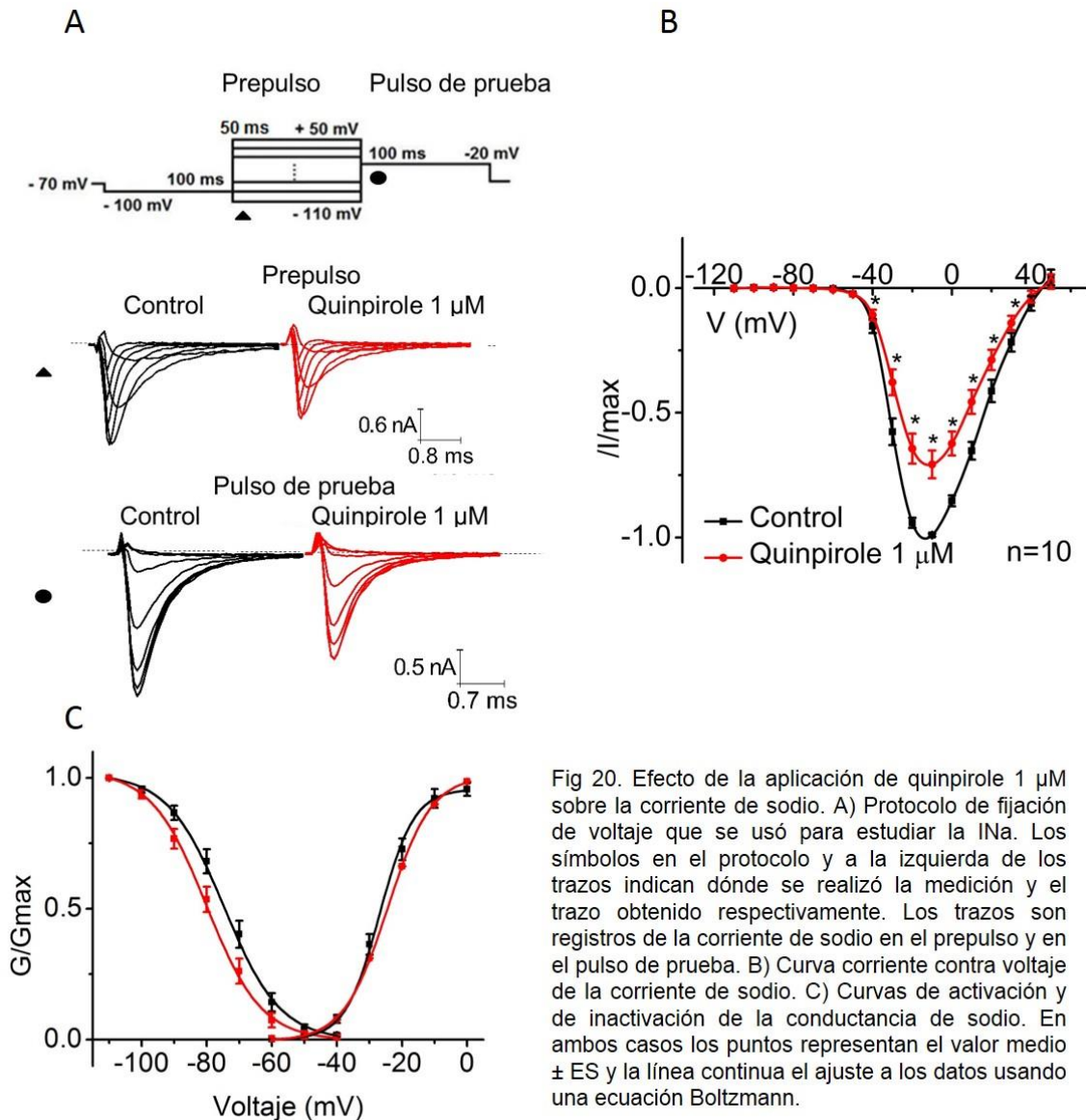


Fig 20. Efecto de la aplicación de quinpirole 1 μM sobre la corriente de sodio. A) Protocolo de fijación de voltaje que se usó para estudiar la INa. Los símbolos en el protocolo y a la izquierda de los trazos indican dónde se realizó la medición y el trazo obtenido respectivamente. Los trazos son registros de la corriente de sodio en el prepulso y en el pulso de prueba. B) Curva corriente contra voltaje de la corriente de sodio. C) Curvas de activación y de inactivación de la conductancia de sodio. En ambos casos los puntos representan el valor medio ± ES y la línea continua el ajuste a los datos usando una ecuación Boltzmann.

El efecto de quinpirole es bloqueado por el eticlopride

Al aplicar el eticlopride (antagonista de la familia D2) encontramos que éste bloquea el efecto del agonista quinpirole (n = 4). Al aplicar el eticlopride la amplitud de la corriente de sodio disminuyó a -10 mV un $16 \pm 5\%$ ($P = 0.06$). Al coaplicar el quinpirole con eticlopride no hay cambios en la amplitud de la corriente. No hay cambios en el valor de $V_{1/2}$ ni en la pendiente de activación así como tampoco en la inactivación (Figura 21).

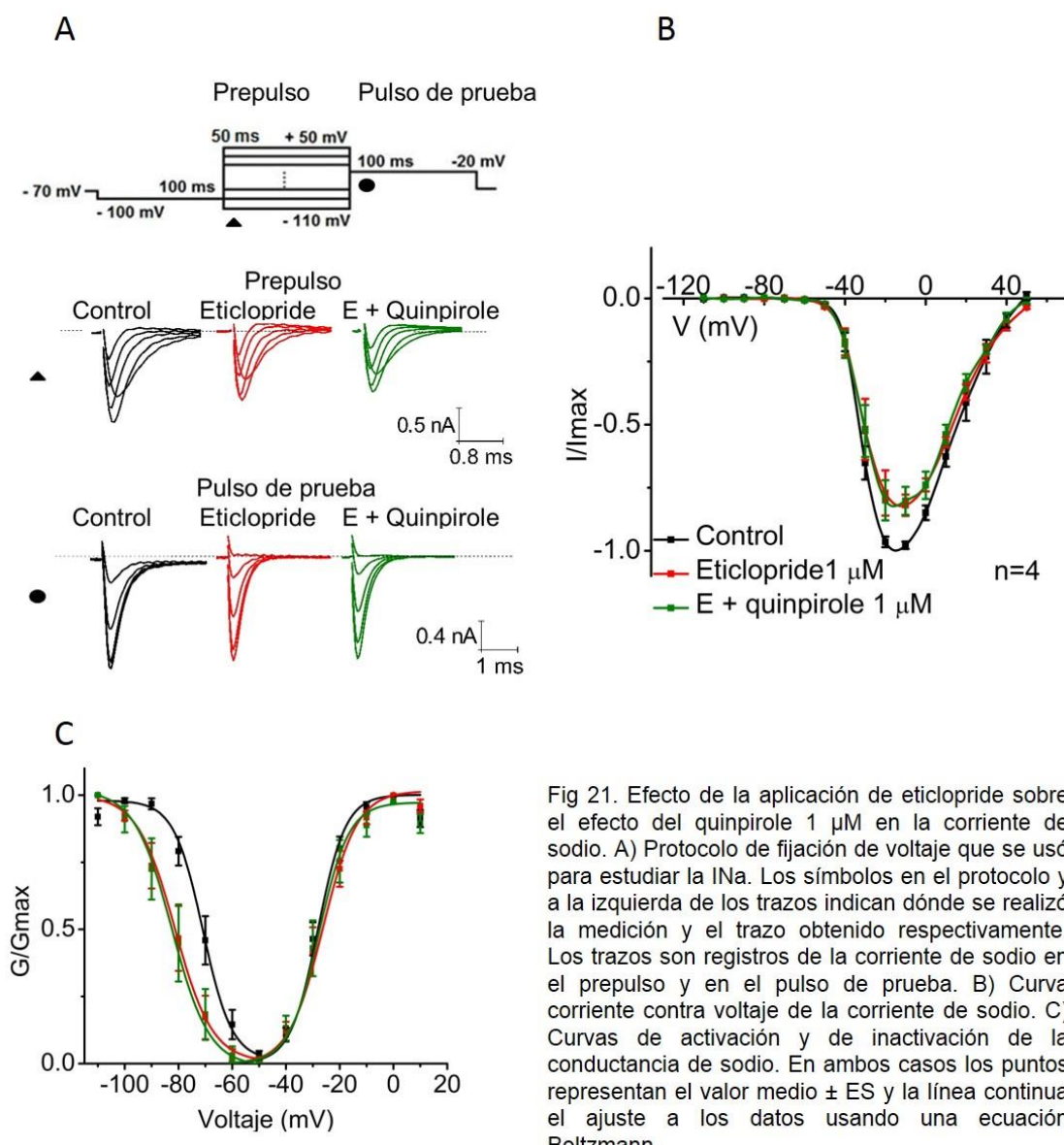


Fig 21. Efecto de la aplicación de eticlopride sobre el efecto del quinpirole 1 μM en la corriente de sodio. A) Protocolo de fijación de voltaje que se usó para estudiar la INa. Los símbolos en el protocolo y a la izquierda de los trazos indican dónde se realizó la medición y el trazo obtenido respectivamente. Los trazos son registros de la corriente de sodio en el prepulso y en el pulso de prueba. B) Curva corriente contra voltaje de la corriente de sodio. C) Curvas de activación y de inactivación de la conductancia de sodio. En ambos casos los puntos representan el valor medio ± ES y la línea continua el ajuste a los datos usando una ecuación Boltzmann.

Evaluación de la participación de las vías intracelulares en el efecto del A-68930

Evaluación de la participación de las proteínas G sobre el efecto de agonista D1

Con el objetivo de estudiar la participación de las vías mediadas por proteínas G decidimos usar el GDP-β-S (500 μM) que es un bloqueador inespecífico de proteínas G. Para su uso el GDP-β-S se colocó en la solución intracelular (en la pipeta) por lo que los controles en este caso son registros en células ya con el GDP-β-S perfundiendo el medio intracelular. Encontramos que hay una disminución importante del efecto del agonista A-68930 sobre la corriente de sodio. La amplitud de la corriente disminuyó con

el A-68930 a los voltajes -30 mV ($43 \pm 7\%$; $P = 0.002$), -20 mV ($25 \pm 6\%$; $P = 0.002$) y a -10 mV ($11 \pm 4\%$; $P = 0.032$). La densidad de corriente disminuyó a los voltajes -30 mV ($43 \pm 7\%$; $P = 0.017$), -20 mV ($25 \pm 6\%$; $P = 0.012$) y a -10 mV ($11 \pm 4\%$; $P = 0.016$). El voltaje medio de activación se desplazó de -26 ± 1 mV a -21 ± 1 mV ($P < 0.001$) y la pendiente cambió de 5 ± 0.5 a 6 ± 0.5 ($P = 0.02$). El voltaje medio de inactivación se desplazó de -70 ± 1 a -79 ± 0 mV ($P < 0.001$) y no hubo cambios en la pendiente de la curva de inactivación de estado estable (Figura 22).

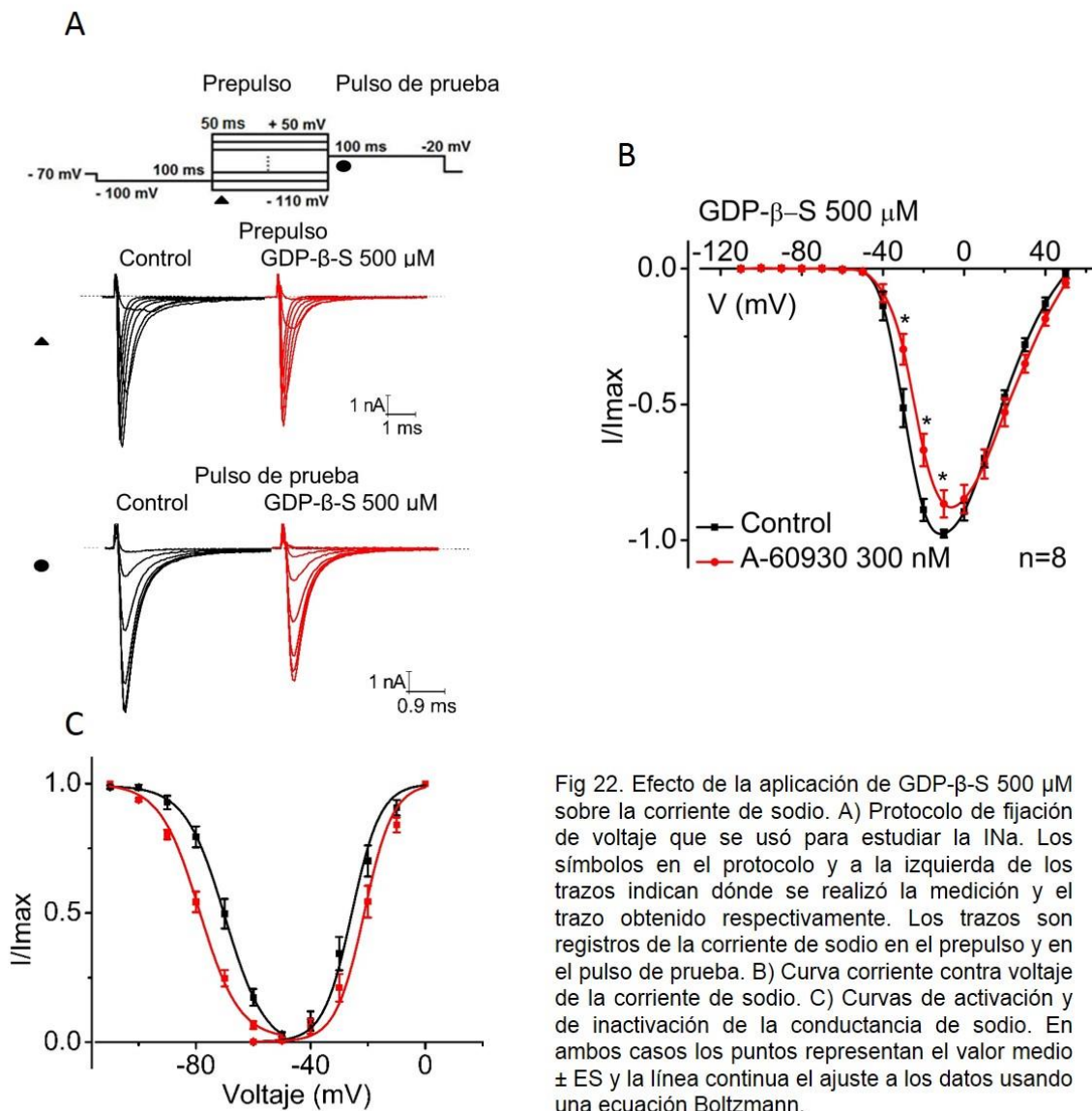


Fig 22. Efecto de la aplicación de GDP-β-S 500 μM sobre la corriente de sodio. A) Protocolo de fijación de voltaje que se usó para estudiar la INA. Los símbolos en el protocolo y a la izquierda de los trazos indican dónde se realizó la medición y el trazo obtenido respectivamente. Los trazos son registros de la corriente de sodio en el prepulso y en el pulso de prueba. B) Curva corriente contra voltaje de la corriente de sodio. C) Curvas de activación y de inactivación de la conductancia de sodio. En ambos casos los puntos representan el valor medio ± ES y la línea continua el ajuste a los datos usando una ecuación Boltzmann.

Evaluación de la participación de la PKA en los efectos de agonista D1

En estos experimentos se adicionó un inhibidor de la PKA, el H89 (1 μ M), a la solución intracelular (n = 6). Encontramos una disminución del efecto de A-68930 (300 nM) sobre la corriente de sodio. La amplitud de la corriente disminuyó a los voltajes de -20 y -10 mV ($18 \pm 4\%$ y $16 \pm 5\%$) con una $P = 0.003$ y 0.027 . La densidad de corriente disminuye de forma similar alrededor de 17 %. No hay cambios en el $V_{1/2}$ ni en la pendiente de activación, así como tampoco hay cambios en el $V_{1/2}$ ni en la pendiente de inactivación (Figura 23).

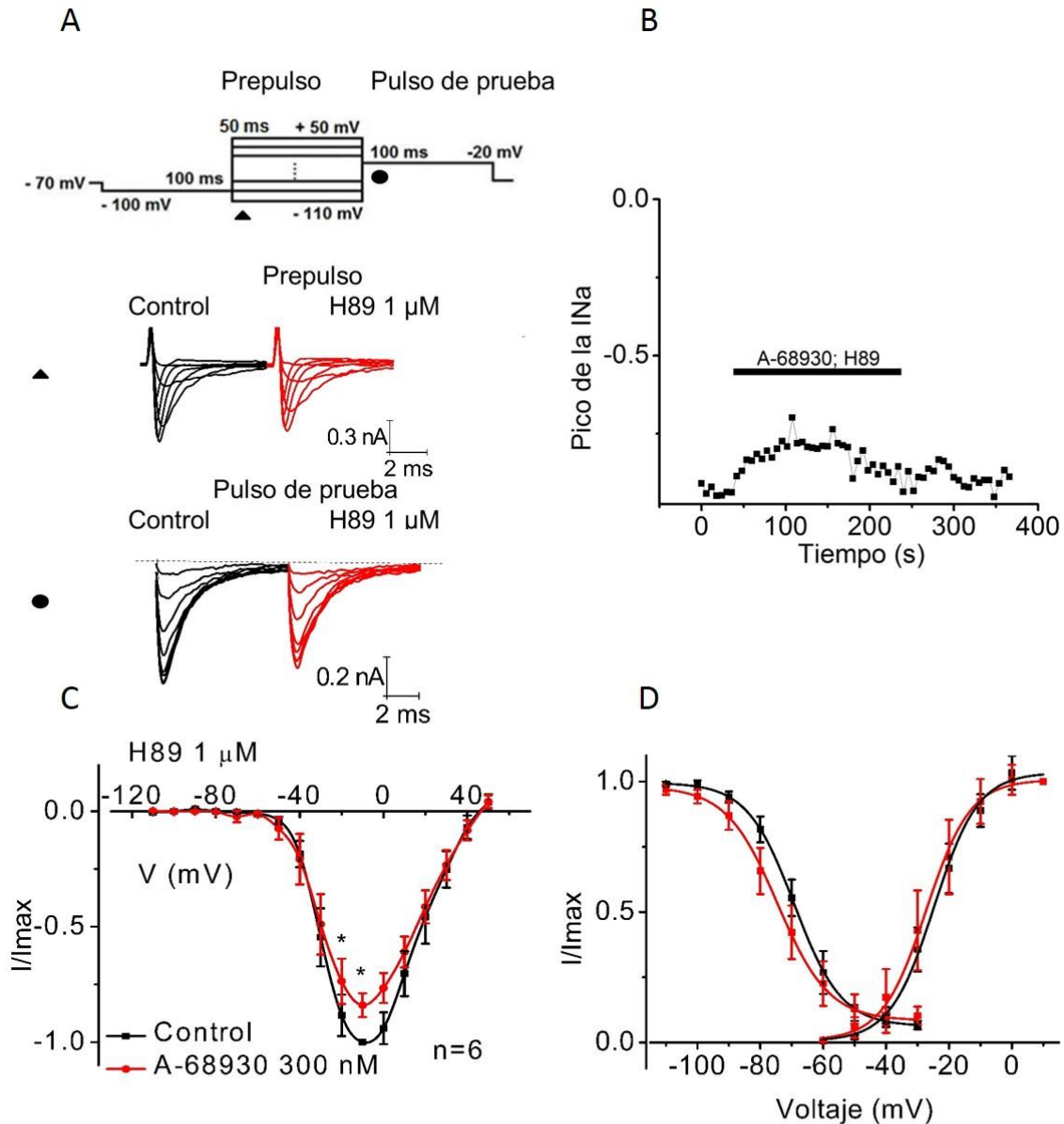


Fig 23. Efecto de la aplicación de A-68930 300 nM sobre la corriente de sodio con H89 1 μ M en la pipeta de registro. A) Protocolo de fijación de voltaje que se usó para estudiar la INa. Los símbolos en el protocolo y a la izquierda de los trazos indican dónde se realizó la medición y el trazo obtenido respectivamente. Los trazos son registros de la corriente de sodio en el prepulso y en el pulso de prueba. B) Curso temporal de la amplitud al pico de la corriente de sodio medida a -10 mV. La barra negra indica el tiempo de aplicación del fármaco. C) Curva corriente contra voltaje de la corriente de sodio. D) Curvas de activación y de inactivación de la conductancia de sodio. En ambos casos los puntos representan el valor medio \pm ES y la línea continua el ajuste a los datos usando una ecuación Boltzmann.

Evaluación de la participación del AMPc en el efecto de agonista D1

Para estudiar si el efecto encontrado es mediado por el aumento de AMPc como segundo mensajero decidimos aplicar 8-Br-AMPC (500 μ M), que es un análogo del AMPc. Lo aplicamos durante 4.5 minutos. Encontramos que no hay cambios en la amplitud ni en la densidad de corriente de sodio. Tampoco hay cambios en el $V_{1/2}$ ni en la pendiente de activación ni de inactivación.

Evaluación de la participación de la PKC en los efectos de agonista D1

Adicionando NPC-15437 500 nM (inhibidor selectivo de PKC) en la pipeta, encontramos que el A-68930 (300 nM) disminuye la amplitud de la corriente de sodio de forma similar a como lo hace en condiciones control (sin NPC-15437) produciendo una disminución de la corriente a -10 mV de $27 \pm 2\%$ ($P < 0.001$). La densidad de corriente se comportó de forma similar. El valor de $V_{1/2}$ de activación y la pendiente no cambian. El valor de $V_{1/2}$ de inactivación se desplaza de -72 a -84 mV ($P < 0.001$) y la pendiente aumenta de 6 a 7 ($P = 0.006$) (Figura 24).

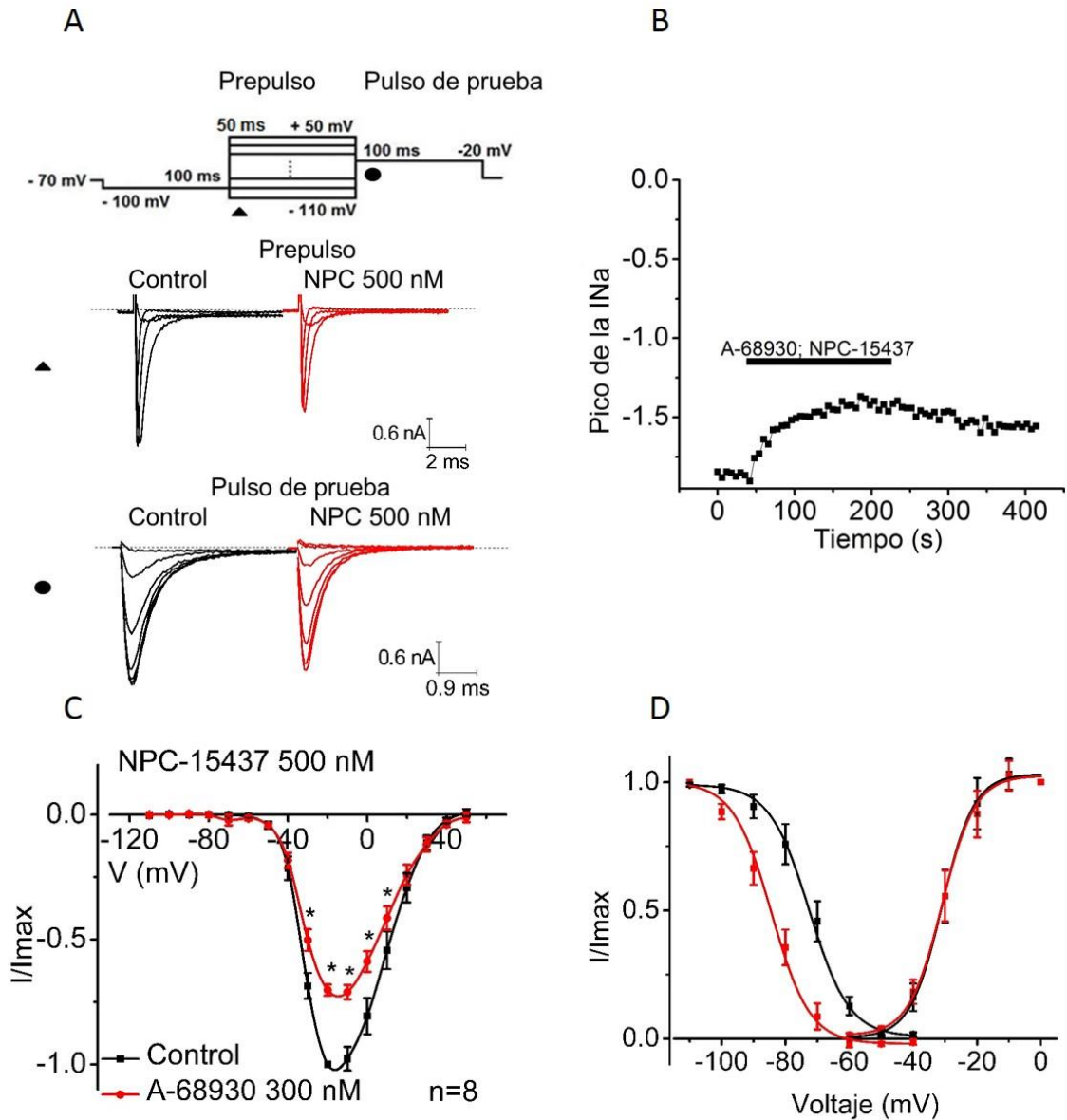


Fig 24. Efecto de la aplicación de A-68930 300 nM sobre la corriente de sodio con NPC-15437 nM en la pipeta de registro. A) Protocolo de fijación de voltaje que se usó para estudiar la INa. Los símbolos en el protocolo y a la izquierda de los trazos indican dónde se realizó la medición y el trazo obtenido respectivamente. Los trazos son registros de la corriente de sodio en el prepulso y en el pulso de prueba. B) Curso temporal de la amplitud al pico de la corriente de sodio medida a -10 mV. La barra negra indica el tiempo de aplicación del fármaco. C) Curva corriente contra voltaje de la corriente de sodio. D) Curvas de activación y de inactivación de la conductancia de sodio. En ambos casos los puntos representan el valor medio \pm ES y la línea continua el ajuste a los datos usando una ecuación Boltzmann.

Fijación de corriente

Efecto de agonistas y antagonistas de receptores a DA sobre la morfología del potencial de acción y sobre la frecuencia de disparo

En condiciones de fijación de corriente encontramos que en ninguno de los parámetros analizados (umbral, amplitud, poshiperpolarización, tasa de despolarización máxima, tasa de repolarización máxima, latencia y duración) se producen cambios estadísticamente significativos tras la aplicación del A-69930 300 nM, quinpirole 1 μ M o de la coaplicación de A-68930 300 nM con quinpirole 1 μ M. En contraste, el agonista D1 dihidrexidina 100 nM ($n = 10$) produjo cambios significativo en la tasa de repolarización máxima de -154 a -140 mV ($P = 0.005$) y en la duración del potencial de acción al 50% que aumentó $8 \pm 2\%$ ($P = 0.005$; Figuras 25A y 25B).

Otro parámetro que medimos de la aplicación de los fármacos es si había un cambio en la frecuencia de disparo ante los pulsos de inyección de corriente durante 100 ms. Todas las células que se registraron con aplicación de A-68940, quinpirole o ambos (coaplicados), presentaron características de disparo de adaptación rápida. En la serie experimental con dihidrexidina, dos células tuvieron descarga repetitiva y en esta condición, con la aplicación del fármaco, hubo una disminución en la frecuencia de disparo de un 44% el cual no es significativo porque tenemos una n de 2 (Figura 25C y 25D).

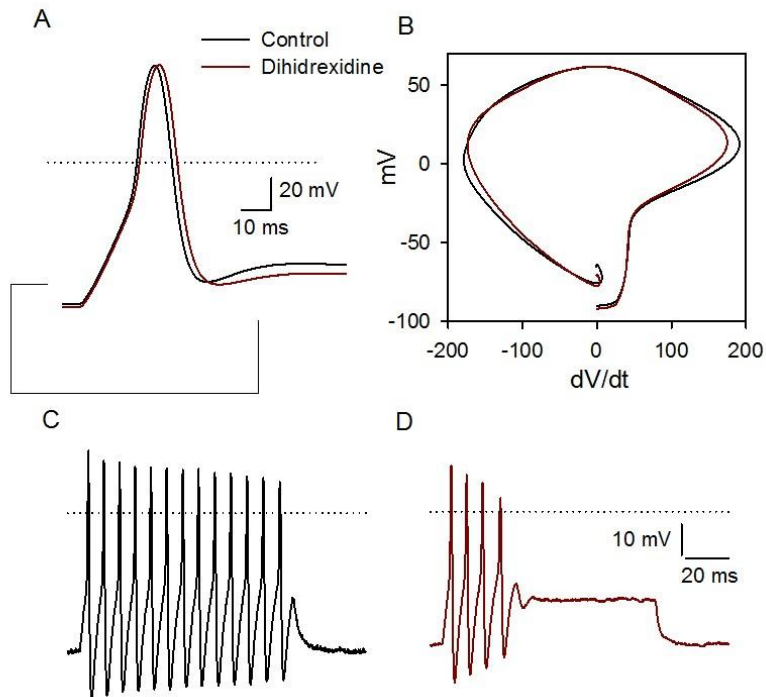


Fig. 25. Registro de potencial de acción con aplicación de dihidroxidina 100 nM. A) Trazo representativo de un potencial de acción en condiciones control y con aplicación del fármaco. B) Diagrama de fases del potencial donde se representa la derivada (mV/ms) respecto al voltaje. C) Célula con descarga repetitiva en condiciones control y D) Efecto de dihidroxidina sobre la frecuencia de disparo.

Cabe mencionar que la mayoría de las neuronas registradas presentan características de disparo en las que hay una adaptación rápida (Figura 26). Los parámetros del potencial de acción bajo condiciones control fueron (n=24): amplitud = 117 ± 5 mV, duración = 1 ± 0.2 ms, latencia = 4 ± 1 ms, umbral = -38 ± 2 mV, tasa de despolarización máxima = 144 ± 11 mV/ms, tasa de repolarización máxima = -150 ± 9 mV/ms.

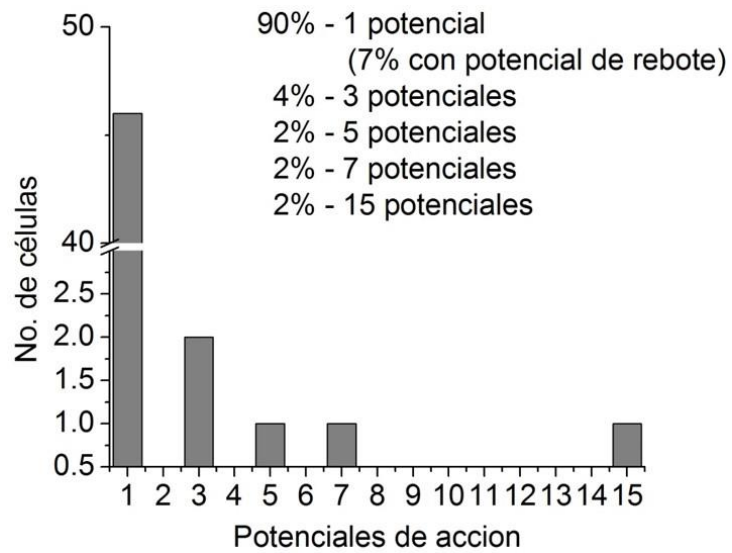


Fig 26. Características de descarga de potenciales de acción de las neuronas aferentes cocleares. El histograma muestra el número de células que descargaron 1, 2, 3 o más potenciales de acción producidos por un pulso depolarizante de 100 ms y 150 pA. Los registros se llevaron a cabo con un potencial de sostenimiento de -80 mV. Se puede observar que la mayoría de las células descargan un solo potencial en respuesta al estímulo.

La figura 27 resume los datos obtenidos en fijación de corriente. Las barras claras representan el control y las barras oscuras representan el fármaco.

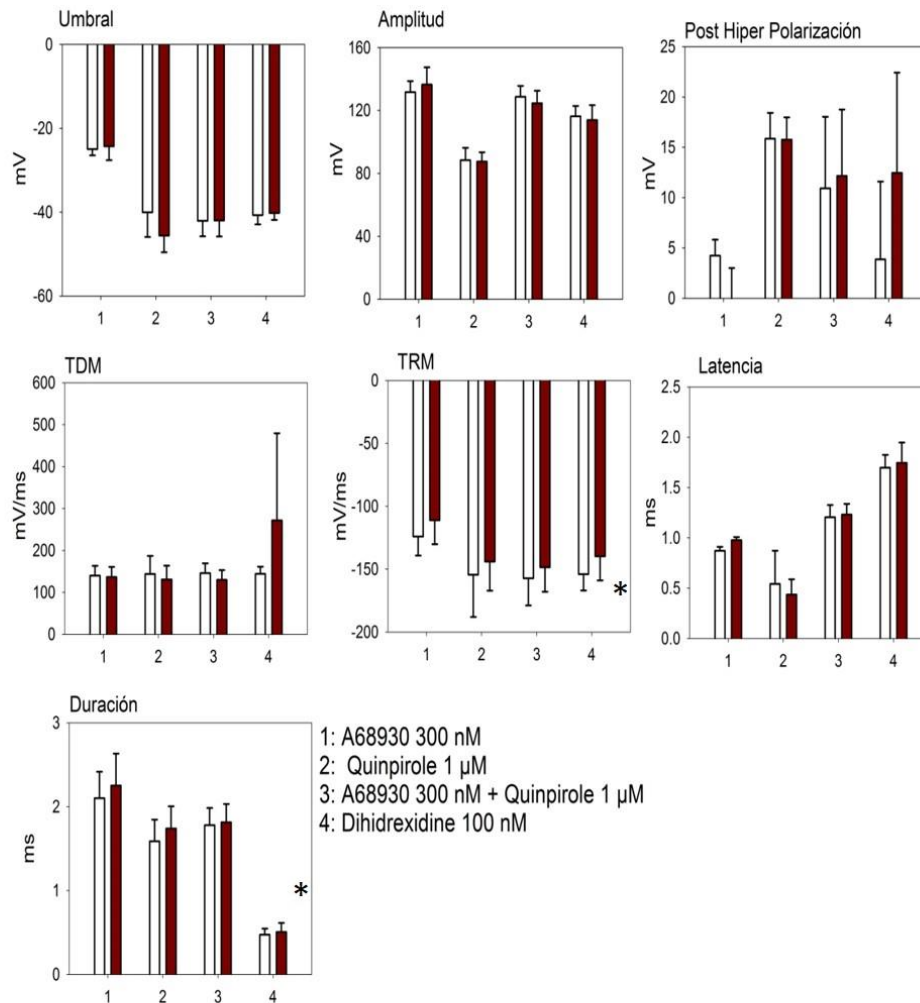


Fig 27. Efecto de dopamina y de los agonistas dopaminérgicos sobre los parámetros del potencial de acción en las neuronas del ganglio espiral de la rata.

Para estudiar la dinámica de la descarga de potenciales de acción usamos pulsos de corriente sinusoidal supraumbral. Dicha estimulación mostró que la aplicación de 100 μ M DA ($n = 7$) produce una modulación de la excitabilidad de las neuronas del ganglio espiral reduciendo significativamente la descarga de espigas inducida por un estímulo a 10 o 20 Hz. ($P = 0.001$; Figura 28).

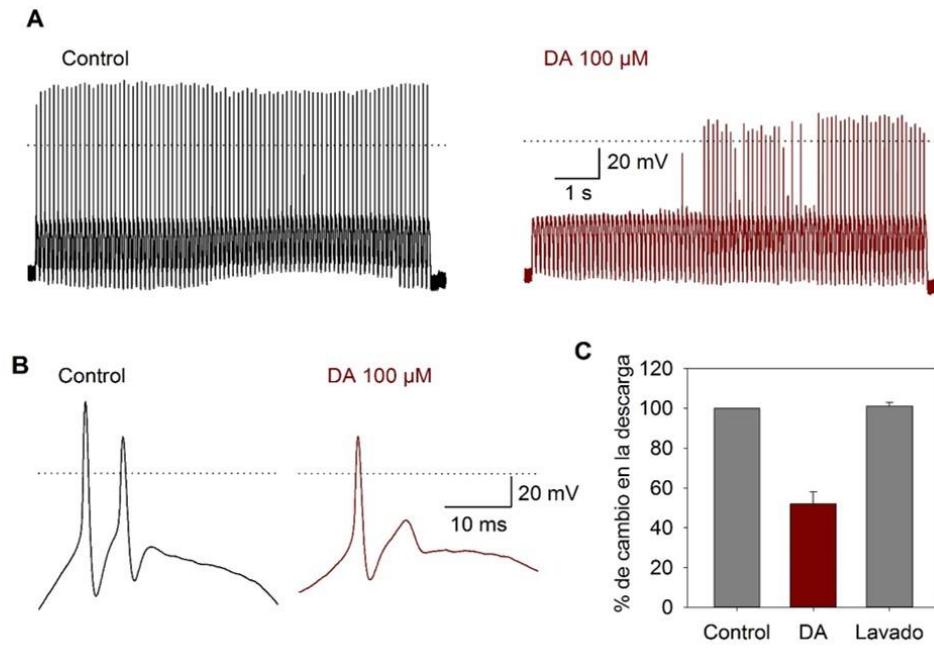


Fig. 28. A) Típica respuesta a inyección de corriente sinusoidal 150 pA, 10 Hz). Antes del estímulo las células se tuvieron a un potencial de -80 mV. B En una célula descargando con enganche de fase 2:1 ante el estímulo sinusoidal, la dopamine redujo la descarga por ciclo a un enganche de fase 1:1. C) La gráfica de barras muestra el porcentaje de cambio en el número de potenciales de acción en condiciones control, con la aplicación de 100 μ M DA y después del lavado.

DISCUSIÓN

En lo relativo al desarrollo de la metodología para el registro de las aferentes cocleares, en la literatura se han reportado varios métodos para obtener una preparación biológica útil para su registro electrofisiológico. Hay desde autores que no usan tratamiento enzimático (Santos-Sacchi, 1993; Chen, 1997; Sun y Salvi, 2001), hasta quienes usan tratamientos con diferentes enzimas incluyendo tripsina, colagenasa, proteasa, en algunos casos seguido por una disociación mecánica (Han *et al.*, 1993; Hisashi *et al.*, en 1995; Moore *et al.*, 1996; Mo y Davis, 1997; Lin, 1997; Ito y Dulon, 2002; Szabó *et al.*, 2002) y hay quienes han hecho el registro en la preparación de la cóclea en rebanadas como (Jagger y Housley 2002). Reid *et al.*, en el 2004, dividen el ganglio en tres porciones (apical, media y basal) y cultivan como explantes en cajas cubiertas con poly-L-lysina. Los autores mencionados utilizan animales de 1-8 días (cobayo, rata, gerbo, ratón) y utilizan su preparación ya sea en agudo o cultivan hasta 48 horas. Nosotros decidimos diseccionar el ganglio de ratas de 8 o 9 días y hacer una disociación utilizando tripsina y colagenasa como tratamiento enzimático y disociamos mecánicamente dejando incubar durante 19 ± 6 horas ($n = 71$; detalles en la metodología, Limón *et al.*, 2005). Este método nos permitió aislar neuronas aferentes del ganglio espiral de la rata, viables, y registrarlas sistemáticamente. Las aferentes tipo I del ganglio espiral están envueltas por mielina, sin embargo, con el curso del tiempo y con el tratamiento enzimático, las células pueden perderla haciéndolas accesibles a la pipeta de patch (Santos-Sacchi, 1993). Por el contrario en algunas preparaciones que hicimos en agudo (no mostrado), está presente la mielina que nos impidió registrar y observar corrientes iónicas.

El ganglio espiral está formado por dos tipos celulares, las neuronas aferentes tipo I y las neuronas aferentes tipo II, siendo las tipo I las que inervan a las células ciliadas internas y las tipo II a las células ciliadas externas. Nuestro interés es por las neuronas aferentes tipo I ya que es sobre las que los antecedentes nos indican que ejerce un efecto la dopamina. En la literatura se describe como un criterio para diferenciar a las aferentes tipo I de las tipo II la mielinización que como ya mencionamos las células cultivadas la pierden, por lo que en nuestro caso no es posible diferenciarlas teniendo en cuenta esa cualidad, sin embargo, hay parámetros que permiten afirmar que las neuronas que registramos corresponden a las tipo I. Primero, las neuronas del ganglio espiral son 95% tipo I y 5% tipo II (Pujol, 1994; Spoendlin, 1972, 1985; Perkins y Morest, 1975; Liberman, 1982; Lin, 1997), por lo que tenemos 19 veces mayor probabilidad de encontrar células tipo I, aunque queda abierta la posibilidad de que unas fueran más resistentes que otras al tratamiento enzimático y al cultivo, modificando entonces esta probabilidad.

Segundo, la capacitancia, que es una medida indirecta del tamaño de la célula. Aunque se describe que las células tipo II son más pequeñas que las tipo I, hay problemas que hacen que la diferenciación basada en el tamaño sea ambigua. Se ha visto que por ejemplo la diferencia interespecie es una complicación asociada a la determinación de las diferencias en el tamaño entre los dos tipos celulares, así como también lo es el efecto de distorsión celular inducido por la fijación con formaldehído en las preparaciones. Adicionalmente, autores han reportado que entre el sexto y el octavo día posnatal los dos tipos celulares son indistinguibles uno de otro y que las diferencias morfológicas solo se desarrollan *a posteriori* (revisado por Rusznák y Szucs, 2009). Sin embargo, en el caso nuestro, la capacitancia obtenida mediante registro electrofisiológico que fue de 9 ± 0.5 pF ($n = 380$), coincide con lo reportado previamente para células tipo I por otros autores (Santos-Sacchi, 1993; Chen, 1997; Jagger y Housley, 2002; Szabó *et al.*, 2002). Las neuronas tipo II tienen una capacitancia menor, aproximadamente de 6 pF (Santos-Sacchi, 1993).

Finalmente, otro parámetro que tomamos en cuenta para considerar que registramos neuronas tipo I es su respuesta a los fármacos dopaminérgicos pues son éstas y no las tipo II las que se asocian con la presencia de marcaje de tirosina hidroxilasa en las eferentes que las contactan así como receptores en las cercanías de la porción basolateral de las células ciliadas internas (Darrow *et al.*, 2006).

Karadaghy *et al.*, en 1997; Inoue *et al.*, en 2006; Maison *et al.*, en 2012 demostraron, mediante inmunohistoquímica y mediante RT-PCR, la presencia de proteínas y genes que codifican para los receptores dopaminérgicos en las neuronas del ganglio espiral (Karadaghy *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 2006; Maison *et al.*, 2012).

En nuestro estudio encontramos que la dopamina así como el A-68930 y el quinpirole, producen una disminución de la corriente de sodio. El SCH-23390, antagonista de los receptores de la familia D1, no bloquea la acción del A-68930 e incluso ejerce un efecto similar al de los agonistas, por lo que posiblemente actúen sobre sitios diferentes. Pensamos que es posible que el SCH-23390 esté bloqueando alguna actividad constitutiva que tenga el receptor como se ha reportado para histamina (Arrang *et al.*, 2007), y también para quimeras del receptor D1/D2 (Kozell y Neve. 1997). Se ha descrito también que hay un grupo de receptores de la familia D1 que son insensibles al antagonismo por SCH-23390 de modo que es posible que éstos estén presentes en las neuronas del ganglio espiral (Kuroiwa *et al.*, 2008). Por su parte el eticlopride (antagonista de los receptores de la familia D2) bloquea el efecto del quinpirole (agonista de los receptores de la familia D2) por lo que determinamos que el efecto es específico sobre esta familia de receptores.

Con estos resultados se determinó que hay funcionalidad de subtipos de receptores de ambas familias.

Los canales de sodio suelen ser blanco de las cascadas de señalización de los receptores acoplados a proteínas G. La fosforilación de algunos sitios del canal de sodio explica la mayoría de las consecuencias descritas de la activación de receptores acoplados a proteínas G sobre la corriente de sodio en las neuronas (Cantrell y Catteral, 2001).

En la mayoría de los tipos celulares en los que hay receptores acoplados a proteínas G, que a su vez estén acoplados a la corriente de sodio, el efecto más común es la reducción de la amplitud de dicha corriente y se ha determinado que esto es debido a una disminución en la disponibilidad de los canales de sodio. Nosotros encontramos una diferencia en el voltaje medio de inactivación con la mayoría de los fármacos probados, que corresponde a un desplazamiento del voltaje medio de inactivación hacia voltajes más negativos. Se ha reportado que la disminución o supresión de la corriente de sodio producida por pulsos despolarizantes es atribuible a dos alteraciones en las propiedades del canal, una es el ajuste negativo en la dependencia de voltaje de la inactivación rápida y otra es la reducción en la disponibilidad de canales (Carr *et al.*, 2003).

En algunos sistemas se ha estudiado la modulación de corrientes de sodio por agonistas dopaminérgicos, por ejemplo, en neuronas hipocámpales y estriatonigrales aisladas en agudo (de rata de 25 días postnatales), la activación de receptores de la familia D1 disminuye la corriente de sodio y ese efecto modulador requiere de la fosforilación directa de la subunidad alfa del canal de sodio por las subunidades catalíticas de PKA en el asa intracelular que conecta los dominios I y II, específicamente la ser-537 (Cantrell *et al.*, 1997). Dicha modulación no se produce cuando se bloquea el anclaje de la PKA (usando péptidos que inhiben tal anclaje) cerca de los canales, lo que demuestra la importancia de la presencia de PKA cerca de los canales. El mismo grupo de trabajo demostró que la activación de PKC también participa en la modulación de la corriente de sodio (Cantrell *et al.*, 1999) y en neuronas estriatonigrales de ratón se ha demostrado que los receptores de la familia D1 están acoplados a tres diferentes cascadas de señalización: Gs/olf/AC/PKA sensibles a SCH-23390, GS/olf/AC/PKA dependiente del receptor a adenosina A2A y Gq/PLC (Kuroiwa *et al.*, 2008).

Se considera entonces que la reducción de la corriente de sodio puede ser a través de la activación de PKC o bien de PKA que fosforilan los canales de sodio. En otros sistemas, en las neuronas espinosas medianas estriatales e interneuronas colinérgicas, la activación de receptores dopaminérgicos D2 lleva a una potente

reducción de la corriente de sodio a través de un mecanismo dependiente de PKC (Maurice *et al.*, 2001). De modo análogo, la activación de receptores dopaminérgicos D1 y PKA en neuronas hipocampales y en neuronas espinosas medianas estriatales reduce el pico de la corriente de sodio sin alterar significativamente la activación del canal (Catterall 1997; Surmeier *et al.*, 1992).

En el sistema auditivo, los trabajos de Niu y Canlon, 2006 (haciendo registro de potencial de acción compuesto y usando herramientas farmacológicas como el H89 (inhibidor de PKA) y forskolina (activador de PKA)) proponen una participación importante de la PKA en el mecanismo de acción de la activación de los receptores D1, sin explorar la participación de la vía de la PKC. En este caso hay que tener en cuenta que se hace el registro en nervio y no en células aisladas así que se tiene no solamente la actividad mediada por receptores dopaminérgicos sino por todos los receptores que se expresan en el sistema coclear.

Para determinar la participación de las vías intracelulares en los efectos de dopamina y agonistas dopaminérgicos sobre las neuronas aferentes cocleares abordamos mediante diferentes estrategias farmacológicas. Cuando adicionamos el GDP- β -S (bloqueador inespecífico de proteínas G) en la solución intracelular y aplicamos el agonista A-68930 encontramos que hay una disminución en el efecto del agonista, por lo que consideramos que el efecto involucra proteínas G. Al aplicar el 8-Br-AMPC de manera extracelular, un análogo de AMPc que activa la PKA, hay una disminución de la corriente entrante que no es significativa, y al aplicar el H89 a través de la pipeta (bloqueador de PKA), el agonista A-68930 sigue ejerciendo un efecto pero es menor que al aplicar el agonista solo. De acuerdo a estos resultados consideramos que hay una participación de PKA en el efecto final ya que el H89 no bloqueó completamente el efecto del fármaco, sino de manera parcial.

Con el NPC-15437 (inhibidor de PKC) en la pipeta de registro encontramos que al aplicar el agonista A-68930 sigue habiendo una disminución de la corriente de sodio lo cual indicaría que la activación de PKC no participa en la instalación del efecto por uso de A-68930. Sin embargo, Kuroiwa *et al.*, en el 2008 demostró que la activación de PKC potencializa los efectos de la activación de PKA, por lo que teniendo en cuenta que tenemos varios subtipos de receptores dopaminérgicos, no podemos descartar que en otras condiciones el efecto final este dado por la interacción de vías intracelulares y que haya una participación parcial de PKC.

En la figura 29 se muestra un esquema que pretende sintetizar los mecanismos que hemos estudiado y las potenciales vías intracelulares del efecto de la activación de receptores a DA en las neuronas del ganglio espiral.

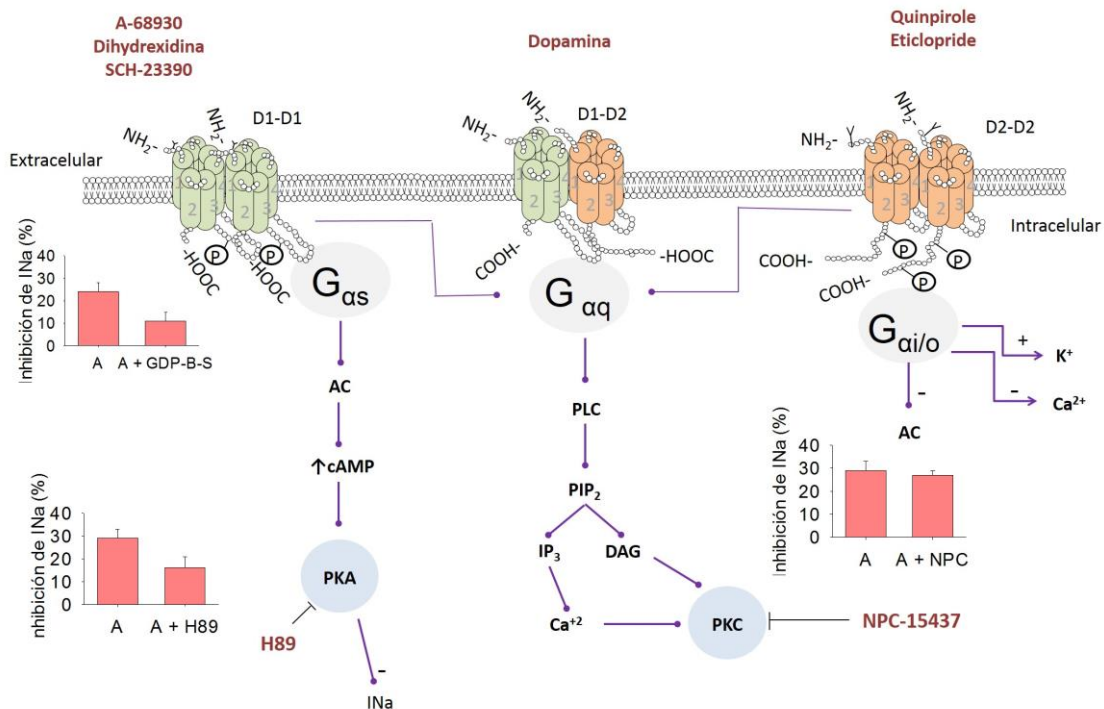


Fig. 29. Vías evaluadas como mecanismo de acción que median los efectos de la activación de receptores dopaminérgicos. Con el bloqueo de las proteínas G con GDP-β-S podemos observar que el efecto del A-68930 es menor. Con el 8-Br-AMPC que es análogo del AMPc no se remedian los efectos del agonista, sin embargo, cuando se pone H89 en la pipeta pudimos concluir que hay una participación parcial de la PKA. Así mismo encontramos una participación parcial de PKC mediante el uso de NPC-15437.

Las vías clásicas que desencadenan la activación de receptores dopaminérgicos son descritas considerando la activación de un solo tipo de receptor o al menos de una familia, lo que implicaría que una célula exprese solo ese subtipo, sin embargo, algunos estudios anatómicos, bioquímicos y fisiológicos han evidenciado la colocalización de receptores de la familia D1 y D2 en las neuronas espinosas medianas (Surmeier *et al.*, 1993). Esto hace necesario considerar seriamente la posibilidad de que en las neuronas del ganglio espiral también haya una coexpresión de tales receptores.

La expresión de dos subtipos de diferentes familias en una misma célula nos da la idea de una modulación compleja. En otros sistemas, por ejemplo, los agonistas D2 pueden reducir la elevación de los niveles de AMPc producidos por la activación de adenilato ciclasa por los agonistas D1 (Stoof y Verheiden, 1986), por otra parte se ha demostrado que en las neuronas neostriatales, los agonistas D1 y D2 pueden actuar sinérgicamente para suprimir la actividad de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa (Surmeier *et al.*, 1992). La colocalización de los receptores D2 y D3 con D1 podría explicar la capacidad de los agonistas D1 y D2 de actuar tanto sinérgica como antagonísticamente. También se ha reportado que la activación de receptores dopaminérgicos D1 puede tanto aumentar como también suprimir la respuesta de las neuronas espinosas dependiendo del estado anterior de la neurona, particularmente,

dependiendo del nivel de despolarización (Hernández-López *et al.*, 1997). La aplicación de un agonista D1 a una preparación de neuronas espinosas medianas en rebanadas que presentaba descarga evocada inhibe dicha descarga a un potencial de sostenimiento más negativo (-80mV aproximadamente) y a potenciales más despolarizantes (-55 mV) el agonista D1 aumenta la actividad evocada. Esta dependencia del estado surge de la modulación coordinada de canales iónicos en esos estados (Flores-Hernández *et al.*, 2000; Hernández-López *et al.*, 1997; Pacheco-Cano *et al.*, 1996; Surmeier *et al.*, 1992, 1995). Así, la activación del receptor a dopamina D1 puede tanto inhibir como aumentar la actividad evocada, dependiendo del nivel de despolarización de la membrana.

En resultados previos obtenidos durante la realización de la tesis de maestría encontramos que en algunas células la aplicación de dopamina o quinpirole puede ejercer efecto de aumento o bien de disminución de la corriente saliente. De manera general los cambios mixtos que observamos en las corrientes pueden deberse a la expresión de un tipo de receptores ya sea de la familia D1 o de la familia D2, o bien, es posible pensar que en una célula se coexpresan los receptores y que la proporción en la que los expresan difiere entre las neuronas, de tal forma que algunas expresen mayormente los D1 y otras los D2, lo cual determina las diferencias en los registros entre una y otra neurona aun aplicando las mismas concentraciones del fármaco. Surmeier *et al.*, en 1992 aplicando agonista D2, quinpirole, 55% de las neuronas disminuyeron la amplitud de la corriente y el 20% la aumento, esto es, observan también cambios en ambos sentidos y se considera que esto sugiere que las neuronas estriatonigrales coexpresan dos receptores de la familia D2 aparte de los receptores de la familia D1 (Surmeier *et al.*, 1992).

De este modo nuestros resultados nos llevan a inclinarnos por la idea de que una sola célula puede expresar de modo funcional ambos subtipos de receptores, es decir, hay coexpresión de receptores tanto de la familia D1 como D2.

Hay que tener en cuenta que en algunos sistemas la activación de ambas familias de receptores es esencial para tener ciertos efectos a nivel conductual, bioquímico y electrofisiológico. En neuronas de núcleo acumbens, por ejemplo, dicha activación puede inhibir de manera sinérgica la actividad neuronal.

Ya que la activación de ambos subtipos de receptores ejerce el mismo efecto sobre la corriente de sodio en las neuronas aferentes cocleares, es posible que en nuestro modelo, los receptores dopaminérgicos se activen y actúen de modo complementario para ejercer un efecto mediante la activación de PKA, de tal forma que haya una fosforilación de canales de sodio mediada por tal proteína cinasa. Estudios previos de Li *et al.*, en 1993, en canales de Na⁺ cerebrales expresados en células

transfectadas mostraron que PKA y PKC actúan de manera convergente para regular canales de Na⁺ y causar una reducción en el pico de la corriente.

La coexpresión de representantes de ambas familias, como homómeros, es entonces una primera posibilidad que nos planteamos, pero si bien se sabe que los receptores dopaminérgicos existen como receptores homómeros también se ha demostrado por coimmunoprecipitación que puede haber interacción física entre D1R y D2R formando así heterómeros de dopamina. Esos heterómeros a menudo exhiben propiedades y vías de señalización distintas a esas que desencadenan sus receptores constitutivos (Lee *et al.*, 2004; Rashid *et al.*, 2007; Hasbi *et al.*, 2010; So *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2010). Tradicionalmente se ha descrito que, en neuronas espinosas medianas del estriado, los receptores D1 y D2 están segregados en poblaciones discretas, pero hay cada vez más evidencias funcionales y anatómicas de que pueden estar coexpresados en una subpoblación de dichas neuronas (Perreault *et al.*, 2011). Un nuevo complejo receptor en el estriado, el heterómero receptor D1-D2 también sugiere que las neuronas que coexpresan los receptores, pueden tener características funcionales únicas distintas a las de las neuronas que exhiben receptores a dopamina de manera segregada, lo que sería una tercera población neuronal con relevancia fisiológica (Perreault *et al.*, 2011).

Por ejemplo la vía PLC-PI es activada por algunos agonistas de receptores D1 en tejido de cerebro, pero si las células expresan solamente D1, no se activa la vía. Esto sugiere que los agonistas D1 que estimulan esta vía lo hacen a través de actividad agonística sobre los receptores heterómeros D1-D2 (Perreault *et al.*, 2011). Es posible que en las neuronas del ganglio espiral se expresen heterómeros de receptores dopaminérgicos lo cual se puede confirmar por FRET (fluorescence resonance energy transfer) que es una herramienta comúnmente usada para identificación de receptores oligómeros. Es posible que la expresión de heterómeros explique el hecho de que el antagonista de la familia D1 tenga un efecto inespecífico, es decir, que no actúe de la misma manera sobre el receptor D1 que sobre el heterómero D1-D2.

Aun cuando consideramos que la activación de receptores de la familia D1 y de la familia D2 conlleva a la participación de vías mediadas por proteínas G, los resultados no nos permiten descartar la posibilidad de que participen otros mecanismos. Se sabe que la activación de receptores dopaminérgicos puede regular la función de receptores NMDA a través del acople a proteínas G y activación de PKA/PKC, es decir involucrando uno o más segundos mensajeros intracelulares. Sin embargo, se sabe que aparte de hacerlo por vías de señalización acopladas a proteínas G, puede hacerlo a través de una interacción proteína-proteína entre los sitios carboxilo terminal intracelular del receptor D1 (D1-t2, D1-t3) con subunidades del receptor NMDA (NR1-1a, NR2A) (Lee

et al., 2002). También hay interacciones proteína-proteína entre receptores D5 y receptores GABA_A (Inoue *et al.*, 2006). Dado que las neuronas del ganglio espiral son susceptibles de responder a GABA y a Glutamato, cabe la posibilidad de que se presenten dichas interacciones con los receptores dopaminérgicos.

En condiciones de fijación de corriente encontramos que la mayoría de las células adaptan rápidamente y descargan un único potencial de acción. Estos resultados coinciden con lo descrito por Mo y Davis (1997), quienes demostraron que los patrones de descarga en las neuronas varían desde las que adaptan rápidamente hasta neuronas con descarga sostenida. La posición de las neuronas del ganglio espiral a lo largo del eje de la cóclea tiene un efecto significativo sobre la conducta de disparo. Las neuronas situadas cerca de la base (que codifican altas frecuencias) tienen corta latencia (14 ms) y rápida adaptación, por lo que solo disparan uno o de uno a tres potenciales de acción y luego dejan de hacerlo. Con los datos que tenemos no encontramos una correlación entre el número de potenciales de acción y su localización dentro del ganglio. En la figura 45 mostramos los resultados obtenidos haciendo un análisis de la frecuencia de potenciales de acción de los registros control (Figura 31A) en comparación con los resultados obtenidos por Mo y Davis en 1997 (Figura 31B) para este mismo tipo celular y como los resultados de Needham *et al.*, 2012 (Figura 31C). También coincide con lo reportado por Adamson *et al.*, 2002 para neuronas basales y apicales, quien reportó adicionalmente la modulación de dichas propiedades de frecuencia de disparo con la aplicación de BDNF y de NT-3, para las porciones apical y basal (Figura 31D y 31E respectivamente).

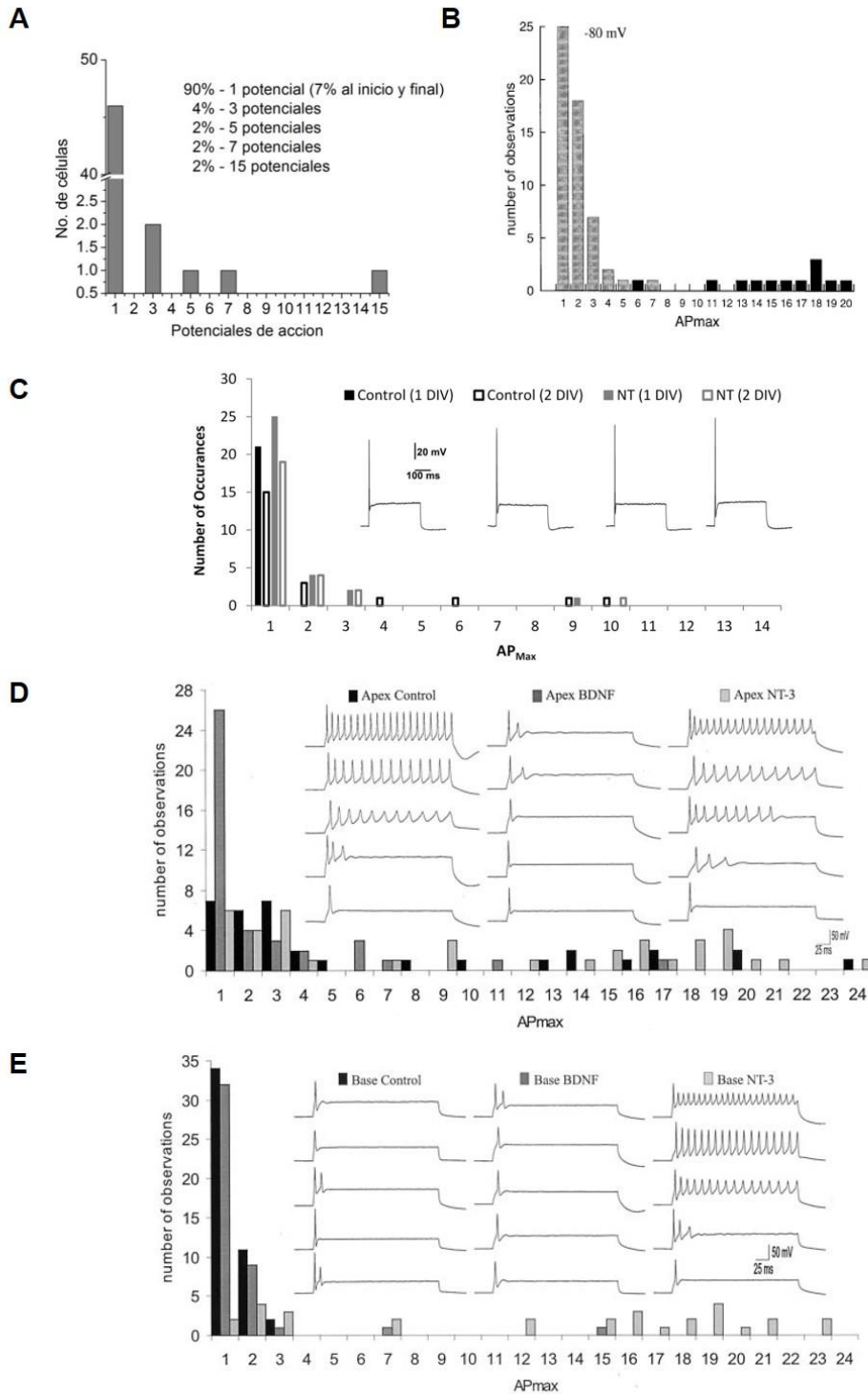


Fig. 30. Propiedades de disparo de las neuronas. A) datos obtenidos a partir de nuestros registros donde observamos una predominancia de células con adaptación rápida. B) Resultados de Mo y Davis donde encuentran también que hay predominancia de células con adaptación rápida. Ambos gráficos representan el número de potenciales de acción contra el número de células. C) D) y E) muestran la caracterización la frecuencia de disparo de neuronas aferentes cocleares hecha por Needham *et al.*, 2012 (a uno y dos días in vitro) y Adamson *et al.*, 2002 y su modulación por BDNF y NT.

De manera general encontramos que los agonistas dopaminérgicos de las familias de receptores no ejercen efectos significativos sobre los parámetros del potencial de acción ni sobre la frecuencia lo que sugiere que si bien hay una reducción de la corriente de sodio, esta no es suficiente como para que no se alcance el umbral y se genere el potencial de acción. Sin embargo, con la dihidrexidina hay un aumento en la duración del potencial de acción sin cambios en la amplitud. Ese cambio en la duración, se refleja en un cambio en la frecuencia de disparo en las células que presentan descarga durante todo el pulso. Aplicando la DA a células estimuladas con inyección de corriente sinusoidal, encontramos una acción inhibitoria de la DA sobre la descarga de potenciales de acción. Juntos, los resultados pueden ser asociados con la noción de que la dopamina liberada desde las eferentes cocleares deprime la actividad evocada en las neuronas aferentes en condiciones de sobreestimulación acústica o de isquemia que lleva a daño excitotóxico por el exceso en la liberación de glutamato (dÁldin *et al.*, 1995; Gil-Loyzaga *et al.*, 1994), así como con que la aplicación de DA ejerce poco efecto sobre la tasa de disparo aferente espontánea, pero disminuye el disparo inducido por NMDA o AMPA. Lo mismo ocurre luego de la coadministración de agonistas D1 y D2 (Oestreicher *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES

1. La disminución de la amplitud de la I_{Na} en las neuronas aferentes cocleares (NAC) por dopamina muestra una dependencia sigmoidea de la concentración. Dicho efecto es debido a la reducción en la disponibilidad de canales de sodio o a una disminución en su probabilidad de apertura, pues la DA desplaza el voltaje medio de inactivación hacia voltajes más negativos.
2. La acción de los agonistas de la familia D1 y de la familia D2 (A-68930 y quinpirole respectivamente) indican que ambas familias se expresan en las NAC.
3. Los receptores de la familia D1, están acoplados a proteínas Gs. Nuestros resultados apuntan a que esta vía no es el único mecanismo por el cual la activación D1 ejerce su efecto pues al bloquear la PKA con H89, aún se observa un efecto y el 8-Br-AMPC que es un análogo del AMPc no imita los efectos del agonista.
4. Por otra parte, es posible que estos receptores estén acoplados a la Gq, por lo que usamos el NPC-15437, que es un bloqueador de PKC y aún seguimos observando el efecto de activación del receptor D1, por lo que consideramos que esta vía no participa de manera fundamental en las NAC.
5. El SCH-23390 (antagonista de la familia D1) ejerce un efecto paradójico en las NAC pues reduce la corriente de sodio de forma similar al agonista y desplaza el voltaje medio de inactivación hacia potenciales más negativos. Por el efecto que ejerce el fármaco consideramos que los receptores de la familia D1 que se expresan en estas neuronas son insensibles al SCH-23390, semejante al grupo de neuronas que se ha descrito en el estriado.
6. Si bien hay un cambio significativo en la amplitud de la I_{Na} , no encontramos cambios en la morfología del potencial de acción con los fármacos estudiados. Sea como sea si hay cambios significativos en el patrón de descarga de las NAC.
7. A través de la estimulación sinusoidal los resultados soportan la noción de que la dopamina liberada de las eferentes olivococleares laterales deprime la descarga de las neuronas aferentes constituyendo un mecanismo de protección en condiciones de daño excitotóxico por exceso de liberación de glutamato.
8. Pensamos que es posible que una de las funciones de que se liberen varios neurotransmisores de las terminales eferentes, así como de que haya expresión de receptores para todos ellos en las aferentes, es que actúen de modo sinérgico para establecer los efectos finales de neuroprotección.

REFERENCIAS

Adamson CL, Reid MA, Davis RL. Opposite actions of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on firing features and ion channel composition of murine spiral ganglion neurons. *J Neurosci*. 2002; 22:1385-96.

Altschuler RA, Hoffman DW, Wenthold RJ. Neurotransmitters of the cochlea and cochlear nucleus: immunocytochemical evidence. *Am J Otolaryngol*. 1986; 7:100-6.

Arrang JM, Morisset S, Gbahou F. Constitutive activity of the histamine H3 receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 2007; 28:350-7.

Bahena-Trujillo R, Flores G, Arias-Montaña JA. Dopamina: síntesis liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Rev Biomed*. 2000; 11:39-60.

Bakondi G, Pór A, Kovács I, Szucs G, Rusznák Z. Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated, cation non-selective channel subunit expression pattern of guinea-pig spiral ganglion cells. *Neuroscience*. 2009; 158:1469-77.

Cabello N, Gandía J, Bertarelli DC, Watanabe M, Lluís C, Franco R, Ferré S, Luján R, Ciruela F. Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. *J Neurochem*. 2009; 109:1497-507.

Cantrell AR, Smith RD, Goldin AL, Scheuer T, Catterall WA. Dopaminergic modulation of sodium current in hippocampal neurons via cAMP-dependent phosphorylation of specific sites in the sodium channel α subunit. *J Neurosci* 1997; 17:7330 –7338.

Cantrell AR, Scheuer T, Catterall WA. Voltage-dependent neuromodulation of Na⁺ channels by D1-like dopamine receptors in rat hippocampal neurons. *J Neurosci*. 1999; 19:5301-10.

Cantrell AR, Catterall WA. Neuromodulation of Na⁺ channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2:397-407.

Carr DB, Day M, Cantrell AR, Held J, Scheuer T, Surmeier DJ. Transmitter modulation of slow, activity-dependent alterations in sodium channel availability endows neurons with a novel form of cellular plasticity. *Neuron*. 2003; 39:793-806.

Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferré S, Casadó V, Agnati L, Cortés A, Mallol J, Fuxe K, Canela EI, Lluís C, Franco R. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods*. 2008; 5:727-33.

Catterall WA. Modulation of sodium and calcium channels by protein phosphorylation and G proteins. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 1997; 31:159-81.

Chen C. Hyperpolarization-activated current (I_h) in primary auditory neurons. *Hear Res.* 1997; 110:179-90.

D'Aldin C, Puel JL, Leducq R, Crambes O, Eybalin M, Pujol R. Effects of a dopaminergic agonist in the guinea pig cochlea. *Hear Res.* 1995; 90:202-11.

d'Aldin CG, Ruel J, Assie R, Pujol R, Puel JL. Implication of NMDA type glutamate receptors in neural regeneration and neof ormation of synapses after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea. *Int J Dev Neurosci.* 1997; 15:619-29.

Dallos P, Popper AN, Fay RR. *The cochlea.* Ed. Springer. 1996.

Darrow KN, Simons EJ, Dodds L, Liberman MC. Dopaminergic innervations of the mouse inner ear: evidence for a separate cytochemical group of cochlear efferent fibers. *J Comp Neurol.* 2006; 498:403-14.

De la Rosa JV. Modulación de la aferencia coclear por péptidos opioides. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas, Instituto de Fisiología BUAP, 2009.

Doleviczényi Z, Halmos G, Répássy G, Vizi ES, Zelles T, Lendvai B. Cochlear dopamine release is modulated by group II metabotropic glutamate receptors via GABAergic neurotransmission. *Neurosci Lett.* 2005; 385:93-98.

Doleviczényi Z, Vizi ES, Gacsályi I, Pallagi K, Volk B, Hársing LG Jr, Halmos G, Lendvai B, Zelles T. 5-HT_{6/7} receptor antagonists facilitate dopamine release in the cochlea via a GABAergic disinhibitory mechanism. *Neurochem Res.* 2008; 33:2364-72.

Drescher MJ, Drescher DG, Khan KM, Hatfield JS, Ramakrishnan NA, Abu-Hamdan MD, Lemonnier LA. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1-R) are positioned to modulate afferent signaling in the cochlea. *Neuroscience.* 2006; 142:139-64.

Eckrich T, Varakina K, Johnson SL, Franz C, Singer W, Kuhn S, Knipper M, Holley MC, Marcotti W. Development and function of the voltage-gated sodium current in immature mammalian cochlear inner hair cells. *PLoS One.* 2012; 7:e45732.

Eybalin M. Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol. Rev.* 1993; 73:309-73.

Ferrada C, Moreno E, Casadó V, Bongers G, Cortés A, Mallol J, Canela EI, Leurs R, Ferré S, Lluís C, Franco R. Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. *Br J Pharmacol.* 2009;157(1):64-75.

Ferré S, Quiroz C, Woods AS, Cunha R, Popoli P, Ciruela F, Lluís C, Franco R, Azdad K, Schiffmann SN. An update on adenosine A_{2A}-dopamine D₂ receptor

interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des.* 2008;14(15):1468-74.

Fex J, Altschuler RA. Enkephalin-like immunoreactivity of olivocochlear nerve fibers in cochlea of guinea pig and cat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78:1255-9.

Fiorentini C, Busi C, Gorruso E, Gotti C, Spano P, Missale C. Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol Pharmacol.* 2008; 74:59-69.

Fitzakerley J. <http://www.d.umn.edu/~jfitzake/Lectures/UndergradPharmacy/SensoryPhysiology/Audition/Efferents.html>. 1997

Flores-Hernandez J, Hernandez S, Snyder GL, Yan Z, Fienberg AA, Moss SJ, Greengard P, Surmeier DJ. D(1) dopamine receptor activation reduces GABA(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *J Neurophysiol.* 2000; 83:2996-3004.

Franco R, Lluís C, Canela EI, Mallol J, Agnati L, Casadó V, Ciruela F, Ferré S, Fuxe K. Receptor-receptor interactions involving adenosine A1 or dopamine D1 receptors and accessory proteins. *J Neural Transm.* 2007; 114(1):93-104.

Fryatt AG, Vial C, Mulheran M, Gunthorpe MJ, Grubb BD. Voltage-gated sodium channel expression in rat spiral ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2009; 42:399-407.

Fryatt AG, Mulheran M, Egerton J, Gunthorpe MJ, Grubb BD. Ototrauma induces sodium channel plasticity in auditory afferent neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2011; 48:51-61.

Gáborján A, Vizi ES. Characterization of voltage dependent calcium channels on the lateral olivocochlear efferent fibers of the guinea pig. *Neurosci Lett.* 1999; 269:49-51.

Gáborján A, Lendvai B, Vizi ES. Neurochemical evidence of dopamine release by lateral olivocochlear efferents and its presynaptic modulation in guinea-pig cochlea. *Neuroscience* 1999; 90:131-8.

Garrett AR, Robertson D, Sellick PM, Mulders WH. The Actions of Dopamine Receptors in the Guinea Pig Cochlea. *Audiol Neurootol.* 2010 Jul 29;16(3):145-157.

Gil-Loyzaga P, Parés-Herbute N. HPLC detection of dopamine and noradrenaline in the cochlea of adult and developing rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 1989; 48:157-60.

Gil-Loyzaga P, Vicente-Torres MA, Fernández-Mateos P, Arce A, Esquifino A. Piribedil affects dopamine turnover in cochleas stimulated by white noise. *Hear Res.* 1994; 79:178-82.

Gil-Loyzaga PE. Neurotransmitters of the olivocochlear lateral efferent system: with an emphasis on dopamine. *Acta Otolaryngol.* 1995; 115:222-6.

Gil-Loyzaga P, Bartolomé V, Vicente-Torres A, Carricondo F. Serotonergic innervation of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol.* 2000; 120:128-32.

Halmos G, Gáborján A, Lendvai B, Répássy G, Szabó LZ, Vizi ES. Veratridine-evoked release of dopamine from guinea pig isolated cochlea. *Hear Res.* 2000; 144:89-96.

Han DY, Yamashita T, Harada N, Kumazawa T. Calcium mobilization in isolated cochlear spiral ganglion cells of the guinea pig. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1993; 506:26-9.

Han Y, Hong L, Zhong C, Chen Y, Wang Y, Mao X, Zhao D, Qiu J. Identification of new altered genes in rat cochleae with noise-induced hearing loss. *Gene.* 2012; 499:318-22.

Hasbi A, O'Dowd BF, George SR. Heteromerization of dopamine D2 receptors with dopamine D1 or D5 receptors generates intracellular calcium signaling by different mechanisms. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10:93-9.

Hernández-López S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E. D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *J Neurosci.* 1997; 17:3334-42.

Hisashi K, Nakagawa T, Yasuda T, Kimitsuki T, Komune S, Komiyama S. Voltage-dependent Ca²⁺ channels in the spiral ganglion cells of guinea pig cochlea. *Hear Res.* 1995; 91:196-201.

Hoffman DW, Zamir N, Rubio JA, Altschuler RA, Fex J. Proenkephalin and prodynorphin related neuropeptides in the cochlea. *Hear Res.* 1985; 17:47-50.

Hossain WA, Antic SD, Yang Y, Rasband MN, Morest DK. Where is the spike generator of the cochlear nerve? Voltage-gated sodium channels in the mouse cochlea. *J Neurosci.* 2005 25:6857-68.

Inoue T, Matsubara A, Maruya S, Yamamoto Y, Namba A, Sasaki A, Shinkawa H. Localization of dopamine receptor subtypes in the rat spiral ganglion. *Neurosci Lett.* 2006; 399: 226-229.

Ito K, Rome C, Bouleau Y, Dulon D. Substance P mobilizes intracellular calcium and activates a nonselective cation conductance in rat spiral ganglion neurons. *Eur J Neurosci.* 2002; 16:2095-102.

Ito K, Dulon D. Nonselective cation conductance activated by muscarinic and purinergic receptors in rat spiral ganglion neurons. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282:C1121-35.

Jagger DJ, Housley GD. A-type potassium currents dominate repolarization of neonatal rat primary auditory neurons in situ. *Neuroscience*. 2002; 109:169-82.

Jongkamonwiwat N, Phansuwan-Pujito P, Sarapoke P, Chetsawang B, Casalotti SO, Forge A, Dodson H, Govitrapong P. The presence of opioid receptors in rat inner ear. *Hear Res*. 2003; 181:85-93.

Jongkamonwiwat N, Phansuwan-Pujito P, Casalotti SO, Forge A, Dodson H, Govitrapong P. The existence of opioid receptors in the cochlea of guinea pigs. *Eur J Neurosci*. 2006; 23:2701-11.

Kandel *et al.* Principles of neural science. 4ta edición. Editorial Mc Graw Hill. 1991.

Karadaghy AA, Lasak JM, Chomchai JS, Khan KM, Drescher MJ, Drescher DG. Quantitative analysis of dopamine receptor messages in the mouse cochlea. *Brain Res*. 1997; 44:151-56.

Kebabian, J.W. and Calne, D.B. Multiple receptors for dopamine. *Nature*. 1979; 277:93-96.

Khan KM, Drescher MJ, Hatfield JS, Khan AM, Drescher DG. Muscarinic receptor subtypes are differentially distributed in the rat cochlea. *Neuroscience*. 2002; 111:291-302.

Kho ST1, Lopez IA, Evans C, Ishiyama A, Ishiyama G. Immunolocalization of orphanin FQ in rat cochlea. *Brain Res*. 2006; 1113:146-52.

Kozell LB, Neve KA. Constitutive activity of a chimeric D2/D1 dopamine receptor. *Mol Pharmacol*. 1997; 52:1137-49.

Kuba H, Oichi Y, Ohmori H. Presynaptic activity regulates Na(+) channel distribution at the axon initial segment. *Nature*. 2010; 465:1075-8.

Kuroiwa M, Bateup HS, Shuto T, Higashi H, Tanaka M, Nishi A. Regulation of DARPP-32 phosphorylation by three distinct dopamine D1-like receptor signaling pathways in the neostriatum. *J Neurochem*. 2008; 107:1014-26.

Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chéry N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM, Liu F. Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell*. 2002; 111:219-30.

Lee FJ, Liu F. Direct interactions between NMDA and D1 receptors: a tale of tails. *Biochem Soc Trans*. 2004; 32:1032-6.

Li M, West JW, Numann R, Murphy BJ, Scheuer T, Catterall WA. Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science*. 1993; 261:1439-42.

Liberman MC. Single-neuron labeling in the cat auditory nerve. *Science*. 1982; 216:1239-41.

Liberman MC, Dodds LW, Pierce S. Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol*. 1990; 301:443-60.

Limón A, Pérez C, Vega R, Soto E. Ca²⁺-activated K⁺-current density is correlated with soma size in rat vestibular-afferent neurons in culture. *J Neurophysiol*. 2005;94(6):3751-61.

Lin X. Action potentials and underlying voltage-dependent currents studied in cultured spiral ganglion neurons of the postnatal gerbil. *Hear Res*. 1997; 108:157-79.

Lin X, Chen S, Chen P. Activation of metabotropic GABAB receptors inhibited glutamate responses in spiral ganglion neurons of mice. *Neuroreport*. 2000; 11(5):957-61.

Liu S. Comparison of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in cochleas of chinchilla and guinea pig. *Chin Med J*. 1997;110:279-81.

Long L, Li G, Chen W, Liu J, Tang Y. Distribution of serotonin immunoreactivity in the spiral ganglion neurons of mouse cochlea. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2008; 72:1003-6.

Maison SF, Adams JC, Liberman MC. Olivocochlear innervation in the mouse: immunocytochemical maps, crossed versus uncrossed contributions, and transmitter colocalization. *J Comp Neurol*. 2003; 455:406-16.

Maison SF, Liu XP, Argence M, Grandy DK, Eatock RA, Liberman CM. Dopaminergic signaling in cochlear function: insight from mice with targeted deletion of receptor subtypes. *ARO abstracts 2009*; 32: 317.

Maison SF, Liu XP, Eatock RA, Sibley DR, Grandy DK, Liberman MC. Dopaminergic signaling in the cochlea: receptor expression patterns and deletion phenotypes. *J Neurosci*. 2012. 32:344-55.

Maurice N, Tkatch T, Meisler M, Sprunger LK, Surmeier DJ. D1/D5 dopamine receptor activation differentially modulates rapidly inactivating and persistent sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurosci*. 2001; 21:2268-77.

Meyer AC, Frank T, Khimich D, Hoch G, Riedel D, Chapochnikov NM, Yarin YM, Harke B, Hell SW, Egner A, Moser T. Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci*. 2009; 12:444-53.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Garon MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998; 78:189-225.

Missale C, Fiorentini C, Collo G, Spano P. The neurobiology of dopamine receptors: evolution from the dual concept to heterodimer complexes. *J Recept Signal Transduct Res.* 2010; 30:347-54.

Mo ZL, Davis RL. Heterogeneous voltage dependence of inward rectifier currents in spiral ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 1997; 78: 3019–27.

Moore EJ, Hall DB, Narahashi T. Sodium and potassium currents of type I spiral ganglion cells from rat. *Acta Otolaryngol.* 1996; 116: 552-60.

Morley BJ, Li HS, Hiel H, Drescher DG, Elgoyhen AB. Identification of the subunits of the nicotinic cholinergic receptors in the rat cochlea using RT-PCR and in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998; 53:78-87.

Mulders M, Robertson D. Dopaminergic olivocochlear neurons originate in the high frequency region of the lateral superior olive of guinea pigs. *Hear Res.* 2004; 187:122-30.

Needham K, Nayagam BA, Minter RL, O'Leary SJ. Combined application of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 and its impact on spiral ganglion neuron firing properties and hyperpolarization-activated currents. *Hear Res.* 2012; 291:1-14.

Niu X, Canlon B. Activation of tyrosine hydroxylase in the lateral efferent terminals by sound conditioning. *Hear Res.* 2002; 174:124-32.

Niu X, Bogdanovic N, Canon R. The distribution and the modulation of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the lateral olivocochlear system of the guinea-pig. *Neuroscience* 2004; 125:725-33.

Niu X, Canlon B. The signal transduction pathway for the dopamine D1 receptor in the guinea-pig cochlea. *Neuroscience.* 2006; 137:981-90.

Oestreicher E, Arnold W, Ehrenberger K, Felix D. Dopamine regulates the glutamatergic inner hair cell activity in guinea pigs. *Hear Res.* 1997; 107:46-52.

Pacheco-Cano MT, Bargas J, Hernández-López S, Tapia D, Galarraga E. Inhibitory action of dopamine involves a subthreshold Cs(+)-sensitive conductance in neostriatal neurons. *Exp Brain Res.* 1996; 110:205-11.

Pedemonte M, Naris PM. Las células ciliadas de la cóclea: un ejemplo de transducción bidireccional. *Actas de Fisiología.* 1999; 5: 79-107.

Pei L, Lee FJ, Moszczynska A, Vukusic B, Liu F. Regulation of dopamine D1 receptor function by physical interaction with the NMDA receptors. *J Neurosci*. 2004; 24:1149-58.

Peng BG, Ahmad S, Chen S, Chen P, Price MP, Lin X. Acid-sensing ion channel 2 contributes a major component to acid-evoked excitatory responses in spiral ganglion neurons and plays a role in noise susceptibility of mice. *J Neurosci*. 2004; 24(45):10167-75.

Perkins RE, Morest DK. A study of cochlear innervation patterns in cats and rats with the Golgi method and Nomarski Optics. *J Comp Neurol*. 1975; 163:129-58.

Perreault ML, Hasbi A, O'Dowd BF, George SR. The dopamine d1-d2 receptor heteromer in striatal medium spiny neurons: evidence for a third distinct neuronal pathway in Basal Ganglia. *Front Neuroanat*. 2011; 5:31.

Popa R, Anniko M, Arnold W, Oestreicher E. Alpha and beta subunits of acetylcholine receptors in the human inner ear. *Acta Otolaryngol*. 2000; 120:484-9.

Port 2007. http://www.cs.indiana.edu/~port/teach/641/audition_for_linguists_Sept1.html

Pujol R. Morphology, synaptology and electrophysiology of the developing cochlea. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1985; 421:5-9.

Pujol R, Puel JL, Gervais d'Aldin C, Eybalin M. Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea. *Acta Otolaryngol*. 1993; 113:330-4.

Pujol R. Lateral and medial efferents: a double neurochemical mechanism to protect and regulate inner and outer hair cell function in the cochlea. *Br J Audiol*. 1994; 28:185-91

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, *et al.*, editors. *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.

Raphael Y, Altschuler RA. Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull*. 2003; 60:397-422.

Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF, George SR. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:654-9.

Rashid AJ, O'Dowd BF, Verma V, George SR. Neuronal Gq/11-coupled dopamine receptors: an uncharted role for dopamine. *Trends Pharmacol Sci*. 2007; 28:551-5.

Reid MA, Flores-Otero J, Davis RL. Firing patterns of type II spiral ganglion neurons in vitro. *J Neurosci.* 2004; 24:733-42.

Robles J, Ruggero MA. Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiol Rev.* 2001; 81:1305-52.

Ruel, J., Nouvian, R., Gervais d'Aldin, C., Pujol, R., Eybalin, M., Puel, J.-L. Dopamine inhibition of auditory nerve activity in the adult mammalian cochlea. *Eur. J. Neurosci.* 2001; 14:977–86.

Rusznák Z, Szucs G. Spiral ganglion neurones: an overview of morphology, firing behaviour, ionic channels and function. *Pflugers Arch.* 2009; 457:1303-25.

Safieddine S, Bartolami S, Wenthold RJ, Eybalin M. Pre- and postsynaptic M3 muscarinic receptor mRNAs in the rodent peripheral auditory system. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996; 40(1):127-35.

Safieddine S, Prior AM, Eybalin M. Choline acetyltransferase, glutamate decarboxylase, tyrosine hydroxylase, calcitonin gene-related peptide and opioid peptides coexist in lateral efferent neurons of rat and guinea-pig. *Eur J Neurosci.* 1997; 9:356-67.

Safieddine S, Wenthold RJ. The glutamate receptor subunit delta1 is highly expressed in hair cells of the auditory and vestibular systems. *J Neurosci.* 1997; 17:7523-31.

Santos-Sacchi J. Voltage-dependent ionic conductances of type I spiral ganglion cells from the guinea pig inner ear. *J Neurosci.* 1993; 13:3599-611.

So CH, Verma V, Alijaniam M, Cheng R, Rashid AJ, O'Dowd BF, George SR. Calcium signaling by dopamine D5 receptor and D5-D2 receptor hetero-oligomers occurs by a mechanism distinct from that of dopamine D1-D2 receptor hetero-oligomers. *Mol Pharmacol.* 2009; 75:843-54.

Soto E, Vega R, Chávez H, Ortega A. Fisiología de la audición: la cóclea. Instituto de Fisiología BUAP. 2003
<http://www.fisio.buap.mx/online/DrSotoE/COCLEA%202003%20Formateado%20b.pdf>

Spoendlin H. Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol.* 1972; 73:235-48.

Spoendlin H. Anatomy of cochlear innervation. *Am J Otolaryngol.* 1985;6:453-67.

Sterenborg JC, Pilati N, Sheridan CJ, Uchitel OD, Forsythe ID, Barnes-Davies M. Lateral olivocochlear (LOC) neurons of the mouse LSO receive excitatory and

inhibitory synaptic inputs with slower kinetics than LSO principal neurons. *Hear Res.* 2010.

Stoof JC, Verheijden PF. D-2 receptor stimulation inhibits cyclic AMP formation brought about by D-1 receptor stimulation in rat neostriatum but not nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol.* 1986; 129:205-6.

Sun W, Salvi RJ. Dopamine modulates sodium currents in cochlear spiral ganglion neurons. *Neuroreport.* 2001; 26:803-7.

Sun W, Ding DL, Wang P, Sun J, Jin X, Salvi RJ. Substance P inhibits potassium and calcium currents in inner earspiral ganglion neurons. *Brain Res.* 2004; 1012:82-92.

Surmeier DJ, Eberwine J, Wilson CJ, Cao Y, Stefani A, Kitai ST. Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89:10178-82.

Surmeier DJ, Reiner A, Levine MS, Ariano MA. Are neostriatal dopamine receptors co-localized? *Trends Neurosci.* 1993; 16:299-305.

Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC Jr, Nairn AC, Greengard P. Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron.* 1995; 14:385-97.

Szabó ZS, Harasztosi CS, Sziclai I, Szucs G, Rusznak Z. Ionic currents determining the membrane characteristics of type I spiral ganglion neurons of the guinea pigs. *J Neurosci.* 2002; 16:1887-95.

Thompson RF. *The brain a neuroscience primer.* 3ra. Edición. Editorial Worth. Pág. 130. 2000.

Undieh AS. Pharmacology of signaling induced by dopamine D(1)-like receptor activation. *Pharmacol Ther.* 2010; 128:37-60.

Valdés-Baizabal C. Modulación dopaminérgica de corrientes ionicas en neuronas aisladas del ganglio coclear de la rata. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas, Instituto de Fisiología BUAP, 2009.

Valverde MA, Shepard DN, Represa J, Giraldez F. Development of Na⁺- y K⁺- currents in the cochlear ganglion of the chick embryo. *Neuroscience* 1992; 51:621-30.

Verma V, Hasbi A, O'Dowd BF, George SR. Dopamine D1-D2 receptor Heteromer-mediated calcium release is desensitized by D1 receptor occupancy with or without signal activation: dual functional regulation by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem.* 2010; 285:35092-103.

Vicente-Torres MA, Gil-Loyzaga P, Carricondo F, Bartolomé MV. Simultaneous HPLC quantification of monoamines and metabolites in the blood-free rat cochlea. *J Neurosci Methods*. 2002; 119:31-6.

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

Yi E, Roux I, Glowatzki E. Dendritic HCN channels shape excitatory postsynaptic potentials at the inner hair cell afferent synapse in the mammalian cochlea. *J Neurophysiol*. 2010; 103:2532-43.

Zha DJ, Wang ZM, Lin Y, Liu T, Qiao L, Lu LJ, Li YQ, Qiu JH. Effects of noradrenaline on the GABA response in rat isolated spiral ganglion neurons in culture. *J Neurochem*. 2007; 103:57-66.

Zheng H, Tang YD, Zheng Y, Yang H. [Detection of GABAA alpha 2 mRNA in rat cochlear spiral neuron with in situ hybridization]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2004; 35(2):182-4, 187.