



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neurobiología

*Caracterización e identificación de los
receptores a Adenosina en la papila basilar
del embrión de pollo*

Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Fisiológicas

Presenta

Biol. Francisco Vargas Martínez

Directora de Tesis:

Dra. Amira Flores Urbina

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado mediante la Beca con número de registro 665889 para la realización del Posgrado: Maestría en Ciencias Fisiológicas en el Instituto de Ciencias Fisiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa II. Investigación y Posgrado. Aseguramiento de la calidad en el Posgrado. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2013-2017

AGRADECIMIENTOS

A mis padres ya que sin ellos yo no estaría aquí intentando encontrar las palabras correctas para decirles lo mucho que los amo y les agradezco todo lo que ha hecho por mí, sin ustedes yo no sería nada, es mas ni existiría. Infinitas gracias Guillermo y Lorena los mejores padres que pude haber tenido.

A mis hermanos por siempre apoyarme y estar a mi lado en los momentos más difíciles, son los mejores, los amo!!!.

A la Doctora Amira Flores Urbina a la cual considero una persona de un valor incalculable y que más allá de mi asesora la considero como una gran hermana mayor y a la cual le agradezco sus consejos y apoyo incondicional. Además, le agradezco por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio.... la quiero muchísimo doctora, nunca cambie.

A mis compañeros de laboratorio los cuales aprecio mucho y agradezco su apoyo incondicional durante todos estos años, gracias por soportarme tanto tiempo.

A los integrantes del laboratorio de Neuroendocrinología por el apoyo y conocimiento brindado, en particular al doctor Eduardo Monjaraz y Karina mis grandes Maestros de la biología molecular.

INDICE	
INDICE.....	4
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
GENERALIDADES	10
EL OÍDO INTERNO	11
PAPILA BASILAR	13
<i>Células ciliadas altas</i>	15
<i>Células ciliadas cortas</i>	18
<i>Transducción auditiva</i>	21
<i>Mecanotransducción</i>	21
SINTONÍA DE FRECUENCIAS	23
<i>Sintonía macromecánica</i>	23
<i>Sintonía eléctrica</i>	24
AMPLIFICACIÓN COCLEAR	26
NEUROTRANSMISIÓN	28
ATP	31
ADENOSINA	32
<i>Metabolismo de la adenosina</i>	33
<i>Receptores P1</i>	35
<i>Receptor A₁</i>	36
<i>Receptor A_{2A}</i>	39
<i>Receptor A_{2B}</i>	41
<i>Receptor A₃</i>	44
<i>Transportadores para adenosina</i>	47
ANTECEDENTES DE LA ADENOSINA EN EL SISTEMA AUDITIVO	50
JUSTIFICACIÓN.	54
HIPOTESIS	55
OBJETIVO GENERAL	55
OBJETIVOS PARTICULARES	55

METODOLOGIA	56
<i>Modelo experimental</i>	56
<i>Solución para los registros extracelulares unitarios</i>	56
<i>Disección</i>	56
<i>Técnica de registro</i>	57
<i>Fármacos utilizados</i>	57
TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR	57
<i>Extracción del ARN</i>	57
<i>Transcripción Reversa (RT)</i>	58
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	59
ANALISIS ESTADÍSTICO	61
RESULTADOS	61
Efecto de Adenosina sobre la actividad eléctrica basal de las aferentes auditivas ...	62
Efecto de CCPA sobre las aferentes auditivas.	66
Efecto de PSB 0777 Ammonium salt sobre las aferentes auditivas.	69
Expresión del ARNm codificante para los subtipos de receptores P1 (RT-PCR)	72
DISCUSIÓN	74
CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	85

ABREVIATURAS

A₁: Receptor a adenosina A₁

A_{2A}: Receptor a adenosina A_{2A}

A_{2B}: Receptor a adenosina A_{2B}

A₃: Receptor a adenosina A₃

AC: adenilil ciclasa

ADA: adenosina desaminasa

ADK: adenosina quinasa

AKT: Proteína kinasa B

AMP: adenosin monofosfato

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ARs: receptores para adenosina

ATP: adenosín trifosfato

BP: papila basilar

CCPA: 2-cloro-N⁶-ciclopentiladenosina

ChAT: colinacetiltransferasa

CMP: Citidina monofosfato

cN-IA: 5'-nucleotidasas citosolica IA

cN-II: 5'-nucleotidasas citosolica II

cN-III: 5'-nucleotidasas citosolica III

CNTs: transportadores de nucleósidos concentrativos

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc

ecto-PDE: ecto-fosfodiesterasa

ENTPDasa: ecto-nucleosido trifosfato difosfohidrolasa

ENTs: transportadores de nucleósidos equilibrativos

ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GC: Ganglio coclear

GDP: Guanosín difosfato

GIRKs: Canales de potasio rectificadores de entrada

GMP: Guanosín monofosfato

GRKs: cinasas de receptores acoplados a proteínas G

IHC: células ciliadas internas

IL-6: Interleucina-6

IMP: inosina monofosfato

IP3: inositol 1,4,5 trifosfato

KA: -Kainato

KHz: Kilohertz

MAPKs: cinasas activadas por mitógenos

mGluR1: Receptores metabotrópicos a glutamato del grupo I

mGluR2: Receptores metabotrópicos a glutamato del grupo II

mGluR3: Receptores metabotrópicos a glutamato del grupo III

NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NMDA: N-metil-D-aspartato

OHC: células ciliadas externas

P2X: Receptores ionotrópicos a ATP

P2Y: Receptores metabotrópicos a ATP

PI3K: Fosfatidilinositol-3-kinasa

PKA: proteína quinasa dependiente de AMPc

PLC: fosfolipasa C

PSB 0777 ammonium salt: 4-[2-[(6-Amino-9-b-D-ribofuranosyl-9H-purin-2-yl)thio]ethyl] benzenesulfonic acid ammonium salt

ROS: Radicales libres de oxígeno

R-PIA: N6-R- fenilisopropiladenosina

SHC: células ciliadas cortas

THC: células ciliadas altas

TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa

UDP: Uridín difosfato

UMP: Uridín monofosfat

RESUMEN

En el presente trabajo evaluamos la participación de Adenosina y sus agonistas sobre la actividad eléctrica espontánea y el patrón de disparo de las aferentes auditivas de la papila basilar del pollo (*Gallus domesticus*) durante el desarrollo embrionario (E15, E18 y E21), empleando para ello una preparación *in vitro* del sistema auditivo y la técnica de registro extracelular unitario.

Encontramos que la aplicación por perfusión en el baño del agonista Adenosina en las concentraciones de 1, 10 y 100 μM (n=30), provocó un incremento en la frecuencia de disparo de las aferentes auditivas de la papila basilar, el cual fue dependiente de la concentración empleada y de la edad embrionaria estudiada. El efecto excitador de Adenosina es más evidente a la edad embrionario de 21 días, incrementando $62.85 \pm 1.48 \%$, $140.19 \pm 18.90 \%$ y $178.79 \pm 3.91 \%$ en 1, 10 y 100 μM , respectivamente. Tal efecto decreció significativamente con la co-aplicación del antagonista cafeína 100 μM en un 36.5 % (n=4). Resultados similares encontramos con la co-aplicación de teofilina a la misma concentración (n=4, 30.82 %).

Una vez que observamos un efecto mediado por Adenosina, como lo confirmó el hecho de que fuera inhibido por los antagonistas inespecíficos cafeína y teofilina, decidimos tratar de investigar que subtipo de receptor a Adenosina podría estar mediando tal acción. Empleamos el agonista CCPA, selectivo de los receptores A_1 , el cual aplicamos a las concentraciones de 1, 10 y 100 μM (n=35). Encontramos que provocó incrementos en la frecuencia de disparo espontáneo de las aferentes auditivas, principalmente a las concentraciones de 10 y 100 μM en E18 y E21, los incrementos fueron de $37.84 \pm 10.73 \%$, 80.77 ± 7.15 , $94.08 \pm 16.4 \%$ y $132.13 \pm 15.14 \%$, respectivamente.

En otra sección experimental empleamos PSB 0777 Ammoniu salt, agonista selectivo para los receptores a adenosina A_{2A} . Con esta sustancia encontramos que generó incrementos en la frecuencia de disparo de las aferentes de la papila basilar, pero no fueron significativos en ninguna de las edades estudiadas (E15, E18 y E21) y con ninguna de las concentraciones administradas (1, 10 y 100 μM ; n=30).

Los patrones de descarga de las aferentes auditivas se vieron ligeramente modificados hacia valores más regulares tras la administración de los agonistas. Los cambios más destacados se observaron tras administrar de CCPA 10 y 100 μ M en E21.

Finalmente, mediante la técnica de RT-PCR evaluamos la presencia del ARNm codificante para los cuatro subtipos de receptores a Adenosina tanto en la papila como en el ganglio auditivo del embrión de pollo en edades de 15 y 21 días. Mediante el análisis semi-cuantitativo encontramos que en edades tempranas del desarrollo (E15) sólo está presente la banda correspondiente al receptor A_{2A} tanto en papila como en ganglio y cuya expresión se incrementa en edades posteriores del desarrollo (E21). También en E21 se identificó la presencia de ARNm codificante para el receptor A₁ y A₃, además de que solo en epitelio sensorial se logró observar la banda correspondiente al receptor A_{2B}.

Estos resultados parecen indicar la presencia de receptores a Adenosina en la sinapsis célula ciliada-neurona aferente de la papila basilar y nos permite considerar la posibilidad de que la Adenosina actúe como un neuromodulador en la sinapsis aferente auditiva del pollo además de que su acción cambia a medida que avanza el desarrollo embrionario, es decir, a mayor maduración del sistema mayor efecto de Adenosina. Así mismo nuestros resultados no descartan la posible participación de al menos uno de los otros dos subtipos de receptores P1, aunque esto deberá explorarse con mayor profundidad en trabajos posteriores.

GENERALIDADES

El sentido del oído, o la audición es una capacidad sensorial que han desarrollado los insectos y los vertebrados. Todos los vertebrados presentan en su cabeza órganos sensoriales cuya función es el mantenimiento del equilibrio (sistema vestibular), además los vertebrados superiores presentan un complemento de este laberinto destinado a la audición, la cóclea, la cual desde un punto de vista evolutivo es filogenéticamente más moderna que el sistema vestibular (San Román, 2001). En los vertebrados la audición se desarrolló con una adaptación de los mecanismos de percepción vibratoria (la línea lateral y el laberinto). Esta capacidad les proporcionó un medio para rastrear presas o escapar de los depredadores, buscar pareja, favorecer la supervivencia y finalmente permitir la comunicación (San Román, 2001; Arch-Tirado et al., 2004).

La audición es la percepción de ondas sonoras que se propagan por el espacio; son un tipo particular de ondas elásticas que pueden producirse y propagarse en un medio (sólido, líquido, gaseoso) que presente la propiedad de poseer elasticidad y masa; por lo tanto si una partícula de este tipo de medio es desplazada de su posición de equilibrio, las fuerzas elásticas tenderán a retornarla a su posición original, además debido a que estas partículas también tienen masa poseerán inercia por lo que al moverse chocarán con las partículas próximas, haciendo que éstas también se muevan y pongan en movimiento a las partículas vecinas. Así, la perturbación que originó el desplazamiento inicial se propaga a través de las oscilaciones de las partículas elásticas próximas (como en un efecto dominó) (San Román, 2001; Rocamora, 2006). Es imprescindible la existencia de partículas para que se pueda transmitir el sonido, de ahí que no pueda propagarse a través del vacío (San Román, 2001; Wilson, 2003) El sonido se caracteriza en función de ciertos parámetros como son su frecuencia (grave o aguda) medida en hertzios (Hz), su amplitud (que está relacionada con una intensidad débil o fuerte) medida en decibelios (dB) y su longitud de onda (San Román, 2001; Gil-Loyzaga and Poch-Broto, 2007)

En la naturaleza, los sonidos habituales no son de frecuencias únicas si no que se trata de sonidos complejos formados por la unión de múltiples frecuencias simples, que el sistema auditivo se encargará de descomponerlos en sus frecuencias únicas a nivel del receptor

auditivo, y analizarlos en las vías de conducción central y en la corteza auditiva (Gil-Loyzaga and Poch-Broto, 2000).

Finalmente podemos decir que la audición es el resultado funcional del sistema auditivo, que posee una organización extremadamente compleja. Este sistema inicia su función mediante el epitelio neurosensorial auditivo (órgano de Corti en mamíferos) el cual permite captar las vibraciones moleculares del medio externo y transformarlas en un complejo código de impulsos nerviosos, que a su vez serán transmitidos al cerebro donde se integrarán con información proveniente del resto de los sentidos para su análisis e interpretación, permitiendo así elaborar un esquema general del entorno (Gil-Loyzaga and Pujol, 1999; San Román, 2001).

EL OÍDO INTERNO

El oído interno de los vertebrados está compuesto por tres diferentes sistemas

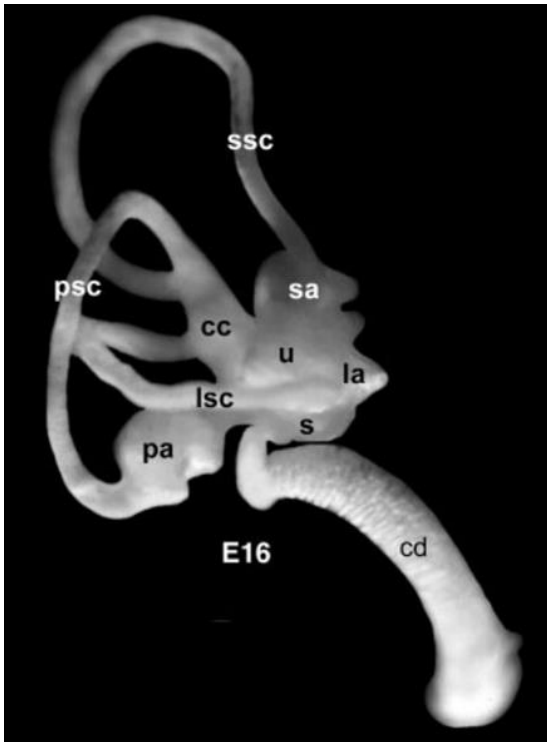


Fig. 1. Vista lateral del oído interno del pollo. cc, Cruz común; la, Ámpula lateral; lsc, Canal semicircular lateral; psc, Canal semicircular posterior; sa, Ámpula superior; ssc, Canal Semicircular superior o anterior; u, Utrículo; s, Sáculo; cd, Conducto coclear o Papila basilar. Tomado y modificada de Brigande et al., 2000.

sensoriales dedicados a la percepción del sonido, la gravedad y a varios movimientos de la cabeza (Lewis et al., 1985). Los dos sistemas sensoriales dedicados a la percepción de la gravedad y los movimientos de la cabeza son los órganos otolíticos y los canales semicirculares del sistema vestibular. Dentro de los órganos otolíticos encontramos el utrículo y el sáculo, los cuales están especializados en censar aceleraciones lineales, Mientras que los canales semicirculares, los cuales son: el anterior, posterior y lateral u horizontal detectan los movimientos angulares de la cabeza (Beisel, et al., 2005; Day and Fitzpatrick, 2005).

El órgano especializado en la percepción de los sonidos tanto en reptiles, aves y mamíferos se le ha nombrado cóclea (Manley,

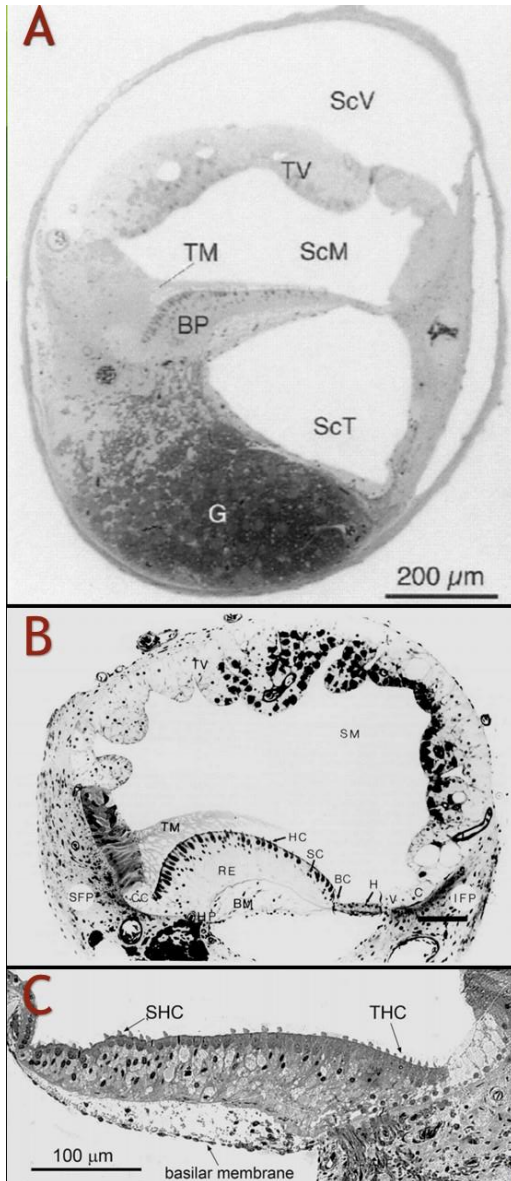


Fig. 2. Micrografías de una sección transversal de la papila basilar del pollo. **(A)** Corte transversal de la papila basilar donde se pueden apreciar los tres compartimientos en los que se encuentra dividida. **(B)** Magnificación de la escala media, donde se observan distintos componentes. **(C)** Magnificación del epitelio sensorial, donde se observan con mayor detalle las células ciliadas y de soporte. **ScV**, Escala vestibular; **ScM**, Escala media; **ScT**, Escala timpánica; **TV**, Tegumento vasculoso; **TM**, Membrana Tectorial; **BP**, Basila papilar; **G**, Ganglio coclear; **RE**, Epitelio sensorial; **HC**, Células ciliadas; **THC**, Células ciliadas altas; **SHC**, Células ciliadas cortas; **SC**, Células de soporte; **BC**, Células del borde; **H**, Células Hialinas; **V**, Células vacuolares; **C**, Células cuboidales; **HP**, Habenua perforata; **SFP**, Placa fibrocartilaginosa superior; **IFP**, Placa fibrocartilaginosa inferior. Tomado y modificado de Kollmar et al., 1997; Oesterle et al., 1992; Tan et al., 2013.

2000). A pesar, de las diferencias estructurales que pudiesen existir entre estos grupos, los órganos auditivos en los amniotas se desarrollan de estructuras embrionarias similares, adoptando una posición final semejante en el organismo y compartiendo un mismo ancestro en común (Manley, 2000). En los mamíferos, la cóclea es una estructura enrollada sobre un eje central con entre 1.5 y 4 vueltas completas, dependiendo de la especie; mientras que en aves, reptiles y anfibios se encuentra extendida y es conocida comúnmente como papila basilar (BP) (Tilney et al., 1986).

En general la información sonora entra a través del canal auditivo externo haciendo vibrar la membrana timpánica, la cual subsecuentemente transmite esta vibración hacia el oído medio, que a su vez la transfiere al interior de la cóclea o papila basilar como ondas de presión que se propagan a lo largo de la membrana basilar (lo que se ha denominado onda viajera) y donde los receptores sensoriales del oído interno, las células ciliadas mecano-sensoriales se encuentran localizadas (Mann and Kelley, 2011). Además, las células ciliadas sensoriales están diferenciadas a través del ancho de la membrana basilar, siendo llamadas células ciliadas internas (IHC) y externas (OHC) en mamíferos. En aves estas son originalmente llamadas células ciliadas altas (THC) y cortas (SHC) (Takaasaka and Smith, 1971). A su vez

éstas se encuentran asociadas a células no sensoriales referidas como células de soporte, estando ambas ordenadas en un mosaico celular denominado epitelio sensorial auditivo para el caso de aves y órgano de Corti para el de mamíferos (Mann and Kelley, 2011). Tanto en aves como en mamíferos las células ciliadas están cubiertas por una membrana tectorial contigua. En la región neural las células ciliadas reciben principalmente inervación de tipo aferente mientras que en la región abneural es predominantemente eferente (Smolders et al., 1995)

PAPILA BASILAR

La papila basilar puede considerarse como un tubo ciego que típicamente se encuentra un poco arqueada y que se extiende en dirección dorso ventral dentro del hueso petroso y en cuyo extremo apical se encuentra la macula lagenar (Bissonette and Fekete, 1996) con una longitud que va desde 3mm en pequeñas aves cantoras hasta 12mm en la lechuza (Schwartzkopff, 1968). En pollo es de aproximadamente de 3.5 mm (Hirokawa, 1978).

La papila basilar en su interior se encuentra dividida en tres compartimientos: la escala vestibular, la escala media y la escala timpánica (Hossler et al., 2002). La escala vestibular se comunica con la escala timpánica tanto en la base como en el ápex (helicotrema). También hay una ampliación de la escala timpánica cerca de la ventana redonda (Necker, 1999) y ambas se encuentran llenas de un líquido denominado perilinfa que tiene una composición iónica similar a la de otros líquidos extracelulares, es decir, una alta concentración de Na^+ (aproximadamente 140-150 mM) y una baja concentración de K^+ (aproximadamente 3.5-7 mM). En contraste, la escala media presenta una composición

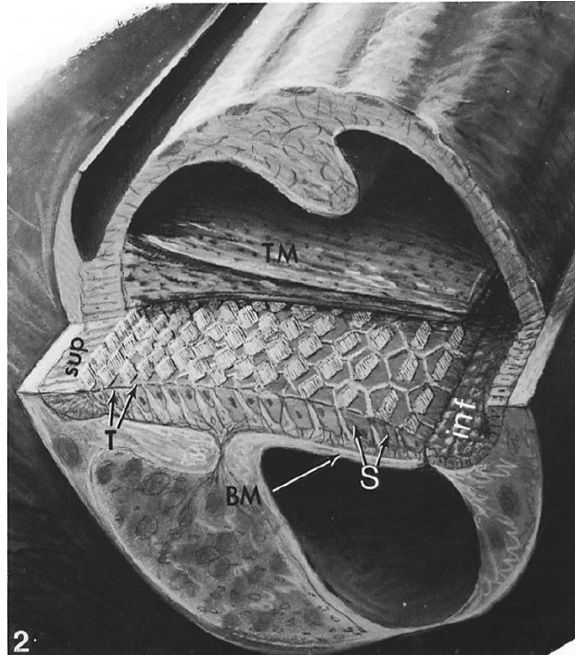


Fig. 3 Esquema de una porción de la papila basilar de un pollo de siete días de edad. El epitelio sensorial está compuesto por las células ciliadas, las células de soporte, ambas situadas sobre la membrana basilar (BM). Las células ciliadas pueden ser altas (T) si se localizan más cerca del margen superior (neural) (sup) o cortas (S) si lo están del inferior (abneural) (inf) y además recubriéndolas se encuentra la membrana tectorial (TM). También se puede observar el tegmento vasculoso (TV) y el ganglio coclear o auditivo (CG). Tomada y modificada de Tanaka and Smith, 1978.

opuesta, una alta concentración de K^+ (aproximadamente 110-145 mM) y una baja concentración de Na^+ (aproximadamente 1-5 mM), este líquido es conocido como endolinfa (Gil-Loyzaga and Poch-Broto, 2007).

Los principales elementos de la escala media son el epitelio neurosensorial y el tegumento vasculoso con células hialinas internas y externas en la zona de transición entre ambos tejidos. La mácula lagenar está localizada en el extremo apical de la escala media, la cual tiene cierta similitud con la mácula de los órganos vestibulares (Smith, 1985)

El epitelio sensorial en la cóclea del ave (papila basilar) tiene forma de hoz y además presenta una disminución gradual en su anchura, siendo ancha cerca del extremo apical y estrecha cerca del extremo basal (Gleich and Manley, 2000). El lado superior o convexo del epitelio descansa sobre una placa fibrocartilaginosa (la placa fibrocartilaginosa superior) que recubre las células ganglionares del nervio coclear (región neural) mientras que el lado inferior o cóncavo del epitelio sensorial se encuentra en la membrana basilar sin ningún apoyo o cartílago subyacente (región abneural) (Tilney and Saunders, 1983). Este epitelio está compuesto por varios miles de células sensoriales que pueden ser de dos tipos, en parte, dependiendo de su localización en el epitelio sensorial, siendo altas (THC) si están localizadas más cerca de la región neural o cortas (SHC) si lo están de la región abneural (Necker, 1999) más varias células de soporte que rodean a cada una de estas células ciliadas sensoriales en más o menos un patrón hexagonal (Köppl, 2015). Cubriendo este epitelio se encuentra una membrana extracelular fibrosa, la membrana tectorial, la cual se encuentra anclada cerca del borde superior o neural y en su región inferior tiene una estructura en forma de panal dentro de la cual los estereocilios más largos sobresalen. Además, hay cavidades y canales que permiten que la endolinfa alcance la superficie apical de las células ciliadas (Tilney and Saunders, 1983; Smith, 1985). Debido a esta fijación unilateral, los movimientos de la membrana basilar resultan en fuerzas de cizallamiento en la interface membrana tectorial-estereocilios (Necker, 1999).

El epitelio sensorial de la membrana basilar se encuentra organizado tonotópicamente de tal modo que las células ciliadas sensoriales que están localizadas en la región apical son máximamente sensibles a las frecuencias bajas (típicamente por debajo de 100 Hz), mientras que aquellas localizadas cerca del extremo basal presentan una sensibilidad máxima a las

altas frecuencias, normalmente en el rango de 5 a 8 Hz (Gleich et al., 2004). El rango de audición para el pollo se encuentra entre 150 a 4000 Hz (Fettiplace and Fuchs, 1999).

El tegumento vasculoso consiste en un epitelio altamente plegado que se extiende sobre las paredes dorsales y laterales internas de la escala media y además la separa de la escala vestibular. Se encuentra conformado por dos distintos tipos de células: células oscuras y células claras y se encuentra altamente vascularizado (Schmidt, 1964; Hossler et al., 2002). La superficie del epitelio está formada por un mosaico de células claras y oscuras alternadas (Hossler et al., 2002), éstas últimas presentan peculiaridades ultra estructurales que son típicas de las células que transportan iones: contienen numerosas mitocondrias y microvellosidades en la región apical. El papel de las células claras es menos evidente y se sugiere que controlan el cambio de iones y otros metabolitos entre las células oscuras y los capilares (Ganeshina, 1985).

El tegumento vasculoso tiene un importante rol en el mantenimiento de los gradientes catiónicos cocleares, de modo que el Na⁺ es reabsorbido y el K⁺ es secretado hacia la luz de la escala media (producción de la endolinfa) y el potencial endococlear (en aves es de alrededor de +15mV) es mantenido, similar a lo que sucede en la estría vascularis (Saito, 1980), por tanto se ha sugerido que el tegumento vasculoso sería el equivalente a la estría vascularis en mamíferos (Schmidt, 1964; Ishiyama et al., 1970).

Células ciliadas altas

Las células ciliadas altas (THC) tienen una longitud apico-basal mayor que su longitud transversal. Exhiben una forma columnar, alcanzando una altura (en aves) de entre 13 a 20 μm y encontrándose situadas sobre la placa fibrocartilaginosa superior. El diámetro de su superficie en dirección neural-abneural se encuentra en el rango de 5-9 μm mientras que en dirección apico-basal es de 9-16 μm (Hirokawa, 1978).

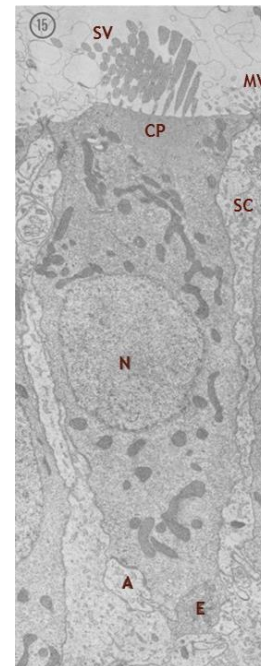


Fig. 4. Microscopía electrónica de una célula ciliada Alta de pollo de 21 días. CP, Placa cuticular; N, Núcleo; SV, estereocilios; SC, célula de soporte; MV, microvellosidades A, neurona aferente; E, neurona eferente. Tomado y modificado de Hirokawa, 1978.

En su región apico-central, las THC presentan una compleja red de filamentos de actina llamada placa cuticular que tiene un diámetro de superficie en aves de 7-9 μm en dirección neural-abneural y un diámetro de 9-16 μm en dirección apico-basal, proyectando dentro del citoplasma a una profundidad de 2.5-3 μm . De la placa cuticular sobresalen entre 150 a 220 estereocilios, además un kinocilio rudimentario emerge de la superficie de la célula en una localización un poco más abneural con respecto a la localización de la placa cuticular. Cabe mencionar que la longitud de los estereocilios decrementa conforme la distancia con el kinocilio aumenta y que las puntas de los estereocilios más largos (4.5-6 μm) se encuentran sujetas a la membrana tectorial (Hirokawa, 1978).

En cuanto a la innervación, THC hacen sinapsis en su región basolateral con numerosas fibras aferentes, se ha observado que una THC recibe entre una a cuatro fibras aferentes y con innervación exclusiva, es decir cada fibra nerviosa contacta únicamente con una THC (Manley et al., 1989). El número de aferentes es de alrededor de 12406 y virtualmente todas se encuentran mielinizadas (Köppl et al., 2000). Debido a la gran cantidad de innervación aferente que las células presentan se ha considerado que éstas podrían ser análogas a las células ciliadas internas de la cóclea de mamífero (Takasakaa and Smith, 1971; Mann and Kelley, 2011). Sin embargo, se han observado cambios en la tasa de secreción de vesículas entre las THC del pollo y las IHC de ratón; siendo de 4000 vesículas/segundo y 8700 vesículas/segundo, respectivamente (Fuchs et al., 2003). Respecto a la innervación eferente se ha observado que las fibras son pequeñas y las terminales sinápticas son pequeñas y en forma de botón (Hirokawa, 1978; Firbas and Müller, 1983). También se ha estudiado la innervación de la papila basilar durante el desarrollo, empezando a observarse especializaciones sinápticas (cuerpos sinápticos) desde el día embrionario 10, y a partir del día E15 las terminales aferentes se encuentran maduras, sobre todo aquellas que están asociadas a las THC. El sistema eferente se ha caracterizado a partir de E14, observándose algunas sinapsis pequeñas en la base de las THC y SHC, mientras que para E18 se encuentran sinapsis grandes en la base de las SHC (Cohen and Fermin, 1978).

Fuchs and Evans (1990) caracterizaron las corrientes de K^+ en THC aisladas de la cóclea del pollo, encontrando dos corrientes salientes de K^+ que son cinética y

farmacológicamente distintas: una corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} ($I_{k(Ca)}$) de activación rápida y otra de activación lenta, la corriente rectificadora tardía de K^+ (I_k) y que a su vez estarían fluyendo a través de distintos tipos de canales. Además, determinaron que estas corrientes estarían distribuidas diferencialmente a lo largo (ápex-base) de la papila basilar. En base a estas diferencias clasificaron a las THC en: “THC lentas” que están dominadas principalmente por la corriente lenta I_k , y que estarían localizadas más cerca del ápex, y las “THC rápidas” que estarían más cercanas a la base y dominadas principalmente por la corriente rápida $I_{k(Ca)}$. Estos autores, sugieren además que tales diferencias funcionales tendrían una implicación en lo que se conoce como sintonía eléctrica. Caracterizan también la corriente de K^+ rectificadora de entrada (I_{IR}). Este mismo grupo años antes (1988) trabajando con THC de la cóclea de lagarto (*A. mississippiensis*) reportan la presencia de una corriente entrante de Ca^{2+} , una corriente saliente de K^+ activada por Ca^{2+} , una corriente rectificadora de entrada y una pequeña corriente saliente transitoria. Ellos concluyen que las células ciliadas de la cóclea de lagarto presentan el mecanismo de sintonía eléctrica. Así mismo Pantelias et al. (2001) estudian las corrientes de K^+ en las THC, en una preparación intacta de la papila basilar del pollo encontrando que todas las células ciliadas registradas expresan dos corrientes de Ca^{2+} , la $I_{k(Ca)}$ y la I_k . Mencionan también, que sólo las células apicales expresan la I_{IR} . Adicionalmente, observan que la amplitud total de la corriente saliente se incrementa gradualmente a lo largo del eje tonotópico.

Zidanic and Fuchs (1995b), estudian una corriente entrante de bario (IBa) a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje utilizando la técnica de patch clamp en su modalidad de whole-cell. Registran tanto THC como SHC y concluyen que no existen diferencias significativas entre ambas y por tanto que las dos expresan canales de Ca^{2+} tipo L. Posteriormente Spassova et al. (2001), utilizando una preparación semi-intacta de la papila basilar del pollo estudió la liberación de neurotransmisor dependiente de Ca^{2+} en las THC, demostrando que la exocitosis del neurotransmisor es mediada por el influjo de Ca^{2+} a través canales de Ca^{2+} tipo L. También se ha demostrado que la mayoría de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje encontrados en la membrana de las células ciliadas de la papila basilar de pollo están formados por la subunidad $\alpha 1D$ (Kollmar et al., 1997).

Células ciliadas cortas

Las células ciliadas cortas (SHC) tienen una longitud transversal mayor que su longitud apico-basal, alcanzando una altura de 8 a 10 μm . El diámetro de su superficie en dirección neural-abneural se encuentra en el rango de 11-18 μm mientras que en dirección apico-basal es de 8-18 μm con una superficie dispuesta hexagonalmente. La placa cuticular mide 8-14 μm en dirección neural-abneural, extendiéndose ampliamente por toda la superficie de la célula y proyectándose 2.5-3 μm dentro del citoplasma celular. De la placa cuticular sobresalen entre 90 a 120 estereocilios. El kinocilio se encuentra ausente en pollo sin embargo un cuerpo basal está presente en el citoplasma. Cabe mencionar que en paloma las SHC si presentan un kinocilio. El estereocilio más largo tiene una longitud de 4.5-7 μm y además todos los estereocilios se encuentran ordenados de manera similar a los de las THC (Hirokawa, 1978).

Las SHC están inervadas por un porcentaje relativamente pequeño de fibras aferentes, las cuales forman terminales sinápticas pequeñas en forma de botón. Una sola fibra aferente contacta con seis SHC (Manley et al., 1989). En un trabajo realizado por Von Düring et al., (1985) trabajando con la cóclea de estornino, estiman que aproximadamente el 18% de las fibras aferentes inervan SHC. La inervación eferente es marcadamente mayor en las SHC que en las THC y las terminales sinápticas son grandes y con forma de cáliz (Hirokawa, 1978; Firbas and Müller, 1983). Además, se ha observado que las SHC son inhibidas

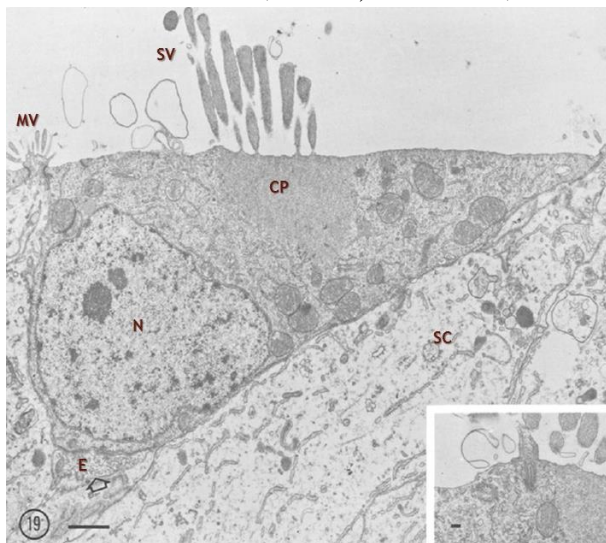


Fig. 5. Microscopía electrónica de una célula ciliada Corta de pollo de 21 días. CP, Placa cuticular; N, Núcleo; SV, estereocilios; SC, célula de soporte; MV, microvellosidades; E, neurona eferente. Tomado y modificado de Hirokawa, 1978.

(hiperpolarizadas) por la liberación de acetilcolina de las neuronas aferentes a través del receptor nicotínico (nAChR) $\alpha 9\alpha 10$. La inhibición es el resultado de la entrada de Ca^{2+} a través del nAChR que activa una corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} a través de los canales SK2 (Fuchs and Murrow, 1991, 1992a y 1992b; Zidanic, 2002), que ya han sido caracterizados y clonados en las SHC del pollo (Matthews et al., 2005). Igualmente,

se ha observado que durante una sobre-estimulación las SHC son más susceptibles al daño celular que las THC (Ryals and Rubel, 2005), sin embargo, Kurian et al., (2003) estudiando la destrucción de los tip-links mediante sobre-estimulación acústica no reportan ningún cambio significativo durante la recuperación de los tip-links entre las SHC y THC. También se ha reportado que las SHC y THC junto con sus terminales nerviosas pueden ser regeneradas 10 días posteriores de una sobre estimulación (Ryals and Westbrook, 1994). Así mismo, Umemoto et al., (1995) han reportado que después de un trauma acústico las células de soporte se dividen y diferencian en nuevas SHC vía células ciliadas con forma de huso, además se sugiere que el factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF) podría estar relacionado con la proliferación de las células de soporte y la extensión de las fibras nerviosas.

Se ha sugerido que las SHC podrían ser análogas a las células ciliadas externas de la cóclea de mamífero (Smith, 1971; Mann and Kelley, 2011) y que además ambas poseerían una función motora la cual sería requerida para extender el rango de frecuencias a 5 KHz o más (Gleich and Manley 2000; Köppl 2011; Manley and Köppl, 1998). Aunado a esto, un artículo publicado recientemente muestra evidencia de la presencia de una proteína homóloga a la prestina de mamíferos, en la membrana lateral de las SHC. Se sugiere que el uso de la prestina como una proteína motora ocurrió tempranamente en la evolución de los amniotas y no es una invención de los mamíferos, como generalmente se suponía (Beurg et al., 2013).

Murrow and Fuchs trabajando con células ciliadas de la papila basilar del pollo demuestran la presencia de un corriente transitoria de K^+ (I_A), la cual únicamente está presente en las SHC, a pesar de que su función no es muy clara ellos argumenta que esta corriente podría incrementar la respuesta de las células ciliadas a frecuencias altas, siendo de particular importancia para las SHC, ya que al igual que las OHC, pueden producir movimientos dependientes del voltaje (Murrow and Fuchs, 1990; Beurg et al., 2013).

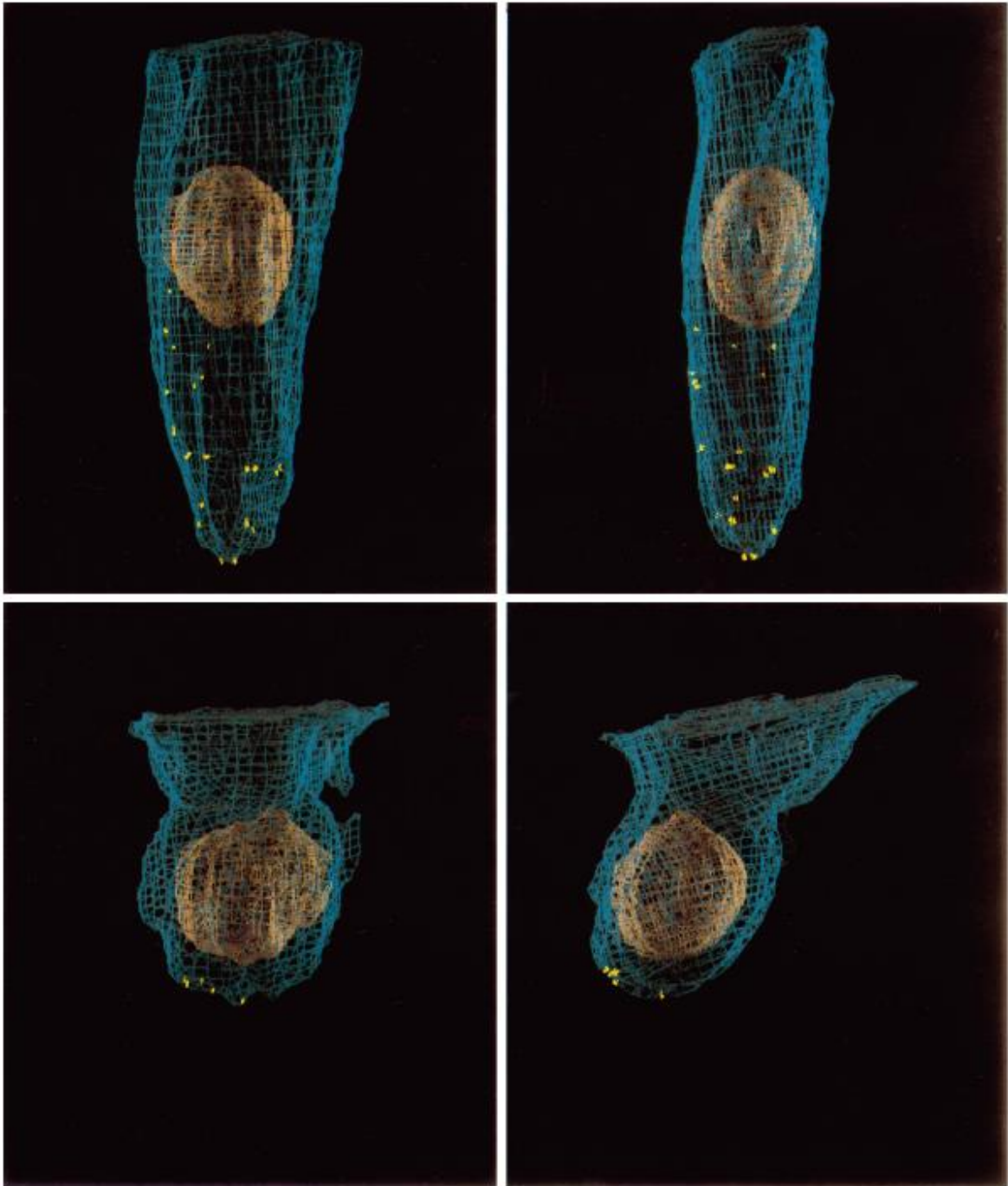


Fig. 6. Reconstrucción tridimensional de las células ciliadas. Paneles superiores THC, paneles inferiores SHC. Además, se presenta la vista frontal (izquierda) y lateral (derecha). Se observa en azul, el contorno de la célula; bronce, el núcleo y amarillo, los cuerpos densos presinápticos (PDBs). Nótese que los PDBs son más numerosos en las THC. Tomado y modificado de Martínez-Dunst et al., 1997.

Transducción auditiva

El primer paso de la transducción auditiva es la conversión de las oscilaciones de presión de aire en oscilaciones de fluido que puedan ser percibidas por los receptores que se encuentran en el epitelio sensorial (Ballestero, 2011). En las aves las ondas sonoras que impactan sobre la membrana timpánica son transmitidas a dos huesillos: la extra columnela y la columnela que a su vez transmiten el movimiento a una segunda membrana, ubicada en la ventana oval (Necker, 1999). El movimiento generado en la extra-columnela y la columnela debido a la vibración de la membrana timpánica provoca el desplazamiento de la ventana oval hacia la escala vestibular y de regreso. El medio líquido al ser incomprensible, cambia la vibración en una onda de presión que se transmite al interior de las cámaras cocleares, provocando la oscilación de las membranas cocleares y alcanzando la ventana redonda donde se produce la descompresión. La onda de presión utiliza la membrana basilar coclear como plano de avance desde la base al ápex (onda viajera) (Gil-Loyzaga and Poch-Broto, 2007); los movimientos de la membrana basilar provocarán el desplazamiento del receptor auditivo que conlleva a una deflexión del haz estereociliar (Vollrath, 2007), si la deflexión es en dirección abneural se desencadena el proceso de mecanotransducción.

Mecanotransducción

La mecanotransducción es un proceso fundamental en el sistema auditivo y vestibular que consiste en convertir los estímulos mecánicos del sonido, la atracción gravitatoria y los movimientos de la cabeza en señales eléctricas, y está mediado por las células ciliadas de dichos sistemas (Purves et al., 2007). El mecanismo propuesto para describir este fenómeno es el llamado modelo del resorte (gating-spring model) en el cual los estereocilios se encuentran interconectados por medio de uniones filamentosas extracelulares llamadas “tip links” (uniones de punta) uniendo el ápice de los estereocilios de menor tamaño con la pared lateral de los de mayor tamaño (Díaz et al., 2007). La deflexión del haz ciliar hacia el kinocilio; dirección correspondiente en la papila basilar al extremo abneural, incrementa la tensión de los tip links, que al encontrarse acopladas a uno o dos canales de transducción, los abre y provoca una corriente iónica de K^+ y Ca^{2+} que despolariza a la célula (Díaz et al., 2007; Purves et al., 2007) y origina un potencial receptor el cual viaja a lo largo de la membrana celular hasta llegar a la porción basolateral y cuyo fin último es incrementar la

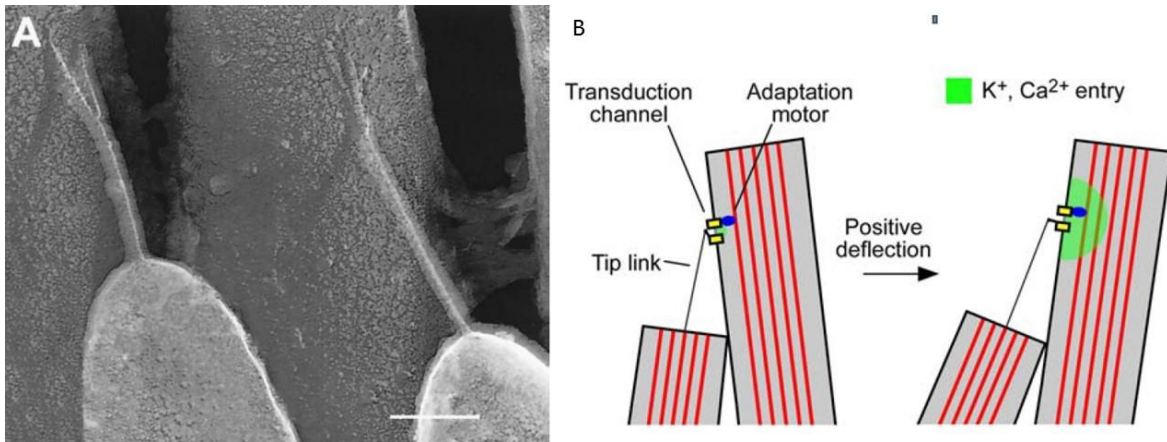


Fig. 7. A, Imágenes de congelación-grabado de las inserciones superiores de las uniones de punta (Tip-link) en la cóclea del cobayo. B, Esquema que representa de manera general el proceso de mecanotransducción. Tomado y modificado de Kachar et al. 2000; LeMasurier and Gillespie, 2005.

liberación de neurotransmisor en la sinapsis aferente, debido principalmente a la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y así mismo aumentar la frecuencia de descarga de las neuronas aferentes (Soto et al., 2002; Guth, 1998; Purves et al., 2007; Díaz et al., 2007). La composición iónica de la corriente mecanotransdutora en condiciones fisiológicas es principalmente de K^+ y Ca^{2+} , esto debido a que la dirección del gradiente electroquímico favorece el movimiento de dichos iones de la endolinfa al interior de la célula, pero se sabe que este canal es catiónico inespecífico por lo que también es permeable a Na^+ (Ohmori, 1985). La apertura de estos canales es mecánica, sin la intervención de una cascada enzimática, lo que permite que la respuesta a los estímulos se efectúe en unos pocos microsegundos y con una gran sensibilidad ante desplazamientos mínimos. Cuando el estímulo desaparece se cierran los canales de Ca^{2+} y se abren canales de K^+ dependientes de voltaje, situados en la base de la célula, que permiten la salida de K^+ y la recuperación del potencial de reposo (Díaz et al., 2007; Flores et al., 2001). Cabe mencionar que en el sistema auditivo de los vertebrados existe un tipo particular de canales de K^+ , estos son los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de alta conductancia (BK), los cuales presentan la peculiaridad de que para ser activados necesitan de manera simultánea la entrada de Ca^{2+} y la despolarización de la membrana (Cui, 1997). Estos canales tienen una gran implicación fisiológica en la cóclea de aves, ya que han sido relacionados con el proceso de sintonía de frecuencias (particularmente la sintonía eléctrica) (Rosenblatt, 1997).

El incremento local en la concentración de Ca^{2+} a través del canal de transducción actúa como una señal de retroalimentación para desencadenar la adaptación o el “renganche” del canal (Fettiplace and Ricci, 2003). La adaptación se manifiesta como una disminución en la corriente de transducción durante un estímulo sostenido y la translación de la relación entre la probabilidad de apertura y el desplazamiento a lo largo del eje x en la dirección del estímulo. Se han propuesto dos mecanismos con cinéticas distintas para describir este proceso: la adaptación rápida y que actuaría en uno o dos milisegundos y una lenta que le tomaría decenas o cientos de milisegundos (Fettiplace, 2006). El modelo de adaptación rápida sugiere que el Ca^{2+} que entra a través de los canales de transducción abiertos se une en o cerca del canal, causando que este se cierre (Howard and Hudspeth, 1988). Mientras que en la adaptación lenta la miosina a través de la modificación de la altura de la placa motora estaría regulando la tensión existente entre las uniones de punta (Gillespie and Cyr, 2004)

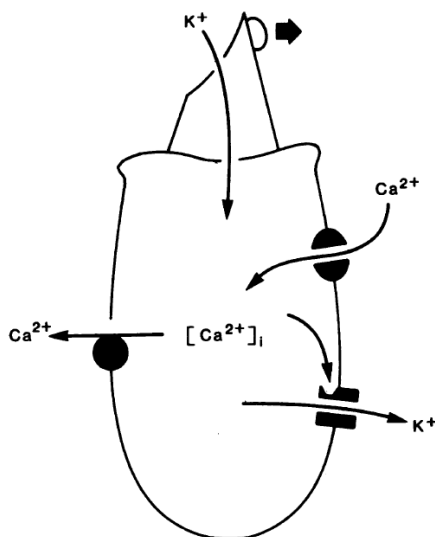


Fig. 8. Modelo de la resonancia eléctrica en las células cilidadas. La deflexión positiva del haz estereociliar genera un influjo de K^+ provocando la despolarización. Esta a su vez estimula la apertura de los canales de Ca^{2+} , y su entrada provoca la apertura de los canales BK, produciéndose la repolarización de la membrana. Cabe mencionar que la concentración intracelular de Ca^{2+} reducida por el secuestro de este ion dentro de los orgánulos celulares y por extrusión a través de bombas. Tomado y modificado de Hudspeth, 1985).

SINTONÍA DE FRECUENCIAS

La sintonía de frecuencias hace alusión a diversos mecanismos utilizados por las diferentes especies de vertebrados para descomponer los sonidos complejos en sus componentes de frecuencias. El análisis de frecuencias parece ser una característica primitiva entre todos los vertebrados, con la posibilidad de tener sus orígenes en los peces (Fay and Popper, 2000).

Hay tres procesos principales que nos ayudan a comprender el análisis de frecuencias en los vertebrados: macromecánicos, micromecánicos y resonancia eléctrica (Fay and Popper, 2000; Manley and Clack, 2004).

Sintonía macromecánica

El análisis de frecuencias macromecánico se basa en los gradientes de masa y rigidez de las

diferentes estructuras accesorias, principalmente membrana tectorial y membrana basilar (Fay and Popper, 2000). Tanto la membrana basilar como la membrana tectorial no son estructuras homogéneas, sino que, varían progresivamente en su longitud y grosor a lo largo de todo su recorrido desde la base hasta el ápex; siendo la papila basilar más gruesa, corta y rígida en la base y, progresivamente más fina, ancha y flexible en el ápex (Purves et al., 2001; Mann and Kelley, 2011). Estas variaciones en la masa y rigidez conllevan a que cada zona de la membrana basilar tenga una frecuencia de resonancia propia de forma que cada región de la membrana basilar solo vibrará con una frecuencia similar o idéntica cuando sea estimulada (Gil-Loyzaga and Poch-Broto, 2007), así, las frecuencias agudas provocan el desplazamiento máximo de la membrana basilar cerca de la base, mientras que las graves lo hacen en el ápex (Purves et al. 2007).

Eso nos permite comprender que cuando una estimulación sinusoidal alcanza la membrana basilar, debido a la elasticidad de ésta, se inicia una onda en la base de la cóclea que recorre la membrana hacia el ápex. La amplitud de la onda aumenta lentamente hasta que en la región de resonancia se produce el máximo desplazamiento de la membrana basilar que luego disminuye bruscamente hasta la desaparición de la onda (Gil-Loyzaga and Poch-Broto, 2007)

Sintonía eléctrica

La sintonía o resonancia eléctrica, según el modelo propuesto por Hudspeth and Lewis (1988) (para el sáculo de rana) y por Wu et al. (1995) (en la cóclea de tortuga), resulta de la interacción dinámica entre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje ubicados en la región basolateral de la célula y los canales BK cercanos.

En ese modelo, cuando los estereocilios son flexionados en dirección al estereocilio más grande se produce la apertura de los canales de transducción y la entrada de iones positivos principalmente K^+ . La despolarización evocada por esta corriente de transducción activa canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje, así los iones Ca^{2+} fluyen al interior de la célula incrementando la concentración intracelular de este ion, especialmente la concentración local justo debajo de la membrana, provocándose la activación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , y como el K^+ sale a través de estos canales, se comienza con la repolarización de la

membrana (Fig. 8). Finalmente, los canales BK se cierran y la célula retorna a su condición inicial, estando lista para que otro ciclo de resonancia comience (Hudspeth, 1985).

Entonces según este modelo, lo que determinaría una mejor respuesta a una frecuencia específica sería el número relativo y la cinética de estos canales que la célula expresará sobre su membrana, de manera que si hay relativamente pocos canales y sus cinéticas son lentas, los potenciales de membrana oscilarán lentamente entre la despolarización y la hiperpolarización, en cambio si hay más canales y estos tienen cinéticas rápidas, los cambios de voltaje les llevarán menos tiempo. Así, el potencial de membrana de las células oscilará a una velocidad que dependerá del número y la cinética de estos canales. Además, el número de canales de cada tipo y su cinética variará sistemáticamente en las células ciliadas a lo largo del epitelio neurosensorial (Manley and Clack, 2004). Una variación de 30 veces en la cinética de los canales BK determina una sintonía eléctrica de entre 50 a 600 Hz (Ramanathan et al., 1999).

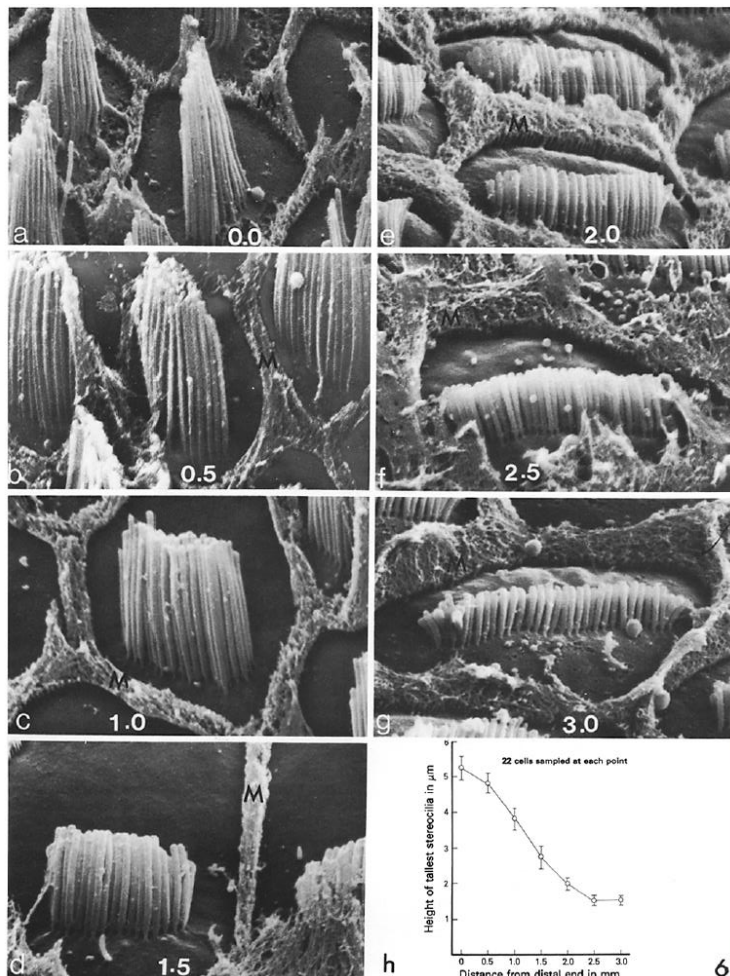


Fig. 9. (a-g) Microscopía electrónica de barrido de haces estereociliares representativos que emergen de la superficie apical de células ciliadas situadas en posiciones discretas sobre la BP. Los números en blanco indican la distancia de las células con respecto al extremo distal de la BP. Nótese que la longitud de los estereocilios disminuye conforme más nos alejamos del extremo distal (apical), o más nos acercamos al extremo proximal (basal). (h) Gráfico que representa la altura del estereocilio más alto de una célula ciliada, graficada en función de la distancia con el extremo distal de la PB. El gráfico se deriva de una sola cóclea y cada punto representa al menos los datos de 22 células ciliadas adyacentes. Tomado y modificado de Tilney and Saunders, 1983.

Sin embargo, uno de los problemas asociados a la sintonía eléctrica, es que ésta presenta una inherente limitación en la frecuencia, debido al hecho de que la membrana celular solo tiene espacio para un número finito de canales (Manley and Clack, 2004). Se ha observado que la temperatura es otro de los factores que afectaría la sintonía eléctrica; a las temperaturas más altas en las aves, la sintonía eléctrica debería funcionar como mínimo hasta los 4KHz (Wu et al., 1995) y por debajo de los 10 KHz (Manley and Clack, 2004).

Sintonía micromecánica

Comparada con la sintonía eléctrica, la sintonía micromecánica es relativamente nueva en el desarrollo evolutivo (Manley, 2000; Manley and Clack, 2004). Todas las células ciliadas tienen algún grado de sintonía micromecánica, y esto se debe a que todas presentan un haz estereociliar que tiene una rigidez y masa específica (Manley and Clack, 2004). La sintonía micromecánica resulta de la combinación específica entre la rigidez (por ejemplo del haz estereociliar o de un conjunto de haces estereociliares) y la masa (por ejemplo de la membrana tectorial) en una determinada unidad de resonancia (Manley, 2000; Manley and Clack, 2004), por lo que una célula ciliada o un grupo de ellas con estereocilios cortos y pequeña masa tectorial sobre los estereocilios, tiene mayor frecuencia de resonancia mecánica que aquellas células con estereocilios altos y gran masa. La sintonía micromecánica viene a jugar un papel muy importante en la especialización a frecuencias cada vez más altas, en lagartos hasta 8 KHz, en aves hasta 14 KHz y en mamíferos hasta más de 100 KHz (Manley and Clack, 2004).

AMPLIFICACIÓN COCLEAR

En todos los vertebrados, incluido el humano, la audición a intensidades bajas de sonido es permitida por un rápido sistema integral de amplificación mecánica presente en las células ciliadas (Ashmore and Kolston, 1994; Brownell, et al., 1985). Numerosos fenómenos han sido atribuidos a este amplificador coclear (Davis, 1983), incluido una mayor sensibilidad y selectividad de frecuencias en el oído, además de sonidos débiles generados de manera espontánea por las células ciliadas del oído interno, también llamadas emisiones otoacústicas. Estas emisiones y otros fenómenos indirectos que se cree indican amplificación por las células ciliadas, han sido descritos en todos los tetrápodos, sugiriendo que el mecanismo subyacente es muy antiguo (Manley, 2000).

El probable origen de la amplificación coclear puede deberse a dos mecanismos celulares. Uno implica movimientos rápidos del haz estereociliar que se encuentra sobre las células ciliadas; mientras que el otro involucra cambios conformacionales de moléculas que se encuentran en la membrana lateral de la célula ciliada (Hudspeth, 1997); ambos mecanismos han sido observados *in vitro* (Ashmore and Kolston, 1994; Brownell, et al., 1985; Martin et al., 2000).

Hay evidencia experimental que sugiere que dos procesos activos contribuyen al movimiento del haz estereociliar, primero, el haz estereociliar posee un ensamble de miosina, que es la base del motor de adaptación que reajusta la posición del haz estereociliar después de grandes y continuos desplazamientos. La segunda fuerza activa son los mismos canales de transducción (Hudspeth, 2005).

Cuando los estereocilios son desplazados abruptamente por algún estímulo positivo, estos, primeramente, se mueven en la dirección del estímulo, pero repentinamente vuelven a desplazarse sólo que en dirección opuesta (Howard and Hudspeth, 1988). Este movimiento retrógrado o “Twitch” está asociado con el cierre de los canales de transducción inicialmente abiertos por el estímulo ya que la velocidad y la magnitud de este “Twitch” incrementa cuando la concentración extracelular de Ca^{2+} aumenta (Fettiplace, 2006). Se considera entonces que el Ca^{2+} que entra a los estereocilios cuando los canales de transducción se abren, se une a sitios reguladores asociados con el canal, causando el cierre del mismo. Esto a su vez incrementa la tensión en los tip links, provocando que estos tiren conjuntamente de la punta estereociliar y desplacen el haz en dirección negativa (Fettiplace et al., 2001, 2006; Hudspeth, 2005).

Los cambios en la longitud de las células ciliadas han sido estudiados ampliamente en la cóclea de mamífero donde se ha demostrado que únicamente las células ciliadas externas presentan esta capacidad (Manley et al., 2001). Esta motilidad que presentan las OHC se debe a una proteína motora, la prestina. Se ha sugerido que los cambios de voltaje en la membrana modificarían la forma de esta proteína motora, y ya que se encuentra presente en una alta densidad en la membrana lateral de la célula ciliada se lograría un cambio en la longitud de la célula (Fettiplace et al., 2001). A pesar de la creencia de que las OHC de

mamíferos son las únicas que poseen electromotilidad, Beurg et al., 2013, demuestran que las células ciliadas de pollo poseen un generador de fuerza electromecánico en adición al movimiento del haz estereociliar, debido a la apertura y cierre del canal mecanotransductor. Sus resultados sugieren la participación de una proteína homóloga a la prestina de las OHC, además de que confirman la presencia de esta “prestina de pollo” en la membrana lateral de las células ciliadas mediante estudios de inmunohistoquímica. A pesar de que ellos no cuantifican el cambio en la intensidad del marcaje respecto a la posición, sus datos sugieren un gradiente tonotópico de la prestina de pollo.

NEUROTRANSMISIÓN

Existen pocos reportes disponibles acerca de la naturaleza de los neurotransmisores y receptores presentes en el sistema auditivo de aves, sin embargo, en la literatura se sugiere que el principal neurotransmisor aferente liberado en la mayoría de los vertebrados es probablemente L-glutamato o un aminoácido excitador similar (Irons-Brown and Jones, 2004).

Dentro de los reportes que apoyan la hipótesis del glutamato encontramos el de Yamaguchi and Ohmori (1990), donde determinan las propiedades electrofisiológicas de los canales iónicos presentes en células aisladas del ganglio auditivo de embriones de pollo, encontrando una gran población de canales NMDA (N-metil-D-aspartato). Años posteriores, en 1994, Kataoka and Ohmori utilizando una célula ciliada y colocándola en oposición a una célula granular o de Purkinje cultivada (recordemos que las células granulares son muy sensibles a glutamato) y registrando ambas mediante la técnica de voltage clamp en su modalidad de célula completa, logran identificar que el neurotransmisor liberado por las células ciliadas de la cóclea de pollo es glutamato. Estos mismos autores en 1996 y utilizando la misma técnica observan que la aplicación de Glutamato, Aspartato, Kainato (KA) y NMDA provocan corrientes iónicas en neuronas aisladas del ganglio auditivo de embriones de pollo (Kataoka and Ohmori, 1996).

En nuestro laboratorio se estudió el efecto de glutamato y diferentes agonistas glutamatérgicos (NMDA, AMPA y KA) sobre la frecuencia de descarga espontánea en las aferentes de la papila basilar durante el desarrollo embrionario (E15, E18, E21). Encontramos que tanto glutamato, como NMDA, AMPA y KA generaron un incremento significativo en

la frecuencia de disparo de las eferentes auditivas del pollo, indicando que el principal aminoácido excitador en la sinapsis célula ciliada-neurona aferente sería glutamato. Consideramos que existe una participación diferencial de los tres subtipos de receptores, encontrándose una mayor participación de los receptores AMPA y NMDA y una menor participación para el receptor Kainato, sugiriéndose una población relativamente pequeña de estos receptores, al menos en las edades estudiadas (Linares, 2007). En 2008, también en nuestro laboratorio, se demostró la presencia de receptores a glutamato de tipo metabotrópico en la sinapsis célula ciliada-neurona aferente durante el desarrollo embrionario (E15, E17, E19 y E21) de la papila basilar del pollo, sugiriéndose la participación de los tres grupos (mGluR1, mGluR2 y mGluR3), pero con una participación transitoria del grupo 3, sólo en edades tempranas del desarrollo (Rodríguez, 2008).

Otro de los compuestos que ha sido identificado en sinapsis aferente de la papila basilar del pollo, ha sido el ácido gamma-aminobutírico (GABA). Usami et al., (1987), observan inmunorreactividad a GABA localizada selectivamente en el citoplasma de las células ciliadas altas y cortas, por lo que sugieren su posible papel como neurotransmisor.

A través de los trabajos realizados por Cohen (1987) y Takasakaa and Smith (1971) se logró identificar por medio de tinción histológica la presencia de acetilcolinesterasa, mientras que por marcaje inmunohistoquímico Zidanic and Fuchs (1995a) identifican la colinacetiltransferasa (ChAT). Posteriormente Hiel et al., (2000) identifican el receptor nicotínico $\alpha 9$ en las células ciliadas de la cóclea de pollo, confirmando mayor marcaje para $\alpha 9$ en las SHC con respecto a las THC. En 2002, Zidanic, utilizando un anticuerpo contra ChAT y un marcador específico para neuronas colinérgicas sobre las terminales nerviosas y las fibras eferentes que inervan la papila basilar de pollo, determina que todas las fibras eferentes que inervan la papila basilar son colinérgicas. Todos estos reportes apoyan la hipótesis de que el principal neurotransmisor eferente en el sistema auditivo de todos los vertebrados es acetilcolina (ACh).

Otra sustancia que ha sido estudiada en la cóclea de pollo es el adenosín trifosfato (ATP). Galindo et al., (2013) estudiaron la participación del ATP sobre la frecuencia de disparo de las aferentes auditivas en la papila basilar y vestíbulo del pollo durante el desarrollo embrionario. Sus resultados sugieren que los receptores purinérgicos están

presentes en la papila basilar con mayor presencia en etapas tempranas del desarrollo. Se sugiere, además, que el ATP media su efecto principalmente a través de los receptores P2Y₁ y P2Y₂ y que probablemente estos receptores se encuentran localizados sobre la membrana basolateral de las células ciliadas.

Debido a la estrecha relación entre el ATP y su transformación en otros compuestos, específicamente a través de las ecto-nucleotidasas en adenosina (Sheth et al., 2014) y con base en reportes de la existencia de esta sustancia en la cóclea de mamíferos (Ramkumar et al., 1994, 2004; Ford et al., 1997a, 1997b; Hu et al., 1997; Khan et al., 2007; Vlajkovic et al., 2007 Wong et al., 2010; Tabuchi et al., 2012) y el reporte de la presencia del ATP en la papila basilar del pollo (Galindo et al., 2013), creemos que la adenosina puede estar jugando un papel relevante en la neurotransmisión en ésta estructura auditiva del pollo.

Las purinas y pirimidinas extracelulares tienen importantes y diversos efectos en muchos procesos biológicos incluidos la contracción del musculo liso, neurotransmisión, secreción endocrina y exocrina, reacción inmune, inflamación, dolor y modulación de la frecuencia cardíaca.

El primero en investigar el concepto de las purinas como moléculas de señalización extracelular fue Drury and Szent-Györgyi (1929), ellos demostraron que la adenosina y el adenosin monofosfato (AMP) extraídos del músculo del corazón, del cerebro, del riñón y del bazo de diversos modelos animales, ejercen profundos efectos farmacológicos como un efecto cronotrópico negativo en el corazón del conejillo de indias, del conejo, del gato y del perro; dilatación de los vasos sanguíneos coronarios y la inhibición de la actividad espontánea del musculo liso intestinal.

Gillespie (1934) centró su atención en las relaciones que existían entre la actividad y la estructura de compuestos de adenina, demostrando que la desaminación reduce en gran medida la actividad farmacológica, y además el remover los fosfatos de la molécula influencia no solo la potencia sino también el tipo de respuesta. El remover los fosfatos demostró incrementar la habilidad de los compuestos de adenina que causaban vasodilatación e hipotensión, mientras que el ATP causó un incremento en la presión sanguínea del conejo y gato. Además, se demostró que el ATP era más potente que el AMP y la adenosina en causar la contracción del fleon y útero del cobayo. De esta manera, comenzaron los indicios

de diferentes acciones para ATP y adenosina, así como la existencia de diferentes receptores para purinas.

ATP

Cuando se habla de ATP lo primero en que se piensa es en su función energética, la cual abarca tres principales propósitos: la realización de trabajo mecánico en la contracción muscular u otros movimientos celulares, el transporte activo de iones y moléculas, y la síntesis de macromoléculas y otras biomoléculas a partir de compuesto más simples (Stryer, 1998); sin embargo, gracias al estudio realizado por Burnstock (1972) y a trabajos posteriores, ahora sabemos que el ATP también puede actuar como un mensajero extracelular mediante la activación de una familia de receptores de superficie celular conocidos como P2 (Ralevic and Burnstock, 1998).

El ATP o adenosín trifosfato es un nucleótido formado por una base nitrogenada (adenina) unida al carbono cinco de un azúcar de tipo pentosa, la ribosa, que en su carbono cinco tiene enlazados tres grupos fosfato. Es una molécula rica en energía debido a que su unidad trifosfato contiene dos enlaces fosfoanhídrido (enlaces de alta energía). Cuando el ATP es hidrolizado a adenosin difosfato (ADP) y ortofosfato (Pi), o a adenosin monofosfato (AMP) y pirofosfato (PPi) una gran cantidad de energía es liberada (Galindo and Flores, 2006).

El ATP puede ser hidrolizado por la familia de enzimas conocidas como ectonucleosido trifosfato difosfohidrolasa (ENTPDasa) que son encargadas de hidrolizar nucleótidos tri y difosfato, y que además pertenecen a la superfamilia de las ectonucleotidasas (Robson et al., 2006). Se han identificado 8 genes diferentes que codifican para cada una de las ectoenzimas, cuatro de ellas se encuentran localizadas en la membrana (NTPDasa 1, 2, 3 y 8) con su sitio catalítico en dirección al espacio extracelular. Las NTPDasa 4 y 7 son localizadas intracelularmente y pueden estar viendo hacia la luz de algunos organelos citoplasmáticos (Zimmermann 2001; Robson et al., 2006). Por último, las NTPDasa 5 y 6 son intracelulares y una vez que han sido expresadas pueden ser secretadas con preferencia a hidrolizar uridín difosfato (UDP) y guanósín difosfato (GDP) (Todorov, 1997; Zimmermann 2001; Robson et al., 2006)

Como mencionábamos párrafos anteriores el ATP puede mediar su efecto a través de los receptores purinérgicos de tipo P2. Burnstock and Kennedy (1985), después de analizar diversos sistemas lograron discriminar entre dos clases principales de receptores P2, que fueron nombrados como P2X y P2Y. Los primeros pertenecen a una familia de canales iónicos activados por ligando, la unión del ATP ocasiona la apertura del poro y el paso de iones como Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Bean, 1992; Egan and Khakh, 2004). Siete genes que codifican para subunidades del receptor P2X han sido identificado y nombrados como P2X₁ hasta P2X₇ (Collo et al, 1996; Buell et al., 1996). Mediante estudios de cristalografía se ha logrado confirmar que los receptores P2X están conformados por tres subunidades (Kawate et al., 2009). También se ha observado que pueden formarse receptores P2X con diferentes tipos de subunidades, pudiéndose formar los siguientes receptores heteroméricos: el P2X_{2/3} (Surprenant et al., 1995; Thomas et al., 1998; Spelta et al., 2002; Virginio et al., 1998) P2X_{1/5} (Lê et al., 1998; Lê et al, 1999; Surprenant et al., 2000) P2X_{2/6} (Torres et al., 1999., King et al., 2000) y P2X_{4/6} (Lê et al.,1998).

Por su parte los P2Y son receptores acoplados a proteínas G, a menudo relacionados con la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la formación de inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) (Mammano et al., 2013) aunque se han propuesto mecanismos adicionales como la movilización de ácido araquidónico (Ralevic and Butnstock, 1998). Ocho receptores P2Y (P2Y₁, P2Y₂ P2Y₄ P2Y₆ P2Y₁₁ P2Y₁₂ P2Y₁₃ P2Y₁₄) han sido caracterizados en mamífero (Abbracchio et al., 2006)

ADENOSINA

La adenosina es un nucleósido formado por una base nitrogenada, la adenina unida covalentemente (por su N-9) a través de un enlace N-β-glucosídico con el carbono 1 de un azúcar de tipo pentosa, la ribosa (Lehninger and Cox, 2006). Esta molécula se encuentra

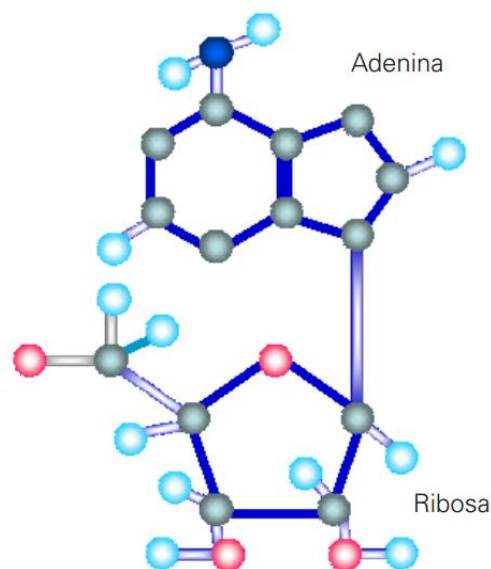


Fig. 10. Esquema de la estructura química de la adenosina. Las esferas en gris representan los carbonos, en rosa, oxígenos y en azul, hidrógenos. Tomado y modificado de Galindo and Flores, 2006.

involucrada en un gran número de funciones biológicas que incluyen la respiración celular y la biosíntesis de proteínas (como un componente del ácido desoxi-ribonucleico o ribonucleico). Extracelularmente la adenosina desempeña un rol como molécula de señalización que modula la citoprotección tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas (Fredholm et al., 2001; Jacobson and Gao, 2006). Esta respuesta protectora puede consistir en un incremento en el flujo sanguíneo (Ryzhov et al., 2008), preconditionamiento isquémico (Zheng et al., 2007) y supresión de la inflamación (Martin et al., 2006). Así mismo se cree que podría estar involucrada en desordenes del sueño (Ferré et al., 2007b; Huang et al., 2011), cáncer (Fishman et al., 2001), dolor (Gomes et al., 1999; Hayashida et al., 2005) y la enfermedad de Parkinson (Chen et al., 2001; Calon et al., 2004; Cieślak et al., 2008).

La adenosina ejerce su acción biológica al actuar sobre receptores de superficie celular comúnmente conocidos como receptores P1 y los cuales se acoplan a las cascadas de señalización intracelular. Hasta el momento se conocen cuatro subtipos de estos receptores, A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, cada uno de los cuales tiene un único perfil farmacológico, distribución tisular y acoplamiento al efector (Fredholm et al., 2001; Jacobson and Gao, 2006), por tanto, el efecto de la adenosina dependerá en gran medida del patrón de expresión relativa de los ARs en la superficie extracelular ya sea de un tipo celular particular o un tejido específico (Ralevic and Burnstock, 1998; Vlajkovic et al., 2007).

Metabolismo de la adenosina.

Bajo condiciones fisiológicas la adenosina es formada principalmente de manera intracelular a partir de S-adenosil homocisteína catalizada por la enzima S-adenosil homocisteína hidrolasa (Latini and Pedata, 2001), aunque también puede ser formada a partir de la desfosforilación del Adenosín monofosfato (AMP) por la enzima 5'-nucleotidasa (Zimmermann et al., 1998). Se conocen diferentes tipos de 5'-nucleotidasas citosolicas, dentro de las que se encuentran la cN-IA que presenta una alta especificidad por AMP y desoxipirimidinas monofosfato (Bianchi and Spsychala, 2003); cN-II que hidroliza de manera preferencial 6-hidroxipurinas como IMP y GMP sobre AMP o UMP (Itoh, 2013); cN-III la cual se encuentra altamente expresada en glóbulos rojos en donde participa en la degradación del RNA durante la maduración de los eritrocitos (Rees et al., 2003) con preferencia por las

ribo-pirimidinas sobre los desoxiribonucleotidos siendo inactiva frente a los nucleótidos de purina y tenido como mejor sustrato al CMP (Bianchi and Spsychala, 2003); cdN (5'(3')-desoxinucleotidasa) se encuentra presente en todas las células de mamíferos con una preferencia de 15 a 30 veces mayor para los desoxiribonucleotidos respecto a los ribonucleotidos, siendo sus principales sustratos dIMP y dGMP, poca actividad frente a dAMP y con actividad nula para dCMP (Mazzon et al., 2003).

Las enzimas encargadas de reducir los niveles de adenosina son la adenosina desaminasa (ADA) y adenosina quinasa (ADK) que cataliza la desaminación y fosforilación de adenosina a inosina y AMP, respectivamente (Masino and Boison, 2013). Así mismo la adenosina producida intracelularmente puede ser transportada al espacio extracelular vía transportadores específicos de nucleosidos a través de difusión facilitada regulándose así los niveles intra y extracelulares de esta molécula (Fredholm et al., 2001).

Extracelularmente la adenosina es formada por una serie de reacciones enzimáticas catalizadas por una familia de enzimas comúnmente llamadas ectonucleotidasas, y cuyo último paso es la producción de 5'-AMP el cual finalmente es degradado a adenosina por acción de la enzima 5'-Ectonucleotidasa o CD73. Esta proteína es un homodímero que se encuentra anclado a la membrana plasmática de la célula a través de un lípido glicosilfosfatidilinositol de anclaje y cuyo sitio activo se encuentra expuesto hacia el espacio extracelular (Latini and Pedata, 2001). Esta enzima ha sido localizada por inmunohistoquímica en la membrana plasmática de astrocitos, oligodendrocitos y microglia (Schoen et al., 1987; Grondal et al. 1988). Además, se ha observado en células gliales y PC12 que bajo condiciones hipóxicas la expresión de la ecto-5' nucleotidasa aumenta, seguido de un incremento en la concentración extracelular de adenosina (Braun et al. 1998; Kobayashi et al. 2000). También se han realizado estudios en células de hipocampo donde se ha demostrado que una rápida hidrólisis del ATP extracelular por la ecto-5'-nucleotidasa va seguida de la inhibición en la liberación de glutamato (Terrian et al. 1989). Así mismo se ha demostrado en sinaptosomas colinérgicos estriales que la inhibición de la ecto-5'-nucleotidasa con anticuerpos específicos decrementa la formación de adenosina a partir del ATP liberado (Richardson et al. 1987).

Otra posible fuente para la formación extracelular de adenosina es la liberación del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) al espacio extracelular (Latini and Pedata, 2001), en el espacio extracelular el AMPC puede ser convertido a 5'-AMP por la ecto-fosfodiesterasa (ecto-PDE) y después a adenosina por la ecto-5'-nucleotidasa. Una alternativa es que el AMPC sea convertido dentro de la misma célula a 5'-AMP y posteriormente liberado, proporcionando así una fuente para la formación de adenosina extracelular (Craig et al., 1994).

Receptores P1

El primero en establecer la clasificación de los receptores purinérgicos (P1 y P2) fue Burnstock en 1978, un año después Van Calcar et al., sugieren la primera clasificación dentro del grupo de los P1 o receptores para adenosina, ellos proponen nombrar A₁ a los receptores que median la inhibición del AMPC y A₂ a aquellos que la estimulan; posteriormente y con base en más datos moleculares, bioquímicos y farmacológicos se decide clasificarlos en tres subtipos: A₁, A₂, A₃, pudiendo subdividir al receptor A₂ en A_{2A} y A_{2B} (Tabla 1; Ralevic and Burnstock, 1998).

Todos los receptores a adenosina presentan una estructura general que podría colocarlos dentro de la familia de los receptores a rodopsina, que a su vez pertenece a la súperfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (Galindo and Flores, 2006). Cada uno está constituido por siete dominios transmembranales de aminoácidos hidrofóbicos, además se cree que cada dominio constituye una alfa hélice de aproximadamente 21 a 28 aminoácidos. El extremo N-terminal se encuentra en el lado extracelular, mientras que el extremo carboxilo lo está en el intracelular. Los dominios transmembranales están conectados por tres asas o loop hidrofílicas tanto intracelulares como extracelulares de tamaño desigual; generalmente el asa extracelular que une el TM4 y TM5 y la intracelular que une TM5 y TM6 son más grandes. También ocurre glicosilación N-oligosacárido (N-linked) en la segunda asa extracelular, el efecto de la glicosilación del receptor no es claro, sin embargo, se han sugerido distintas funciones que incluyen la estabilización conformacional de la proteína, protección contra proteasas y modulación de la función del receptor (Ralevic and Burnstock, 1998).

El receptor A_1 se encuentra acoplado a una proteína $G_{i/o}$ inhibiendo a la adenilil ciclasa (AC) y decrementando los niveles intracelulares de AMPc, también se ha reportado que este receptor puede interactuar con la PLC y canales de potasio. Los receptores para adenosina A_{2A} y A_{2B} están acoplados a una proteína G_s y estimulan a la AC (incrementando la concentración intracelular de AMPc). Los receptores A_{2A} y A_{2B} tienen una alta y baja afinidad por la adenosina, respectivamente. El receptor A_3 puede encontrarse acoplado a una proteína $G_{i/q}$ que al parecer inhibe la AC y activa la PLC (incrementando la concentración de IP₃ y diacilglicerol) (Fredholm et al., 2000; Fig.12). A diferencia de los receptores A_1 y A_{2A} para adenosina, la activación de los receptores A_3 requiere niveles relativamente más altos

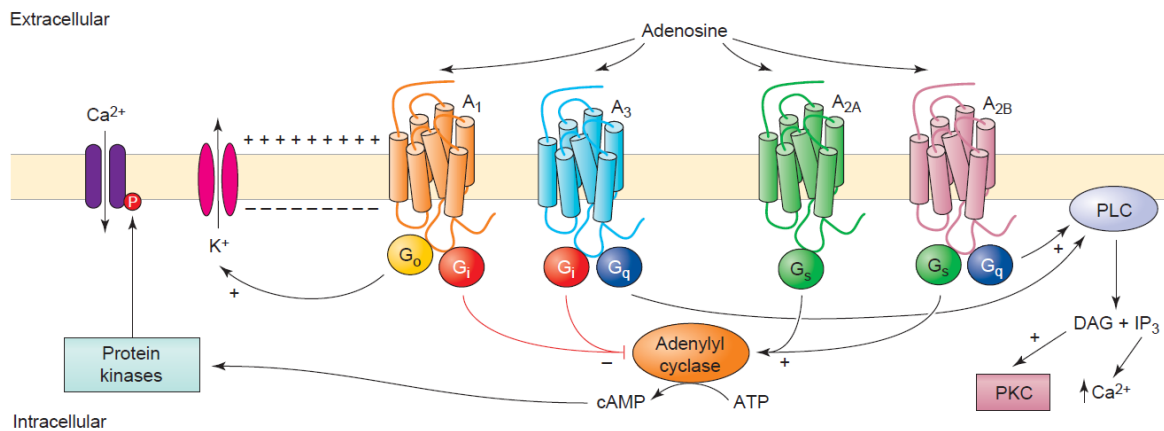


Fig. 11. Vías de transducción de la señalización asociadas a la activación de los receptores para Adenosina. Tanto el receptor A_1 y A_3 están asociados a una proteína G_i , la cual inhibe la actividad de la adenilil ciclasa, además el primero de ellos también puede encontrarse unido a una G_o y por un mecanismo dependiente del dímero $G_{\beta\gamma}$ activar canales de potasio de rectificación de entrada, lo cual podría contribuir a disminuir la excitabilidad de la membrana celular. Por otra parte, los receptores A_{2A} y A_{2B} están asociados a una G_s , la cual estimula la actividad de la adenilil ciclasa, incrementando los niveles de AMPc y provocando la activación de la PKA. Además, el A_{2B} y A_3 también pueden incorporar una proteína G_q desencadenando la vía de la fosfolipasa C al ser activados. Tomado y modificado de Moro et al., 2005.

de adenosina (Noji et al., 2004).

Receptor A_1

Desde la década de los 90 ya había comenzado a purificarse y clonarse el receptor A_1 en tejidos de diferentes animales, Libert et al., en 1989 lo hicieron para la tiroides de cánidos y en 1992 en humano, en ese mismo año Tucker et al., lo hicieron en el cerebro de bovino y un año después Bhattacharya et al., en el riñón de conejo, en 1994 Marquardt et al.; y Meng et al., lo hicieron para el cerebro de ratón y de cobayo, respectivamente. En base a estos datos se puede observar que este receptor está formado por alrededor de 326 a 328 aminoácidos, con una variabilidad en la secuencia aminoacídica de menos del 10 % entre el receptor de

perro, rata y vaca, y menos del 5% entre los bovinos y el humano (Ralevic and Burnstock, 1998). Además, se observan secuencias consenso en el segmento transmembrana MT3 y MT7 entre las diferentes especies de mamíferos e incluso entre los diferentes tipos de receptores, sugiriéndose que estas podrían ser esenciales para la unión del agonista (Fredholm et al., 2000).

El Receptor A₁ es una glicoproteína monomérica que tiene un peso de entre 34 a 36 KDa y el cual se encuentra ampliamente distribuido el cerebro (corteza, cerebelo e hipocampo), el asta dorsal de la médula espinal, el ojo, la glándula adrenal y las aurículas (Fredholm et al., 2000). Además, este receptor es el que presenta la mayor afinidad de los cuatro con respecto a la adenosina, en el rango de 70 nM (Dunwiddie and Masino, 2001) El receptor A₁ puede mediar una amplia gama de respuestas de señalización ya que se encuentra acoplado a distintos tipos de proteínas G, dentro de las cuales se encuentran la G_{i/o}. La vía de señalización más reconocida para este receptor es mediada por la activación de la proteína G_i y la cual provoca la inhibición de la AC (Van Calker et al., 1978), causando en decremento en el segundo mensajero AMPc, esto a su vez modula la actividad de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) disminuyendo su capacidad para fosforilar sus proteínas blanco (Fredholm et al., 2000; 2001).

El otro mecanismo de señalización es a través de la activación de la G_o, la cual acciona a la fosfolipasa C (PLC) conduciendo a la ruptura del fosfoinositol de la membrana celular, incrementándose así la producción de IP3 y diacilglicerol. El IP3 estimula la liberación de Ca²⁺ de almacenes intracelulares vía interacción con receptores específicos localizados en la membrana del retículo endoplasmático. La elevación de la concentración del Ca²⁺ citosólico junto con el diacilglicerol pueden mediar la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Fredholm et al., 2000; 2001; Linden, 1991)

También se ha observado que la estimulación del receptor A₁ puede activar canales de K⁺ rectificadores de entrada (GIRKs) probablemente vía dímero β-γ, además de inactivar canales de Ca²⁺ tipo N, P y Q (Fredholm et al., 2000; Dunwiddie and Masino, 2001)

La desensibilización del receptor A_1 fue inicialmente estudiada por Parsons and Stiles en 1987 en donde utilizando adipocitos de rata sometidos a administración crónica del agonista N6-R- fenilisopropiladenosina o R-PIA (el cual relativamente selectivo para el A_1) demostraron una disminución de la capacidad de estos para inhibir la AC además de una disminución en la cantidad de la subunidad $G_{i\alpha}$ y el incremento para la $G_{s\alpha}$. Estos hallazgos fueron corroborados por Longabaugh et al., en 1989, confirmando que la desensibilización de estos receptores está ligada con su regulación a la baja, así como también con una disminución de la $G_{i\alpha}$ y el incremento en la $G_{s\alpha}$, sin embargo, no encontraron alteraciones en los niveles de ARNm para ambas subunidades. Un estudio realizado en la línea clonal de células DDT₁MF-2 demostró que la desensibilización del receptor A_1 se encuentra asociado a la fosforilación del mismo y su desacople con la proteína G_i (Ramkumar et al., 1991). En 1997 Nie et al., trabajando con el mismo linaje celular demostraron que la incubación de estas células con R-PIA por un lapso corto de tiempo (una hora) provocaba la rápida translocación del citosol a la membrana plasmática de una quinasa de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) lo cual indicaría que estas proteínas son las encargadas de llevar a cabo la fosforilación del receptor. En el 2010 Jajoo et al., demuestra que la desensibilización de los A_1 está asociada a una pérdida de los mismos que al parecer depende de la activación de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) 1/2 a través de su interacción con la β -arrestina1, además observan que al retirar el agonista se genera una rápida recuperación de los niveles del receptor A_1 dependiente de la síntesis de nuevos receptores y la cual esta mediada por la actividad de las ERK1/2.

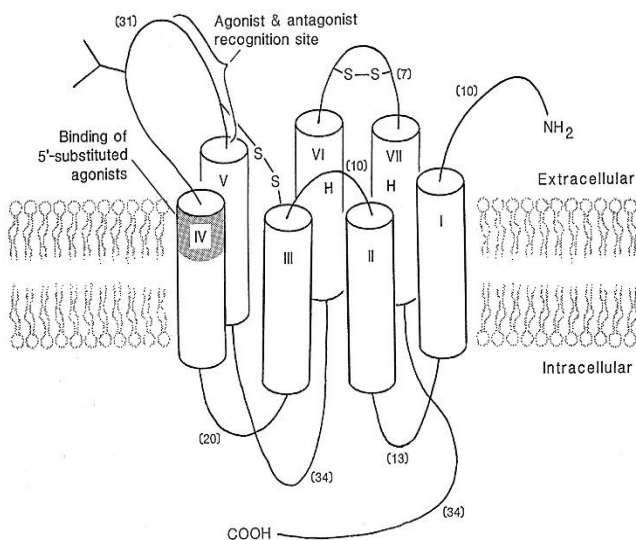


Fig. 12. Esquema del receptor para adenosina A_1 . En común con otros receptores acoplados a proteínas G, el receptor A_1 presenta siete dominios transmembranales (I- VII) compuestos de aminoácidos hidrofóbicos, cada uno de los cuales constituye una α -hélice y que se encuentran conectados por tres asas hidrofílicas intracelulares y extracelulares. El número de aminoácidos que componen cada asa, la región N-terminal y C-terminal para el receptor A_1 bovino se expresa entre paréntesis, así mismo entre 23 a 25 aminoácidos componen los dominios transmembranales. Las H representan los residuos de Histidina, los cuales son importantes para la unión del ligando. También se indican las regiones extracelulares y transmembrana del receptor que se creen importantes para la unión de agonistas y antagonistas. S-S representa la presencia hipotética de puentes disulfuro. Tomado y modificado de Ralevic and Burnstock, 1998.

Receptor A_{2A}

Este receptor fue clonado inicialmente a partir de la tiroides del perro (Maenhaut et al., 1990) y subsecuentemente del hipocampo de humano (Furlong et al., 1992), y del cerebro de rata y conejillo de indias. (Chern et al., 1992; Fink et al., 1992). El gen del A_{2A} ha sido mapeado en los cromosomas 11 (Libert et al., 1991) y 22 (MacCollin, et al., 1994) en el genoma de humano y se ha predicho que la masa molecular del receptor seria de 45 KDa. Un análisis de homología entre el receptor A_{2A} aislado y clonado del hipocampo de humano versus el clonado de la tiroides de perro revelo 93 % de homología, entre el A_{2A} de humano y ratón del 82.9% y entre rata y ratón del 94.6 % mientras que con el receptor A₁ y A₃ del 40 % (Furlong et al., 1992). Además, se ha observado una alta homología interespecies en 250 pares de bases localizadas río arriba del codón ATG lo que implicaría un posible papel funcional de esta región no codificante del gen, posiblemente como un modulador de la transcripción génica (Chu et al., 1996). Por otra parte, un análisis de identidad de aminoácidos entre el A_{2A} clonado de cerebro de rata vs el clonado de tiroides del perro revelo un 82 % de similitud, un análisis más detallado evidencio que las variaciones en las secuencias de aminoácidos son conferidas por la segunda asa extracelular y el dominio carboxilo terminal (Chern et al., 1992; Fink et al., 1992). Una comparación realizada entre las secuencias aminoacídicas de los receptores A₁, A_{2B} y A_{2A} clonados a partir de rata revelo que este último es el que posee el dominio carboxilo terminal más largo (Tucker and Linden, 1993) y que al parecer este no está involucrado en el acoplamiento del receptor con su proteína G, ya que al removerlo o remplazarlo con el C-terminal del receptor A₁ no se modifica la estimulación de la AC cuando este es expresado en células CHO (Feoktistov and Biaggioni, 1997). Algo interesante del receptor es que este es polimórfico, en particular la mutación silente T1083C (Le et al., 1996; Soma et al., 1998).

Como cualquiera de los otros subtipos de receptores a adenosina, este receptor está formado por siete dominios transmembranales, tres asas intra y extracelulares, de las cuales se ha determinado que los aminoácidos presentes en la segunda asa intracelular pueden modular indirectamente el acople del receptor a la proteína G_s, en particular los residuos de glicina y ácido glutámico (Olah, 1997). Además, se ha observado la presencia de varios residuos de asparagina que son sitios potenciales de glicosilación, sin embargo, se determinó que la glicosilación del receptor no es esencial para la unión del ligando al receptor, pero, si

lo son dos residuos de histidina presentes en los dominios transmembranales VI y VII (Jacobson et al., 1992).

Se ha encontrado que el receptor A_{2A} se concentra en las regiones dopaminérgicas del cerebro, en las neuronas espinosas GABAérgicas medianas del estriado dorsal, en las neuronas de la región central y cortical del núcleo acumbens y en el tubérculo olfatorio. Además, se determinó que los A_{2A} están asociados a la membrana plasmática o estructuras citoplasmáticas en las dendritas y espinas dendríticas en su mayoría en las sinapsis asimétricas (exitatorias), sin embargo, estos receptores también pueden estar presentes en la vecindad de sinapsis simétricas (inhibitorias) y en las terminales axónicas. Los receptores A_{2A} también pueden expresarse en el bazo, el timo, las plaquetas sanguíneas, células endoteliales e inmunes (incluidos los linfocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas), células de musculo liso y un gran número de neuronas en el sistema nerviosos simpático y parasimpático. En menor medida se expresan en corazón, pulmones y vasos sanguíneos (Fredholm et al 2001; Feoktistov and Biaggioni, 2011).

En relación a la vía de señalización se sabe que el receptor A_{2A} están acoplados a una proteína G de tipo estimuladora que involucra un incremento en la actividad de la AC y por consiguiente un aumento en los niveles intracelulares de AMPc. Se ha observado además que el receptor puede estar acoplado a diferentes tipos de proteínas G estimuladoras dependiendo del área en la cual se estudie, de tal manera que en zonas periféricas este subtipo de receptor esta acoplado a una G_s (este acople se ve influenciado por elementos presentes en la tercera asa intracelular pero no del carboxilo terminal) (Tucker et al., 2000), sin embargo en el estriado, una región del cerebro en la cual los A_{2A} son abundantes, la proteína dominante es la G_{olf} y la G_s es escasa (Kull et al., 2000). Además, se ha notado que los A_{2A} interactúan más ávidamente con proteínas G que contienen subunidades β_4 . Al activarse la proteína G esta se disocia en subunidad alfa ($G_{\alpha-s}$) y el dímero β/γ ; la $G_{\alpha-s}$ estimula a la AC tipo VI que incrementa los niveles de AMPc en la célula y produce la activación de la PKA la cual a su vez fosforila y estimula a la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc 1 (CREB1) (de Lera Ruiz et al., 2014), a pesar de que esta es la principal vía de señalización del receptor A_{2A} , en las células COS-7 de mono se ha demostrado la activación de las proteínas $G_{\alpha_{15}}$ y $G_{\alpha_{16}}$ las cuales estimulan la actividad de la PLC esto propicia un incremento en los niveles

de Ca^{2+} intracelular y la activación de la PKC (Offermanns and Simon, 1995). Además, abundante evidencia apunta a que posterior a la activación de los receptores $\text{A}_{2\text{A}}$ se estimula la actividad de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) (Schulte y Fredholm, 2000).

Hay reportes de que los receptores pueden desensibilizarse si son sometidos a un estímulo constante y el receptor $\text{A}_{2\text{A}}$ no se la excepción. Se ha observado que la exposición de $\text{A}_{2\text{A}}$ por un corto plazo de tiempo al agonista induce una rápida desensibilización del receptor que está asociada a una disminución en el acople receptor-proteína G_s y a la fosforilación del receptor estimulada por el agonista, mientras que, la exposición por un largo periodo de tiempo resulta en una regulación a la baja en el número total de receptores y una regulación a la alta de las subunidades α de la proteína tipo G_i (Palmer et al., 1994). Las principales proteínas involucradas en mediar el proceso de fosforilación del receptor inducido por el agonista son las GRKs. Diferentes isoformas de esta enzima pueden regular la desensibilización del receptor $\text{A}_{2\text{A}}$, dentro de estas se encuentra la isoforma GRK-2. En tejidos que expresan altos niveles de GRK-2 se ha observado que una baja concentración del agonista es suficiente para inducir la desensibilización del receptor dependiente de GRK (Mundell et al., 1998). Algo curioso es que esta enzima puede ser inhibida por el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , de tal manera que un incremento en los niveles de esta molécula modificaría la desensibilización del receptor. Esta ya ha sido demostrado en células THP-sometidas a un tratamiento con TNF- α encontrando una reducción tanto en la translocación como en la asociación de la GRK-2 a la membrana plasmática previniendo así su asociación con el receptor $\text{A}_{2\text{A}}$ y mejorando su función. (Khoa et al., 2006). Por otra parte, un estudio realizado por Palmer and Stiles demostró que la treonina 298 ubicada en el dominio carboxilo terminal del $\text{A}_{2\text{A}}$ es esencial en la fosforilación del receptor inducida por el agonista y la desensibilización a corto plazo, pero no así para el proceso de desensibilización a largo plazo (Palmer and Stiles, 1997).

Receptor $\text{A}_{2\text{B}}$

El receptor $\text{A}_{2\text{B}}$ fue inicialmente clonado a partir del hipotálamo de rata (Rivkees and Reppert, 1992), del hipocampo de humano (Pierce et al., 1992) y los mastocitos de ratón (Marquardt et al., 1994) en la década de los 90s. En humano el gen del $\text{A}_{2\text{B}}$ ha sido mapeado

en el cromosoma 17p11.2-p12 (Jacobson et al., 1995; Townsend-Nicholson et al., 1995), además un solo intrón interrumpe la secuencia del gen en la región correspondiente a la segunda asa intracelular entre la Leu¹¹¹ y Arg¹¹² (Jacobson et al., 1995). La masa molecular del receptor es similar a la del A₁ y A₃, es decir de 37 KDa. (Feoktistov and Biaggioni, 1998). La estructura de membrana propuesta para el receptor A_{2B} es típica de los receptores acoplados a proteínas G, es decir siete segmentos transmembranales acoplados entre sí por tres asas intra y extracelulares, así como un dominio amino extracelular y un dominio carboxilo intracelular. Se ha notado que la estructura de los dominios transmembranales presenta un alto grado de identidad en la secuencia de aminoácidos en las diferentes especies estudiadas (Feoktistov and Biaggioni, 1997), además se ha observado que la segunda asa extracelular del A_{2B} en humano, ratón y rata contiene dos sitios potenciales de N-glicosilación (Rivkees and Reppert, 1992; Pierce et al., 1992; Marquardt et al., 1994) lo que sugiere que estas zonas podrían modular la funcionalidad del receptor, sin embargo hasta el momento los datos apuntan a que no existen diferencias significativas entre los receptores glicosilados y no glicosilados. (Feoktistov and Biaggioni, 1997). Estudios de mutagénesis realizados para determinar los componentes del receptor involucrados en el reconocimiento de agonistas y antagonistas han implicado a los aminoácidos presentes en los segmentos transmembranales 3, 5, 6 y 7 (Beukers et al., 2000; 2004).

El receptor A_{2B} de humano comparte entre el 86 al 87 % de homología en la secuencia de aminoácidos con el A_{2B} de rata y ratón mientras que con sus receptores hermanos A₁ y A_{2A} solo del 46 y 45 %, respectivamente (Sebastião and Ribeiro, 1996). Se han hecho algunas comparaciones en relación a la farmacología del receptor A_{2B} para determinar si hay diferencias en la selectividad del receptor entre las diferentes especies por un mismo agonista, como sucede en el caso del receptor A₁ en donde el agonista xanthine amine congener (XAC) es selectivo para rata pero no para humano o conejo, sin embargo las comparaciones realizadas entre fibroblastos de origen murino vs de origen humano, o entre el A_{2B} humano expresado en células CHO vs el A_{2B} del cerebro de cobayo no han arrojado diferencias significativas en el perfil farmacológico (Feoktistov and Biaggioni, 1997).

Se ha observado que el receptor a adenosina A_{2B} se expresa ampliamente en diversos tejidos y órganos que incluyen el sistema vascular, la musculatura lisa de la vasculatura

aortica, el ciego, el intestino, el cerebro y la vejiga urinaria. Altos niveles de expresión de este receptor han sido detectados en diversos tipos celulares, los cuales incluyen varias células inmunitarias como los mastocitos, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, y linfocitos; otros linajes celulares donde se expresan los A_{2B}AR son las células epiteliales alveolares tipo II, células endoteliales, células cromafines, astrocitos, neuronas y células gustativas. Cave menciona que la expresión de los A_{2B}AR se ve influenciada por diversas señales ambientales tales como inflamación, estrés y daño celular e hipoxia. Además, este receptor es altamente expresado en diversos tipos de células y tejidos tumorales promoviendo la proliferación celular tumoral, modulando la metástasis de las células tumorales y regulando el microambiente del tumor (incluyendo los vasos sanguíneos circundantes, células inmunitarias, fibroblastos y la matriz extracelular) (Ying and Pingbo, 2016). También se ha sugerido que el receptor A_{2B} podría funcionar como un regulador crítico en la Diabetes Mellitus, algunos datos apuntan a que el A_{2B} podría tener un rol pro-diabético incrementando la resistencia a la insulina y elevando la producción de mediadores inflamatorio como IL-6 y la proteína reactiva C (Figler et al., 2011). Mientras que otros revelan un papel completamente opuesto, es decir como un receptor anti-diabético (Ying and Pingbo, 2016).

Generalmente el receptor A_{2B} se encuentra acoplado a una proteína G de tipo G_{s/olf} y como anteriormente mencionamos la activación de esta conduciría a un incremento en los niveles intracelulares de AMPc y la posterior activación de la PKA (Ying and Pingbo, 2016). Otra vía de señalización a la cual el receptor puede encontrarse acoplado involucra la movilización de Ca²⁺ de almacenes intracelulares a través de una proteína G_{q/11}, adicionalmente estos receptores pueden acoplarse a las map cinasas ERK1/2, JNK and p38 (Aherne et al., 2011) y la vía de señalización del ácido araquidónico y regular canales iónicos de membrana probamente a través del dímero βγ de la proteína G. (Ying and Pingbo, 2016). Cabe mencionar que algunos datos sugieren que el acoplamiento de la proteína G al receptor es dependiente del tipo celular ya que el acoplamiento a una G_s resulta en una respuesta antiinflamatoria, mientras que a un G_q podría dar como resultado una respuesta proinflamatoria (Linden et al., 1998).

Se ha demostrado en células embrionarias de riñón humano (HEK-293) que la rápida desensibilización inducida por el agonista y la internalización del receptor A_{2B} es dependiente

de las proteínas GRK-2 y arrestina (Mundell et al., 1999), mientras que las cinasas dependientes de segundos mensajeros (PKA y PKC) no se encuentran involucradas. Se sugiere que la isoforma 3 de la arrestina mediaría de manera prioritaria el tráfico del A_{2B} que la isoforma 2 (Mundell et al., 2000). En células de estrocitoma se demostró que el TNF α reduce marcadamente la fosforilación del receptor en los residuos de treonina y atenúa la desensibilización del receptor mediada por el agonista (Trincavelli et al., 2004). Por otra parte, estudios de delección y mutaciones puntuales realizados al receptor A_{2B} clonado de rata y expresado en células CHO, revela que la Ser³²⁹ cercana al dominio carboxilo terminal es crítica para promover la rápida desensibilización inducida por el agonista y la internalización del receptor (Matharu et al., 2001).

Receptor A₃

Se aisló por primera vez como un receptor huérfano en el testículo de rata por Meyerhof et al., 1991 convirtiéndose así en el único de los cuatro subtipos de receptores a adenosina clonado antes de ser identificado. Un año después Zhou et al., 1992 identifican y clonan este receptor ya no como un receptor huérfano sino como el receptor a adenosina A₃ en el estriado de rata. Este receptor ha sido mapeado en humano en el cromosoma 1p21-p13 (Atkinson et al., 1997) con una longitud de 318 residuos aminoácidos y cuyo gen contiene 2 exones separados y un solo intrón de aproximadamente 2.2 kb (Murrison et al. 1996).

El receptor A₃ fue clonado de diferentes especies, lo que reveló que existían grandes diferencias interespecies en relación a su, por ejemplo, se encontró que el receptor clonado a partir de rata sólo presenta un 74 % de homología con el de humano y el de oveja, mientras que entre el de humano y oveja era del 85 % (Brandon et al., 2006), además presenta una homología del 40% con los subtipos A₁ y A_{2A}. En contraste con los otros subtipos de receptores, su región C terminal presenta múltiples residuos de serina y treonina, los cuales posiblemente pueden servir como sitios potenciales de fosforilación y estar involucrados en una rápida desensibilización del receptor inducida por la administración del agonista (Palmer and Stiles, 2000).

En relación a la distribución del receptor A₃ este puede encontrarse en riñón, testículos, pulmón, hígado, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, corazón y en bajos niveles en corteza cerebral, cerebelo y estriado con localización en neuronas, astrocitos y microglía (Lopes et al. 2003; Yaar et al. 2002; Borea et al., 2015). Además, el A₃ puede ser

sobre expresado en varias células neoplásicas, como en leucemia, linfoma, astrocitoma, melanoma y células tumorales pineales, mientras que en estos mismos tipos celulares bajo condiciones normales la expresión del receptor es baja o nula (Yao et al., 1997 Trincavelli et al., 2002; Merighi et al., 2001; Suh et al., 2001; Morello et al., 2008). Patrones similares de sobreexpresión han sido descritos en células inflamatorias de enfermedades como artritis reumatoide, colitis, Psoriasis y enfermedad de Crohn (Ochaion et al., 2009; Fishman et al., 2006; Madi et al., 2007). Al parecer esta sobre expresión es debida a factores que incluyen el incremento en los niveles de adenosina y citoquinas (Madi et al., 2007; Keibel et al., 2009). Tras la unión a sus receptores de superficie la adenosina puede inducir una vía autocrina de expresión de sus propios receptores. Por otra parte, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α induce la transcripción del factor NF- κ B que a su vez actúa como un factor de transcripción del receptor A₃ (Suh et al., 2001; Schlötzer-Schrehardt et al., 2005). Varios estudios han revelado que la utilización de agonistas del A₃ posee un potente efecto anti-inflamatorio mediado por la inhibición de las citoquinas pro-inflamatorias (Haskó et al., 1996; 1998; Mabley et al., 2003). Se ha encontrado que también es eficaz para combatir el crecimiento de tumores sólidos en un mecanismo que implica la modulación del TNF- α y las vías de señalización Wnt (Bar-Yehuda et al., 2008; Fishman et al., 2003; 2004). Existen datos farmacológicos de estudios *in vivo* que revelan de manera interesante, que el tratamiento crónico con agonistas de los A₃ en varios modelos animales de cáncer e inflamación no desensibiliza el receptor (Fishman et al., 2012).

El receptor A₃ se encuentra acoplado a la vía de los segundos mensajeros a través de una proteína G de tipo G_i o G_q. La activación de la primera involucra el incremento en la actividad de la AC, posterior aumento del AMPc y activación de PKA. La estimulación de la G_q implicaría la estimulación de la PLC siguiendo con la liberación de Ca²⁺ de almacenes intracelulares y la activación de la PKC. También se ha reportado que la activación del A₃ puede activar otras vías de señalización como a la proteína G monomérica RhoA y la fosfolipasa D en cardiomiocitos (Lee et al., 2001). Así mismo se ha visto que en células cardíacas dispara la activación de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) ubicados en el sarcolema mediando protección contra isquemia y daño por reperfusión (Wan et al., 2008). Además, la activación de la PKC ϵ - puede disparar la activación de la Aldehído deshidrogenasa tipo 2 (Koda et al., 2010).

El receptor A₃ también media la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), por ejemplo, en astrocitos fetales de humano se ha encontrado que el A₃ media la activación las ERK1/2 (Neary et al., 1998). Además de activar a la ERK1/2 hay evidencia experimental de que este receptor también activaría la MAP quinasa p38 en melanoma, glioblastomas y células de carcinoma de colon (Hammarberg et al., 2004; Merighi et al., 2005, 2006, 2007). Otra vía relevante asociada con la activación del A₃ es la PI3K/Akt (Merighi et al., 2003). Esto ha sido corroborado en la línea celular RBL-2H3 demostrando que la activación del A₃ dispara la fosforilación de la proteína kinasa B (Akt) protegiendo a estas células de la apoptosis; esta vía además involucra la subunidad βγ de proteína Gi y la Fosfatidilinositol 3-Kinasa beta (PI3K-β) (Gao et al., 2001).

Se ha demostrado que la administración del agonista por un periodo corto de tiempo produce una rápida desensibilización del receptor a adenosina A₃ que es mediada por miembros de la familia de las GRKs (Ferguson et al., 2000; Palmer et al., 1995). Trincavelli et al. (2002) demostraron en células de astrocitoma humano que la aplicación del agonista 2-cloro-N⁶-(3-yodobencil) adenosin-5'-N-metiluronamida (Cl-IBMECA) a corto plazo induce una rápida desensibilización del receptor seguida por su internalización dentro de 15 y 30 minutos, respectivamente. La remoción del agonista da como resultado la restauración de la función del receptor A₃ a través de su reciclaje a la superficie celular en 120 min. En cambio, la exposición a largo plazo (1-24 h) resulta en una marcada regulación a la baja el receptor, la restauración en sus niveles asociada con la recuperación en la función del receptor fue lenta (24h). Por otra parte, Palmer y Stiles en 2000 demostraron que la triple mutante Thr³⁰⁷/Ala³⁰⁷, Thr³¹⁸/Ala³¹⁸ y Thr³¹⁹/Ala³¹⁹ dentro del carboxilo terminal mostraba una marcada reducción en la fosforilación y desensibilización inducida por el agonista en el A₃ de rata, además mutaciones individuales de cada residuo mostraron que la Thr³¹⁸ y Thr³¹⁹ son los mejores sitios de fosforilación del receptor. Así mismo mostraron que el ratón mutante para 2 sitios de palmitación ubicados dentro del carboxilo terminal del A₃, la Cys³⁰² y Cys³⁰⁵ por A_{1A} presenta mayores niveles de fosforilación en ausencia del agonista en relación al Wild type (WT). Un trabajo posterior mostró que el ratón mutante Cys^{302,305}Ala^{302,305} internaliza significativamente más rápido el receptor A₃ que el WT. Esto sugiere un importante rol regulatorio de estos sitios de palmitación en la desensibilización del receptor (Ferguson et al., 2002). De igual forma se ha mostrado que la regulación del A₃ inducida por el agonista

puede ser regulada por las MAPK. Esto ha sido corroborado por Trincavelli et al., 2002, ellos mostraron que si se induce la activación del A₃ en células CHO que expresan de forma estable el receptor, éste media la activación del ERK1 / 2 dentro de los primeros 5 minutos de exposición al agonista, posteriormente expusieron a las células a un inhibidor de las MAPK quinasas (PD98059). Esto demostró deficiencias en la fosforilación, desensibilización e internalización del receptor por la inhibición en la translocación de GRK-2 desde el citosol a la membrana plasmática.

Transportadores para adenosina

Los niveles extracelulares de adenosina están regulados por un proceso bidireccional de transporte de nucleósidos, que podría servir para el mantenimiento de los nucleósidos extracelulares o para la síntesis intracelular de novo de nucleótidos (Latini and Pedata, 2001)

En la década de los 80 distintos tipos de transportadores para nucleósidos fueron caracterizados y clasificados funcionalmente en dos categorías principales: (i) transportadores de nucleósidos equilibrativos (ENTs), que transportan tanto purinas como pirimidinas a través de la membrana celular en cualquier dirección y siguiendo su gradiente de concentración; (ii) transportadores de nucleósidos concentrativos (CNTs), que median el flujo unidireccional de nucleósidos acoplados bajo la fuerza del gradiente transmembrana de Na⁺ (Thorn and Jarvis, 1996).

Los transportadores equilibrativos son clasificados con base a su sensibilidad por el inhibidor selectivo nitrobenziltioinosina (NBMPR), encontrándose dos tipos, el transportador equilibrativo sensible (*es* o ENT1) que es inhibido por el compuesto 6-S-[4-Nitrofenil) metil]-6-thioinosina (NBMPR) a concentraciones nM bajas y el transportador equilibrativo insensible (*ei* o ENT2) que es inhibido a concentraciones μM de NBMPR. Además, el transportador ENT2 tiene menor afinidad por los sustratos que el ENT1. (Thorn and Jarvis, 1996). La estructura básica de los transportadores equilibrativos constaría de 11 dominios transmembrana conectados por regiones hidrofílicas cortas, con excepción de dos grandes loops comprendidos ente los dominios transmembrana 1-2 y 6-7 y con el extremo N-terminal citoplasmático y el C-terminal extracelular (Vickers et al., 1999; Ward et al., 2003). Debido a la falta de inhibidores específicos para los transportadores concentrativos, estos han sido clasificados con base a su selectividad por el sustrato y por su estequiometría Na^+ en: CNT1 que media la entrada de nucleósidos pirimidínicos (Ritzel et al., 1997), CNT2 que transporta purinas y uridina (Ritzel et al., 1998), y el transportador CNT3 que presenta un amplio espectro de selectividad siendo capaz de transportar tanto purinas como pirimidinas (Ritzel et al., 2001). Además, los CNTs también difieren en las cantidades estequiométricas de ion Na^+ requerido por el nucleósido transportador, en este aspecto CNT3 ha demostrado necesitar dos Na^+ por nucleósido (Ritzel et al., 2001), mientras que CNT1 y CNT2 están acoplados solamente a uno (Ritzel et al., 1998). En general los transportadores concentrativos muestran una mayor afinidad por sus sustratos que los equilibrativos, con

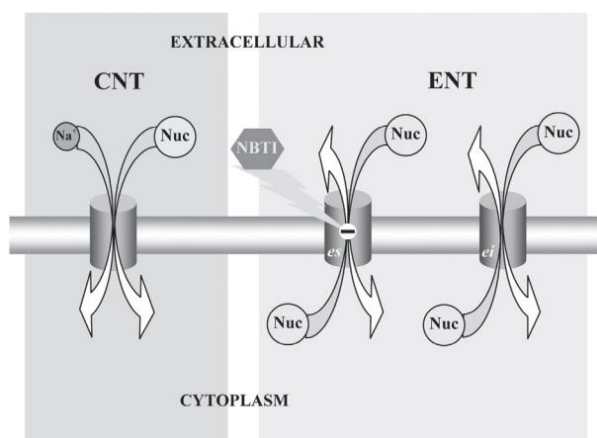


Fig. 13. Modelo del flujo de nucleósidos mediado por el transportador dependiente de Na^+ (CNT) y el transportador de nucleósidos equilibrativo. Tomado de Podgorska et al., 2005.

valores de K_m en el rango μM bajo (1-100 μM) (Saito et al, 1999). La topología predicha para los CNTS es de 13 dominios transmembrana con una N-terminal citosólica y un C-terminal extracelular. (Hamilton et al., 2001). Sin embargo, el estudio publicado por Johnson et al., (2012) muestra la estructura de cristal de CNT de *Vibrio cholerae*, el cual constaría únicamente de ocho dominios transmembranales

Receptor	Proteína G	Efectos	Agonistas	Antagonistas
A₁	G _{i/o}	↓AMPc ↑IP3 ↑K ⁺ ↓Ca ²⁺	CCPA CPA CHA Selodenoson, R-PIA GR79236 CVT-510 (Tecadenoson) SDZ WAG 994	FR194921 DPCPX BG-9719 PSB-36 BG-9928 (Toponafilina) KW3902 (Rolofilina)
A_{2A}	G _s	↑AMPc	ATL-146e (Apadenoson) CGS21680 PSB 0777 ammonium salt DPMA WRC-0470 (Binodenoson) CV-3146 (Regadenoson)	SCH-420814 VER6947 ZM-241385 SCH-442416 SCH-58261 KW6002 (Istradefilina) CSC
A_{2B}	G _{s/q}	↑AMPc ↑IP3 ↑Ca ²⁺	LUF5835 BAY 60-6583	PSB603 MRS1754 (M6316) ISAM 140 MRE 2029-F20 GS 6201 PSB-1115
A₃	G _{i/q}	↓AMPc ↑IP3	MRS3558 HEMADO CI-IB-MECA MR-S1898 IB-MECA MRS5151	PSB-10 MRE3008-F20 PSB-11 MRS1334 VUF5574 (V5 888) MRS1523 MRS1292

Tabla 1: Muestra los diferentes subtipos de receptores para adenosina, así como los antagonistas y agonistas conocidos, el tipo de proteína G al que se encuentran acoplados y el probable efecto que cada receptor genera cuando es estimulado. Tomado y modificado de Jacobson et al., 1992; Shryock and Belardinelli, 1997; Ralevic and Burnstock, 1998; Fredholm et al., 2001, 2011; Jacobson and Gao, 2006; SIGMA-ALDRICH, 2015.

ANTECEDENTES DE LA ADENOSINA EN EL SISTEMA AUDITIVO

Los primeros en aportar información sobre la existencia de los receptores para adenosina y su posible papel fisiológico en la cóclea fueron Ramkumar et al., en 1994. Utilizando membranas preparadas de la cóclea de rata demostraron que el compuesto N6-2-(4-amino-3-[125I] yodofenil) ethyladenosine ([125I] APNEA) un agonista del receptor para adenosina A₁ se unía con una alta afinidad y unión saturable. Además, utilizando la toxina pertussis, observaron una disminución significativa en la unión de APNEA al receptor, lo que indica que este receptor se encuentra acoplado a una proteína G de tipo G_{i/o}. Asimismo, para confirmar sus resultados amplificaron de un transcrito reverso de ARN del tejido coclear por reacción en cadena de la polimerasa, hibridando el producto con una sonda de cDNA de A₁ por Southern blots. Tres años después, Ford et al., (1997a) utilizando estudios de unión de radioligandos demuestran la presencia de los receptores para adenosina A₁ y A₃ en la cóclea de chinchilla, siendo los radioligandos utilizados [³H]DPCPX (antagonista selectivo para A₁) y [¹²⁵I]APNEA (agonista para A₁ y A₃). También prueban un radioligando para los receptores A_{2A} ([³H]CGS21680), sin embargo, no obtienen resultados significativos. Con la finalidad de evaluar la función de los receptores encontrados aplican *R*-phenylisopropyladenosine (*R*-PIA), un análogo no hidrolizable de adenosina, en la ventana redonda, encontrando un aumento significativo en la actividad de las enzimas antioxidantes y una reducción significativa de los niveles de malondialdehído (marcador de la peroxidación lipídica), lo que indica un posible rol citoprotector de la adenosina en la cóclea contra el daño oxidativo (Ford et al., 1997a). El mismo grupo de investigación también descubre que la aplicación de cisplatino en la cóclea de chinchillas a través de la membrana de la ventana redonda actúa como un agente ototóxico y además genera un incremento en la expresión de los receptores para adenosina (probablemente A₁ y A₃), sugiriendo que esto podría ser resultado del incremento de ROS (provocado por cisplatino) que su vez activarían al factor de transcripción NFκB (Ford et al., 1997b), por su parte Kaur et al., en 2016 propone que la activación de los A₁AR involucraría primariamente la inhibición en la generación de ROS por la vía de señalización NOX3 NADPH oxidasa y que a su vez conduciría a la inhibición del factor transcripcional STAT1 reduciendo la expresión de mediadores inflamatorios y proteínas pro-apoptóticas. Hu et al., (1997) estudiaron el efecto que *R*-phenylisopropyladenosina (*R*-PIA) ejercía sobre la cóclea de chinchilla expuesta a una banda

de octava de 4KHz a 105 dB de ruido. Midiendo el umbral de los potenciales evocados en el colículo inferior, la distorsión del producto de las emisiones otoacústicas (DPOAE) y en daño en las células ciliadas determinaron que a los 4 y 20 días después de la exposición al ruido se observaban diferencias significativas entre el control (solución salina) y el tratamiento con R-PIA, los cuales mostraban cambios menores en el valor umbral de los potenciales evocados en el colículo inferior, en las amplitudes de DPOAE que se recuperaron en mayor medida y menor pérdida de OHC. Por otra parte Ramkumar et al., (2004) realizan algo similar a Hu, solo que ellos expone a un grupo de chinchillas a una banda de octava de 4KHz a 96 dB de ruido por seis horas al día, con periodos de 18 horas sin ruido; posteriormente utilizando estudios de unión a radioligandos descubren un incremento en la expresión de los receptores A₁ para adenosina (~2 veces) poco después del primer periodo de exposición al ruido (~ dentro de las 8 horas de iniciado el ruido) que gradualmente regresa a los niveles basales aproximadamente por el día 7. Además, el incremento en la expresión de los receptores fue seguido por un aumento significativo en la concentración de malondialdehído por el día 3, que posteriormente regresó a valores normales por el día 7. Así mismo tienen resultados que indican que el incremento en la expresión de A₁ se encuentra asociado a un incremento significativo en la actividad del factor de transcripción NF-κB tras la exposición al ruido. Wong et al., (2010) estudian el efecto de la aplicación en la membrana de la ventana redonda de adenosina y agonistas para los receptores A₁ (CCPA), A_{2A} (CGS-21680) y A₃ (Cl-IB-MECA) sobre la función de la cóclea después de ser expuesta a daño por ruido, encontrando que a las 48 hrs. los umbrales de audición en el tratamiento con adenosina o CCPA se recuperan parcialmente, mientras que con CGS-21680 y Cl-IB-MECA esto no sucedió. Por su parte en 2010 Vlajkovic et al., someten a un grupo de ratas winstar a un tratamiento con ruido de banda corta (por 24 hr) con la finalidad de provocar daño coclear y pérdida auditiva para una vez terminada la exposición al ruido administrarles intraperitonealmente el agonista ADAC (selectivo para el A₁AR) en diferentes lapsos de tiempo (6hr, 24hr o múltiples inyecciones) encontrando una recuperación en los umbrales de las respuestas auditivas del tallo encefálico (ABRs), observándose la mayor recuperación en el grupo que recibió múltiples inyecciones. Asimismo, mediante un análisis histológico del órgano de Corti determinaron que el grupo tratado con ADAC presenta una conservada morfología celular; además al realizar el análisis cuantitativo de las células ciliadas perdidas

el grupo tratado con el agonista mostro solo un 9% y 7 % de células ciliadas perdidas en la vuelta coclear media y basal, respectivamente, en comparación con el 23% y 34 % del control. Estos resultados permiten concluir que el agonista ADAC mitiga el daño coclear y la pérdida auditiva generada por la exposición a niveles traumáticos de ruido. Tabuchi et al., (2012) estudian el efecto protector de los antagonistas 2-cloro-N⁶-ciclopentiladenosina (CCPA) y 5'- N -ciclopropil- carboxamidoadenosina (CPCA) de los receptores A₁ y A_{2A}, respectivamente, sobre la excitotoxicidad en las dendritas cocleares aferentes. Para ello KA sobre la membrana de la ventana redonda a una concentración 10 Mm por 30 minutos para generar la excitotoxicidad y posteriormente aplican el fármaco a estudiar. Ellos descubren que el agonista CCPA inhibe los cambios que KA induce sobre el umbral del potencial de acción compuesto y la hinchazón de las dendritas aferentes cocleares, mientras que CPCA no afecta la excitotoxicidad inducida por KA.

La presencia de los transportadores para adenosina en la cóclea (de rata) fue estudiada por Khan et al., (2007) utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), encontrando transcritos de ARNm para dos transportadores de nucleósidos equilibrativos (ENR1 y ENT2) y dos concentrativos (CNT1 y CNT2). También observaron que la aplicación exógena de adenosina en el compartimiento perilinfático era captada por las células que se encontraban dentro del mismo y que esta captación podía ser inhibida al aplicar nitrobeniltioinosina (un bloqueador de la recaptura de adenosina).

En 2007, Vlajkovic et al., lograron caracterizar y describir la distribución de los receptores para adenosina en la cóclea de rata. Utilizaron la técnica de RT-PCR y detectaron transcritos de ARNm para los cuatro subtipos de receptores (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃), mientras que su distribución fue por medio de histoquímica inmunoperoxidasa y microscopía confocal de inmunofluorescencia. Los receptores se encontraron expresados de manera diferencial en el órgano de Corti, las neuronas del ganglio espiral, el tejido de las paredes laterales y los vasos sanguíneos cocleares. 4 años después Vlajkovic y su grupo de investigación estudiaron el rol de la señalización adenosinérgica en la pérdida auditiva relacionada con la edad (ARHL) al microinyectar un inhibidor selectivo de la adenosin kinasa (ABT-702) en un grupo de ratones de la cepa C57BL/6J (altamente sensibles al ruido) comenzado el tratamiento a los 3 o 6 meses concluyendo a la edad de 9 meses descubriendo que los ratones tratados presentan

mejores valores umbrales de las respuestas auditivas del tallo encefálico para 10 Hz y 16 KHz así como también una mayor supervivencia de las células ciliadas en el giro apical de la cóclea sugiriéndose que la ARHL puede ser mitigada por un incremento en la señalización adenosinérgica en la cóclea. Ya para 2016 utilizando ratones knockout ($A_1AR^{-/-}$ and $A_{2A}AR^{-/-}$) examinan el rol de los A_1AR y $A_{2A}AR$ en el desarrollo del daño neural inducido por ruido (8–16 kHz, 100 dB SPL por 2 hrs.) en la cóclea. Ellos encuentran que tanto los ratones knockout como los controles (wild type) experimentan pérdida auditiva, de OHC, de sinapsis en cinta y de neuronas del ganglio coclear (GC), Sin embargo, determinan que el knockout $A_1AR^{-/-}$ muestra una pérdida auditiva superior, con predilección a las altas frecuencias, así como una mayor pérdida neuronal en el GC mientras que el $A_{2A}AR^{-/-}$ exhibe una preservación superior de OHC y una pérdida mínima de neuronas del GC.

Con la vasta información anteriormente descrita, y considerando los antecedentes al respecto en nuestro laboratorio, nos planteamos la justificación del presente trabajo.

JUSTIFICACIÓN.

Los compuestos purinérgicos, como el adenosín trifosfato (ATP) y la adenosina participan en procesos de neurotransmisión y neuromodulación. En nuestro laboratorio existen antecedentes que demuestran que la activación de los receptores P2 por ATP y sus análogos, generan cambios en la frecuencia de descarga de las aferentes vestibulares y auditivas durante el desarrollo embrionario del pollo, siendo el efecto dependiente de la edad y de la concentración administrada (Galindo et al., 2013). Existe una amplia evidencia de que la adenosina es primordialmente formada a partir del ATP, mediante la participación de diferentes enzimas, por lo que estos compuestos se encuentran ampliamente vinculados y regulan múltiples procesos fisiológicos y fisiopatológicos, razón por la cual, si un sistema responde a la administración de ATP, es muy probable que también lo haga a la adenosina.

Existen reportes en la literatura que brindan evidencias con respecto a la presencia de los receptores para adenosina en diferentes regiones de la cóclea de los mamíferos, así como de las enzimas que participan en su formación (Ramkumar et al., 1994, 2004; Ford et al., 1997a, 1997b; Hu et al., 1997; Khan et al., 2007; Vljakovic et al., 2007; Wong et al., 2010; Tabuchi et al., 2012). La adenosina en diferentes partes del sistema nervioso tiene un importante papel en la regulación presináptica de la liberación de glutamato, este aminoácido es considerado el principal neurotransmisor aferente en el oído interno, lo cual nos permite especular que la adenosina podría estar modulando su liberación desde la célula ciliada y de esta forma modificaría la frecuencia de descarga de las aferentes auditivas. De igual forma, hay antecedentes que sugieren que la adenosina podría tener mayor significancia funcional durante el desarrollo que en el sistema nervioso adulto, lo que incrementa el interés por su estudio en una preparación como la que trabajamos. Hasta este momento no se han realizado estudios que evalúen al papel que desempeña la adenosina sobre la actividad eléctrica de las aferentes auditivas durante el desarrollo embrionario ni de la presencia y localización de sus receptores en la papila basilar del pollo.

Por todo lo anterior, consideramos que este trabajo es novedoso y nos permitirá conocer si la adenosina se encuentra participando en la neuroquímica de la papila basilar del pollo durante el desarrollo embrionario.

HIPOTESIS

La adenosina es un modulador de la actividad eléctrica espontánea de las neuronas aferentes auditivas de la papila basilar del pollo durante el desarrollo embrionario.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de la adenosina sobre la actividad eléctrica espontánea de las neuronas aferentes auditivas de la papila basilar del pollo durante el desarrollo embrionario e identificar a los subtipos de receptores involucrados.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Estudiar la acción de Adenosina sobre la actividad eléctrica espontánea y sobre los patrones de descarga de las aferentes auditivas de la papila basilar del pollo durante el desarrollo embrionario (E15, E18 y E21).

2.- Estudiar la acción de cafeína y teofilina (antagonistas inespecíficos de los subtipos de receptores a adenosina) sobre la actividad eléctrica espontánea de las aferentes auditivas de la papila basilar del pollo y sobre la respuesta de éstas a la aplicación de adenosina en la(s) edad(es) relevantes de acuerdo a la curva dosis-respuesta-edad obtenida (objetivo 1).

3.- Estudiar la participación de los receptores a adenosina (A_1 , y A_{2A} ,) en la actividad eléctrica espontánea y sobre los patrones de descarga de las aferentes auditivas de la papila basilar del pollo mediante el empleo de los agonistas CCPA y PSB 0777 ammonium salt.

4.- Determinar el ARNm para los subtipos de receptores a adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 tanto en el epitelio sensorial como en el ganglio coclear de la papila basilar del pollo en las edades embrionarias E15 y E21, mediante la técnica de RT-PCR.

METODOLOGIA

Modelo experimental

Se emplearon embriones de pollo de la especie *Gallus domesticus* libres de patógenos específicos, obtenidos de la avícola ALPES (Tehuacán, Puebla). Las edades embrionarias empleadas fueron de 15, 18 y 21 días, con base en los criterios de Hamburger y Hamilton (1951). Los embriones se mantuvieron en incubación bajo un control estricto de temperatura 38.5°-39.5°C y humedad relativa del 60% en una incubadora Precision Compact 0.67 Cu. Ft. (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Solución para los registros extracelulares unitarios

Se utilizó solución Ringer para ave con la siguiente composición en mM: 124 NaCl; 5 KCl; 2.2 NaH₂PO₄; 2 CaCl₂; 26 NaHCO₃; 2 MgSO₄; Glucosa 10 (Peusner y Giaume, 1997). La solución fue burbujeada con gas carbónico (95 % de oxígeno y 5% de CO₂, INFRA) durante 10 minutos con la finalidad de saturarla de oxígeno y ajustar el pH entre 7.3-7.4.

Disección

Antes de comenzar la disección el embrión fue anestesiado por disminución de la temperatura corporal durante 20 minutos (Peusner y Giaume, 1997). Posteriormente se extrajo del cascarón separándolo de las membranas embrionarias que lo envuelven y decapitándolo rápidamente. Se retiró el maxilar inferior y parte del cerebro para disminuir la presión intracraneal y facilitar la disección. La preparación inmediatamente fue colocada en una cámara de disección con solución Ringer, burbujeada con gas carbónico. Con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon, Inc. USA) se retiraron los tejidos blandos de paladar y el hueso palatino debajo del cual se encontraba la lagena y la papila basilar, acto seguido se expuso el tallo cerebral y disecó el nervio auditivo. Finalmente, se procedió a separar la cápsula ótica del resto del cráneo y a colocarla en una cámara de registro ubicada sobre una mesa antivibratoria (Micro-g 63-563, TMC) donde fue perfundida a una velocidad aproximada de 1.5 ml por minuto con solución Ringer burbujeada con gas carbónico, a una temperatura constante de 37° C mantenida a través de un controlador de temperatura (TC-102 de Medical System Co USA). Todo el procedimiento desde que se extrajo al embrión del cascarón hasta el montaje de la preparación en la cámara de registro se llevó a cabo en un lapso no mayor a 15 minutos para disminuir al máximo el daño en la papila basilar.

Técnica de registro

Para registrar la actividad eléctrica de las aferentes primarias que inervan la papila basilar se empleó el registro extracelular unitario, para ello se utilizó un amplificador Duo 773 (World Precision Instruments, Inc.) y un amplificador AC (P-511. Grass). Se utilizaron electrodos de brosilicato llenados por capilaridad con una solución 2M de NaCl y resistencias de entre 25 y 50 MΩ (P-97 Micropipette Puller, Sutter Instruments Co.). Las respuestas de las fibras aferentes del nervio ante distintas drogas, así como su actividad basal salidas del amplificador fueron observadas en un osciloscopio (Tektronix 2201), capturadas mediante el programa computacional AxoScope 8.2 (Axon Instruments, USA) con ayuda de un conversor A/D (Digidata 1322A, Axon Instruments, USA) y grabadas para su procesamiento fuera de línea.

Fármacos utilizados

Los fármacos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich y Tocris, México y administrados por perfusión en el baño (10 ml). Cabe mencionar que antes de administrar el fármaco se tomaron dos minutos control.

Agonistas de los receptores purinérgicos P1

- ❖ **Adenosina**
- ❖ **CCPA: 2-cloro-N6-ciclopentiladenosina**
- ❖ **PSB 0777 ammonium salt:** 4-[2-[(6-Amino-9-b-D-ribofuranosyl-9H-purin-2-yl)thio]ethyl] benzenesulfonic acid ammonium salt

Antagonistas de los receptores purinérgicos P1

- ❖ **Cafeina**
- ❖ **Teofilina**

TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Extracción del ARN

A partir de las muestras obtenidas de la papila basilar y el ganglio coclear del oído interno de pollo se procedió a realizar la extracción del ARN empleando un Kit comercial (Quick-RNA™ MiniPrep) y siguiendo las instrucciones del fabricante, se resumen a continuación el procedimiento: 1) las muestras obtenidas se colocaron, según la edad embrionaria y el

componente del oído interno al que correspondían (papila o ganglio) en tubos ependorf que contenían 500 µl de buffer de lisis, 2) se homogenizó la muestra utilizando un Ultra-sonicador de punta, 3) el homogenizado se transfirió a una primera columna de separación (blanca) contenida en un tubo colector y fue centrifugado a 13200 rpm por 3 min, 5) se colectó el sobrenadante y realizó una dilución 1 a 1 con etanol al 70 % , el producto de la dilución se transfirió a una segunda columna de separación (roja) contenida en un nuevo tubo colector y se repitió el mismo ciclo de centrifugación desechando el sobrenadante, 4) se adiciono 400 µl de buffer de pre-lavado a la columna de separación y procedió a centrifugar con los mismos parámetros desechando el sobrenadante, 5) se realizaron dos lavados más adicionado 400 de buffer de lavado repitiendo el paso de centrifugación y eliminando el sobrenadante, 6) las columnas de separación se transfirieron a tubos para elución tipo ependofr de 1.5 ml libres de ARNasas y se procedió a agregar al interior de la columna 35 µl de agua libre de ARNasas con la finalidad de eluir el ARN contenido en el filtro de la columna. Una vez finalizada la extracción procedimos a determinar la calidad y cantidad de ARN por medio de espectrofotometría considerando un ARN de calidad cuando su cociente 260/280 estuviera en el rango de 1.6 a 2.0 en unidades arbitrarias de absorbancia y con cantidad suficiente cuando como mínimo obtuviésemos 170 µg/ml. Las muestras se mantuvieron bajo congelación a -20 ° c por un tiempo máximo de un mes siempre y cuando no se sometiesen a ciclos de congelado y descongelado. Antes de proceder a realizar la Transcripción Reversa se determinó nuevamente la cantidad y calidad del ARN.

Transcripción Reversa (RT)

Este paso consistió en sintetizar una cadena complementaria de ADN (ADNc) a partir del ARN aislado a través de la enzima Transcriptasa reversa. Para realizar la RT se utilizó el kit High Capacity Cdna Reverse Transcription (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de los datos obtenidos por la cuantificación del ARN aislado se prepararon tubos de reacción de 20 µl cada uno de los cuales al final del procedimiento contendría 2 µg de ARN por condición; el tipo de reactivo y la cantidad del mismo agregada a cada tubo de reacción se resumen a continuación:

TIPO DE REACTIVO	CANTIDAD
Bufer RT	4.0 µl
Transcriptasa reversa	0.5 µl
DNTP's	1.0 µl
RANDOMS PRIMERS	2.0 µl
ARN aislado	2.0 µg
H₂O Inyectable	Vf 20 µl

Una vez finalizada la adición de los reactivos, cada uno de los tubos de reacción fueron colocados en un Termociclador aplicándose el siguiente protocolo.

1er paso: 25 ° c por 10 minutos

2do paso: 37° c por 120 minutos

3er paso: 85°c por 5 minutos

4to paso: 4°c hasta su retiro del Termociclador

Una vez retirados los tubos de reacción estos fueron Almacenados a -25 ° c hasta el día de su utilización.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez obtenido el ADNc se procedió a realizar la PCR utilizando oligonucleótidos diseñados por un software proporcionado en internet por la empresa Integrated DNA Technologies (IDT-DNA); la siguiente tabla presenta las especificaciones de cada uno de los oligonucleótidos empleados:

GENBANCK ACESES	NOMBRE	SECUENCIA 5' - 3'	TEMPERATURA ALINIAMIENTO (°C)	PARES DE BASES
NM_204316	ADORA1	Fwd:GAAGATCCCGGTCAGGTATAAG	62.5	504
		Rev:GTGAGGAAGATGGCGATGTA	62.7	
XM_004934348	ADORA2A	Fwd:CCTCCTCGCGTCTCTCTATTA	62.4	302
		Rev:CGCATCCTCTTATCCATCTCAC	64.7	
NM_205087	ADORA2B	Fwd:CCATGAGTGGTTGTCCTAACTC	62.3	710
		Rev:TACAGTGCCTAACTGCATAG	60.7	
NM_204151	ADORA3	Fwd:CTATGGGAAGGAGTTCAGGAAAG	63.9	794
		Rev:GTGTGGTTGTGTGCAAGTAAAG	62.1	
NM_205518	ACTB	Fwd:CGTGCTGTGTTCCCATCTATC	55.6	388
		Rev:CACCAGAGTCCATCACAATACC	55.2	

Para la PCR se prepararon tubos de reacción a cada uno de los cuales se les adicione los siguientes reactivos:

TIPO DE REACTIVO	CANTIDAD (µl)
Bufers Dream	10.0
Oligonucleotido Fwd	1.0
Oligonucleotido Rev	1.0
H ₂ O Inyectable	5.0
ADNc	3.0

Cada tubo de reacción para PCR tuvo un volumen final de 20 µl y dependiendo de sus temperaturas de alineamiento fueron colocados por bloques al interior del Termociclador aplicándose el siguiente protocolo:

1er paso: 94 ° c por 30 segundos para desnaturalización del ADN

2do paso: temperatura dependiente de la temperatura de alineamiento de cada oligonucleótido por 30 segundos, permite la alineación del oligonucleótido al ADNc

3er paso: 72 ° c por 60 segundos, este paso la Taq polimerasa sintetiza la nueva cadena de ADN (Extensión)

Estos pasos se repitieron durante 40 ciclos

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando una prueba ANOVA de una vía. Se consideró significativa la diferencia con una $p < 0.05$. En aquellos casos en que la diferencia fue significativa utilizamos la prueba post hoc Tukey.

RESULTADOS

En este estudio se registraron un total de 102 neuronas aferentes del ganglio coclear mediante la técnica de registro extracelular unitario con edades embrionarias de 15, 18 y 21 días, mientras que para las técnicas de biología molecular se utilizaron un total de 84 ganglios cocleares y epitelios sensoriales para E15 y E21. El total de animales utilizados en este trabajo fue de 137 de los cuales 95 fueron usados para los registros de la actividad electrofisiológica de las aferentes auditivas y el resto en los ensayos de RT-PCR.

A continuación describimos el efecto de los agonistas y el antagonista de los receptores P1 sobre la frecuencia de descarga de las aferentes auditivas. Cabe mencionar que cada preparación en promedio mostró una viabilidad de cuatro horas máximo. Además, al final de esta sección se presentan los valores densitométricos obtenidos al analizar la intensidad de las bandas alcanzadas en los ensayos de RT-PCR.

Efecto de Adenosina sobre la actividad eléctrica basal de las aferentes auditivas

Para evaluar la posible participación de los receptores a Adenosina en la neuroquímica auditiva decidimos administrar el agonista inespecífico Adenosina (1 μM , 10 μM y 100 μM) en las edades embrionarias de 15, 18 y 21 días ($n=30$) encontrando que este provoca un incremento en la frecuencia de descarga de las aferentes auditivas, siendo la magnitud de dicho efecto dependiente de la edad del animal y de la concentración. Observamos la máxima respuesta en las preparaciones de 21 días (1 μM : 62.85 ± 1.48 %; 10 μM : 140.19 ± 18.90 %; 100 μM : 178.79 ± 3.91 %). En E18, adenosina generó un incremento en la frecuencia de descarga de las aferentes auditivas observándose el mayor efecto a la concentración de 100 μM (123.86 ± 9.87). Adenosina provocó un incremento en la frecuencia de disparo de las aferentes no significativo estadísticamente en las preparaciones de E15 (10 μM : 10.87 ± 3.21 %; 100 μM : 17.86 ± 3.97 %).

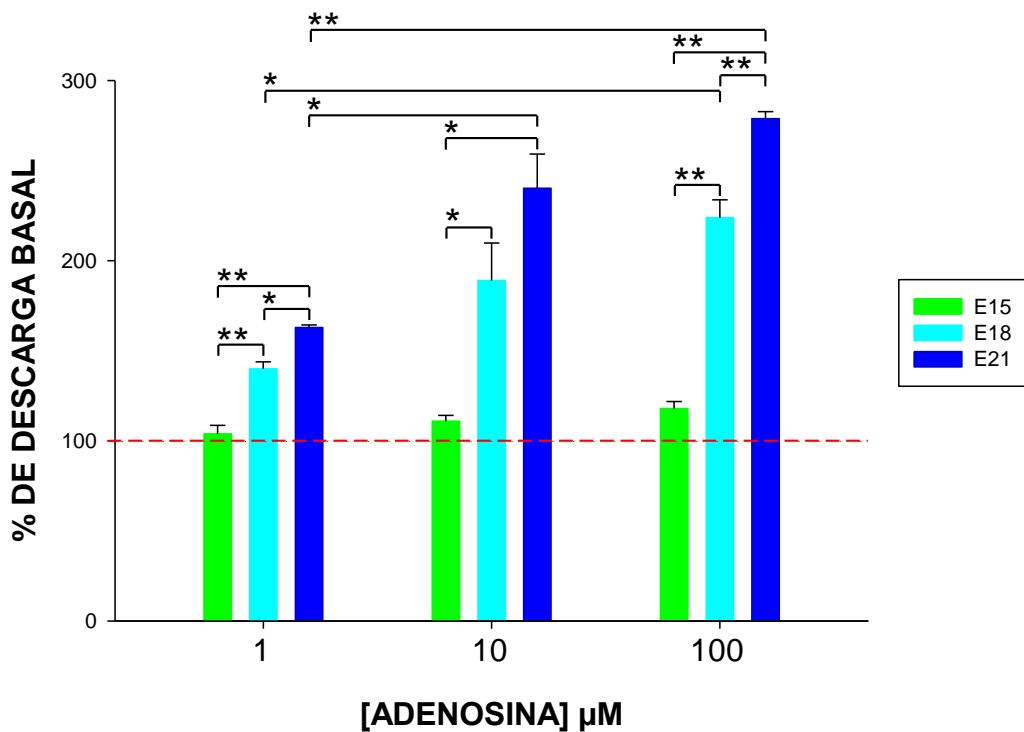


Fig. 14. Grafica de barras dosis-efecto-edad que muestra la acción de Adenosina sobre la actividad eléctrica espontánea de las aferentes auditivas con edad de 15, 18 y 21 días embrionarios. Se observa que la acción de Adenosina fue excitadora en todas las edades estudiadas y que la respuesta de las aferentes auditivas fue siempre mayor en E21 observándose la mayor respuesta con 100 μM , mientras que en E15 a cualquier concentración administrada la respuesta siempre fue de menor magnitud. Cada barra corresponde por lo menos a 3 experimentos. La línea punteada refiere el 100 % de la actividad control. (* $p < 0.05$; ** $p \leq 0.001$)

Durante un experimento típico en E21 se observa un incremento en la frecuencia de descarga de la aferente auditiva registrada tras la perfusión en el baño de Adenosina 100 μM y cuyo efecto es reversible posterior a 10 minutos de lavado de la preparación con solución Ringer para ave. A continuación mostramos un ejemplo de ello

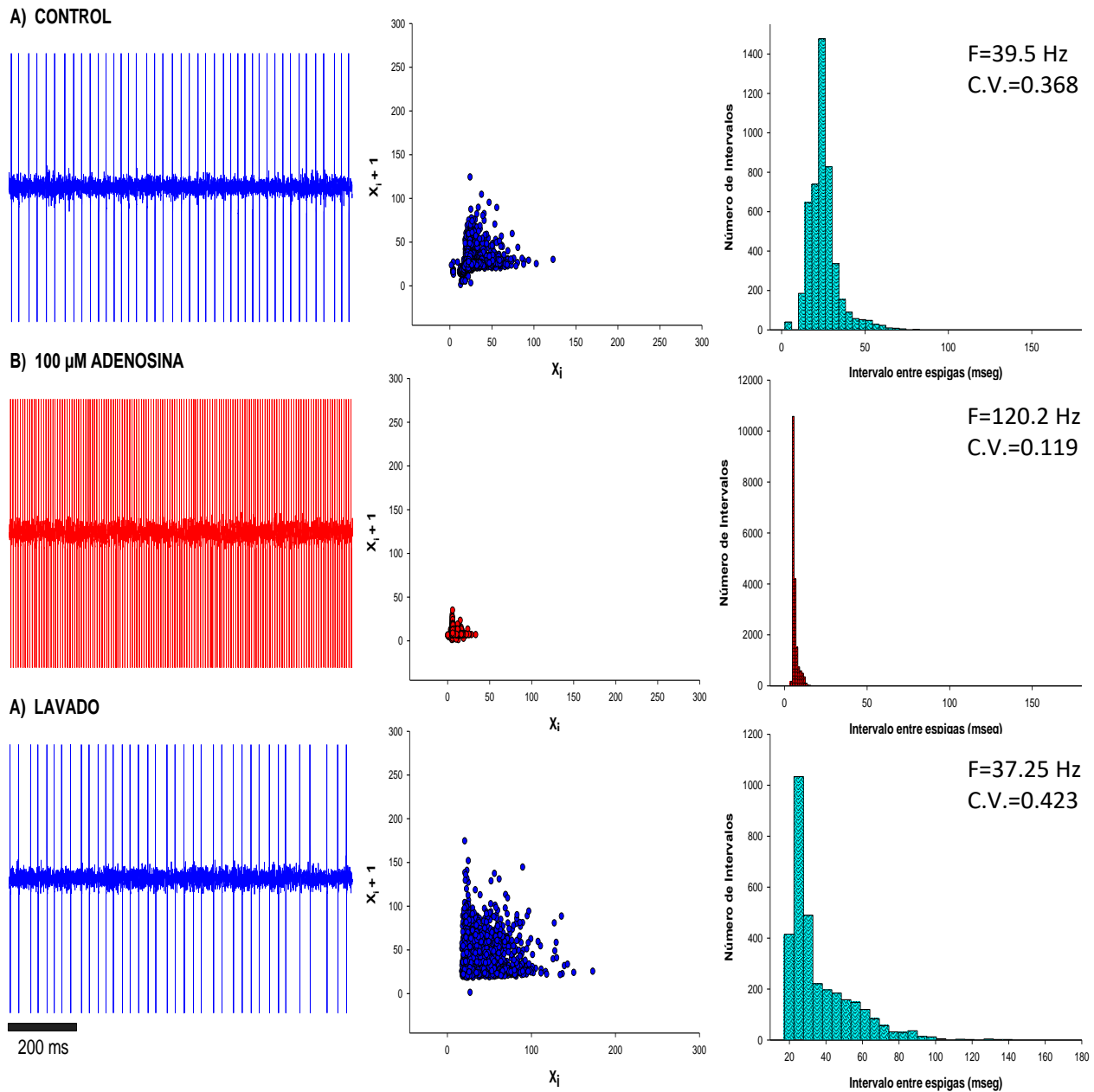


Fig. 15. Registro extracelular unitario de una neurona aferente de la papila basilar de un embrión de pollo de 21 días de edad. De izquierda a derecha se muestra la actividad eléctrica espontánea de la neurona aferente; diagrama de Poincaré e histograma del intervalo entre espigas que esquematizan el patrón de disparo de la misma. A) Registro de una neurona aferente bajo condiciones basales. B) Registro de una neurona durante la administración de Adenosina 100 μM en donde puede observarse un incremento en la frecuencia de disparo y en su regularidad. En el diagrama de Poincaré e histograma podemos observar que los datos tienden a concentrarse en un punto, lo que indica una modificación en el patrón de disparo, lo cual contrasta con la dispersión observada en condiciones control y de lavado. C) Registro electrofisiológico de la actividad eléctrica de la neurona tras 10 minutos de lavado. Puede observarse una reversión del efecto de la droga.

Además de evaluar los cambios en la frecuencia de descarga de las aferentes auditivas decidimos también hacer un análisis de los cambios en el patrón de disparo de las neuronas registradas antes y durante la administración del agonista. Tras la administración de adenosina encontramos que esta modifica el patrón de descarga de las neuronas hacia valores más regulares, sin embargo, solo en las preparaciones de E21 el patrón de disparo paso de ser irregular (> 0.5) a regular (< 0.5) a las concentraciones de 10 y 100 μM .

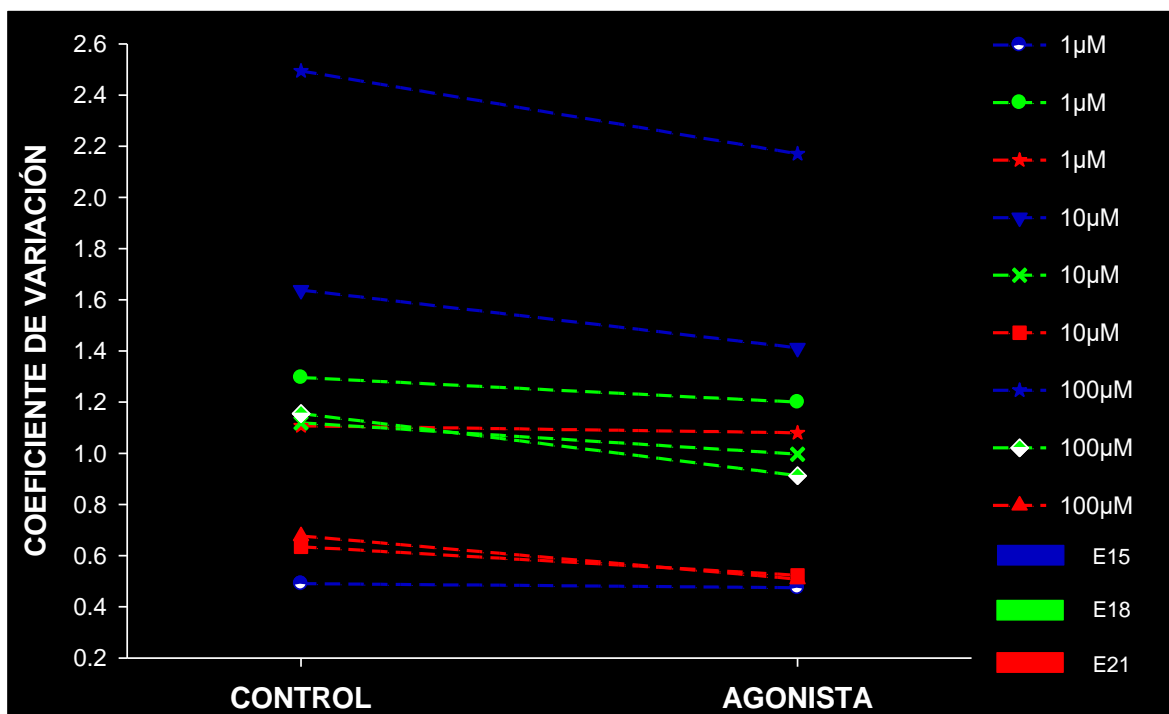


Fig. 16. Grafica de los coeficientes de variación del intervalo entre espigas correspondientes a las concentraciones de adenosina administradas (1, 10 y 100 μM) en las diferentes edades embrionarias (E15, E18 y E21). Se correlaciona C.V. promedio de la actividad eléctrica espontánea (CONTROL) contra el C.V. promedio tras la administración de la droga (AGONISTA). Cada símbolo denota la administración de una concentración diferente mientras que los colores hacen énfasis en la edad del embrión a la cual la droga es administrada. Podemos observar una tendencia del C.V. hacia la regularidad de la descarga tras la aplicación de Adenosina.

Para corroborar que la respuesta de incremento de frecuencia de disparo de las neuronas aferentes auditivas de la papila basilar de pollo observado con adenosina era precisamente por acción de ésta a través de algunos de sus receptores, decidimos estudiar el efecto que tendría la administración de antagonistas inespecíficos de éstos (cafeína y teofilina) sobre la acción excitadora de adenosina.

Encontramos que cafeína 100 μM (n=3) produjo una acción inhibitora sobre el incremento por adenosina en la frecuencia de descarga de las aferentes auditivas. Para esta sección experimental sólo empleamos embriones de 21 días, ya que fue donde se encontró mayor respuesta a adenosina (ver curva dosis-respuesta-edad) a una concentración de 100 μM (162.44 ± 1.64), mientras que en presencia de cafeína la acción de adenosina decrementó a 103.14 ± 8.13 , lo que significa un decremento del 36.5 %.

En los experimentos en los que administramos teofilina 100 μM (n=4), observamos al igual que con cafeína, una acción inhibitora pero de menor magnitud sobre la respuesta de las aferentes auditivas a adenosina (162.44 ± 1.64 vs. 112.36 ± 11.59), que significó un decremento del 30.82 % (figura 17).

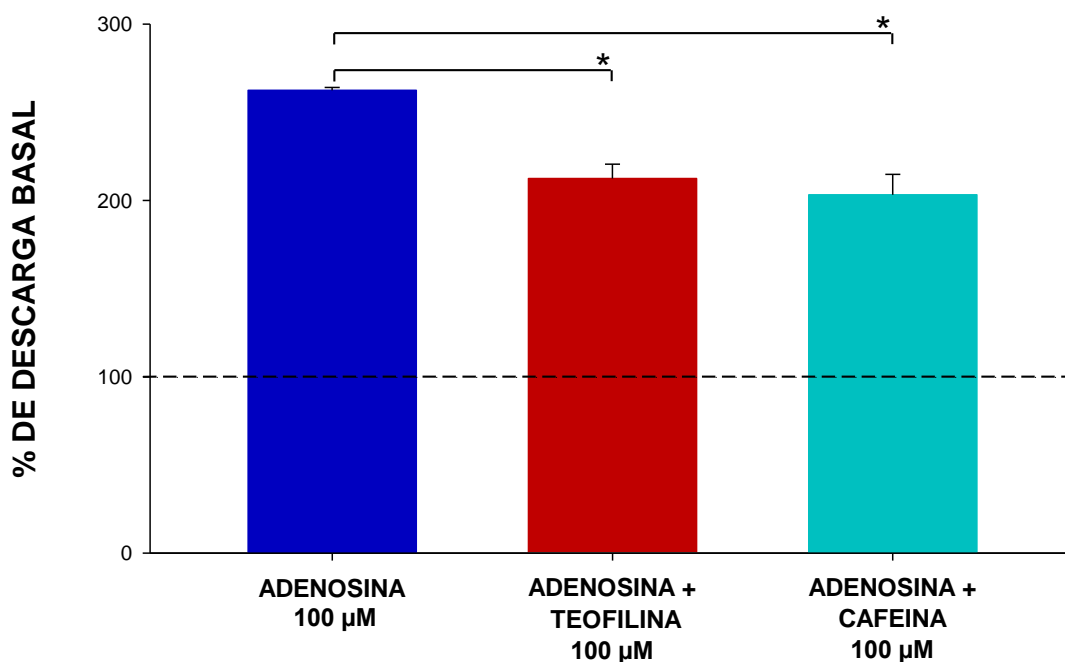


Fig. 17. Gráfica que muestra el efecto inhibitora estadísticamente significativo de los antagonistas cafeína y teofilina sobre la acción de adenosina 100 μM ($p < 0.5$).

Con la finalidad de evaluar la contribución individual de los receptores a Adenosina decidimos utilizar agonistas específicos para dos de ellos, el A₁ y A_{2A}.

Efecto de CCPA sobre las aferentes auditivas.

Estudiamos el efecto de CCPA (agonista de receptor A₁) en un rango de concentraciones de 1, 10 y 100 μM en E15, E18 y E21 (n=35), a través de su perfusión en el baño de la preparación. Como se muestra en la figura 18, CCPA incrementó la frecuencia de descarga de las aferentes auditivas y la magnitud de dicho efecto fue dependiente de la edad del animal y la concentración administrada, observándose la respuesta máxima en las preparaciones de 21 días de edad (1 μM : $10.84 \pm 6.97\%$; 10 μM : $94.08 \pm 16.4\%$; 100 μM : $132.13 \pm 15.14\%$). En E18, CCPA también tuvo un efecto excitador sobre la actividad eléctrica de las aferentes auditivas, predominando con 10 y 100 μM , donde el incremento en la frecuencia de descarga basal fue de $37.84 \pm 10.73\%$ y $80.77 \pm 7.15\%$ respectivamente. Cabe mencionar que el efecto de CCPA resultó estadísticamente significativo a la concentración de 100 μM en comparación con 1 y 10 μM . Con respecto a E15, los cambios en la frecuencia de descarga de las aferentes auditivas por CCPA fueron mínimos con todas las concentraciones probadas, por lo que no resultaron estadísticamente.

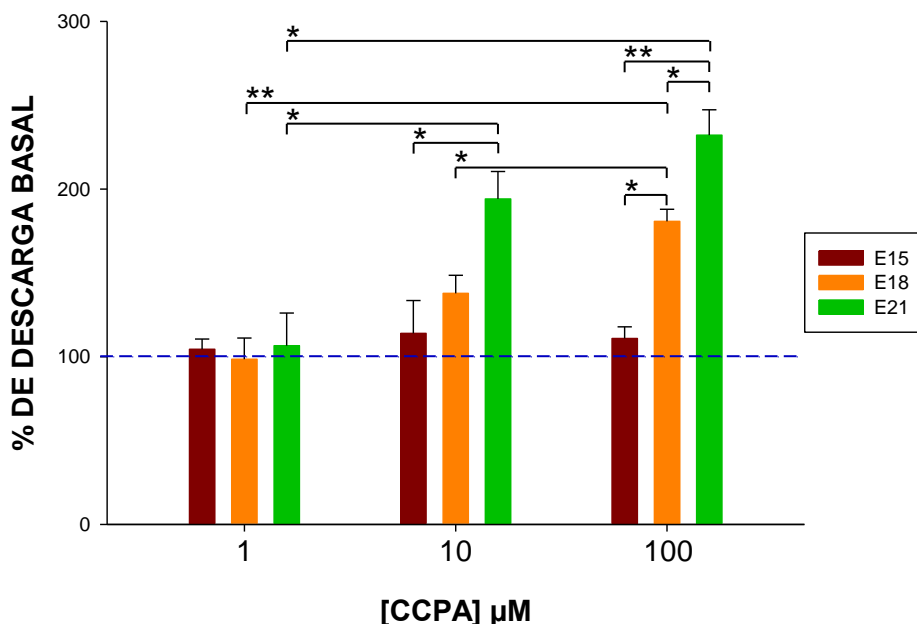


Fig. 18. Grafica dosis-efecto-edad que muestra la acción de CCPA sobre la actividad eléctrica espontánea de las aferentes auditivas en E15, E18 y E21. Podemos observar que la acción de CCPA fue excitadora en todas las edades estudiada, excepto en E18 a la concentración de 10 μM y que la respuesta de las aferentes auditivas fue siempre mayor en E21 y E18 a la concentración de 100 μM . En E15 no se observaron incrementos de frecuencia en la actividad espontánea significativos con ninguna de las concentraciones usadas. Cada barra corresponde por lo menos a 3 experimentos. La línea punteada refiere el 100 % de la actividad control. (* $p < 0.05$; ** $p \leq 0.001$).

A continuación mostramos un ejemplo del incremento en la frecuencia de descarga de la aferente auditiva registrada tras la administración por perfusión en el baño de CCPA.

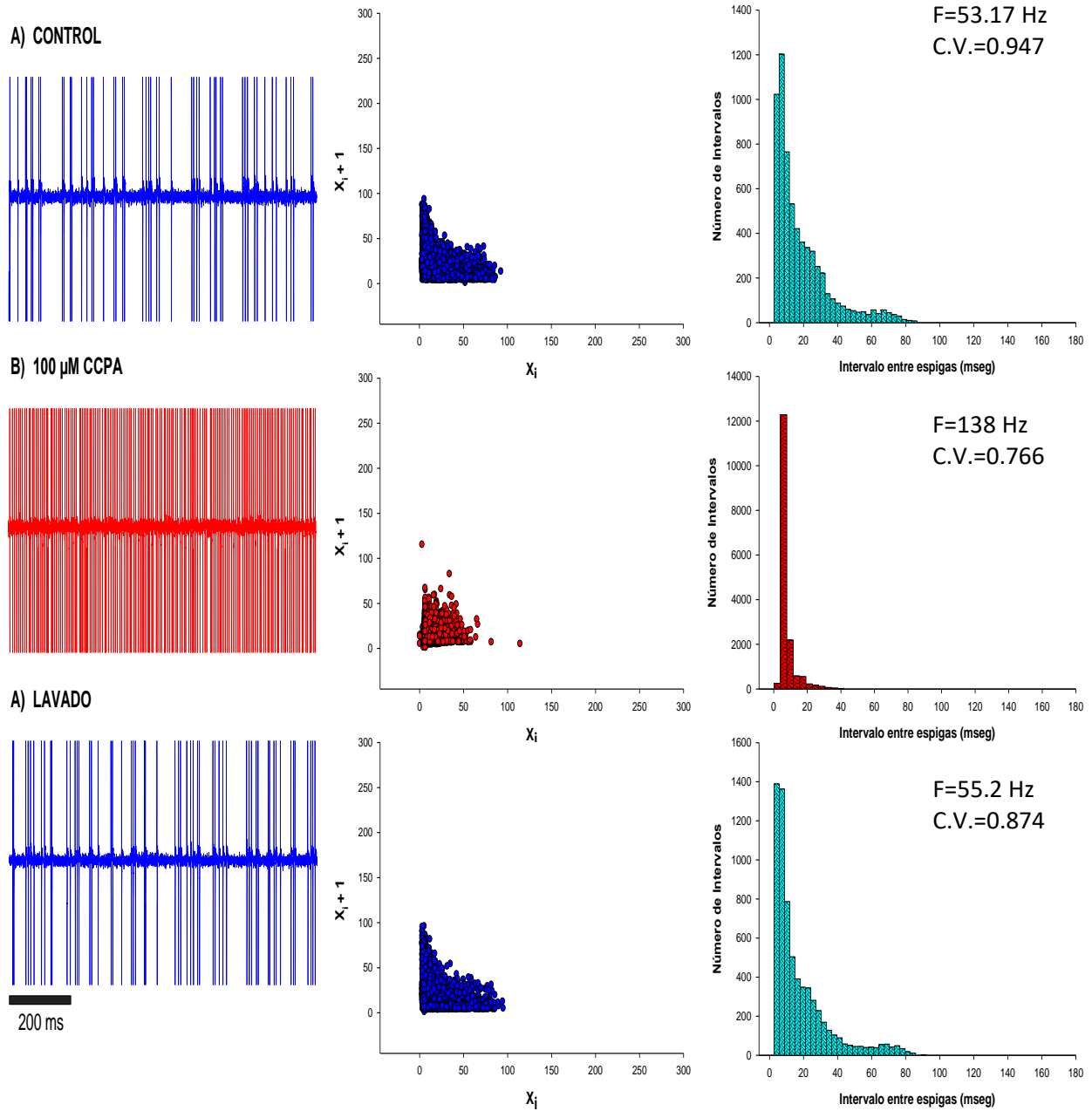


Fig. 19. Registro extracelular unitario de una neurona aferente de la papila basilar de un embrión de pollo de 21 días de edad en el cual podemos observar claramente el incremento en la frecuencia de descarga provocada por la administración de CCPA 100 μM, además en el diagrama de Poincaré e histograma del intervalo entre espigas se puede observar que se genera una ligera modificación en el patrón de descarga de la neurona, volviéndose aún más regular. El efecto del agonista fue revertido parcialmente tras 10 minutos de lavado con solución Ringer.

En relación a los patrones de descarga de las aferentes auditivas tras la administración de CCPA podemos observar que en la edad de E21 el coeficiente de variación tiene a volverse más regular, principalmente en 10 y 100 μM . Sin embargo, sólo a la concentración de 10 μM se observó un claro cambio de patrón de descarga irregular a regular (C.V.= 0.66 vs. C.V.= 0.44). En lo que respecta a E18, la tendencia hacia la regularidad de la actividad eléctrica también es observada con las diferentes concentraciones empleadas. Es importante destacar que en E15 no se observó cambio en el C.V. con ninguna de las dosis administradas (figura 20).

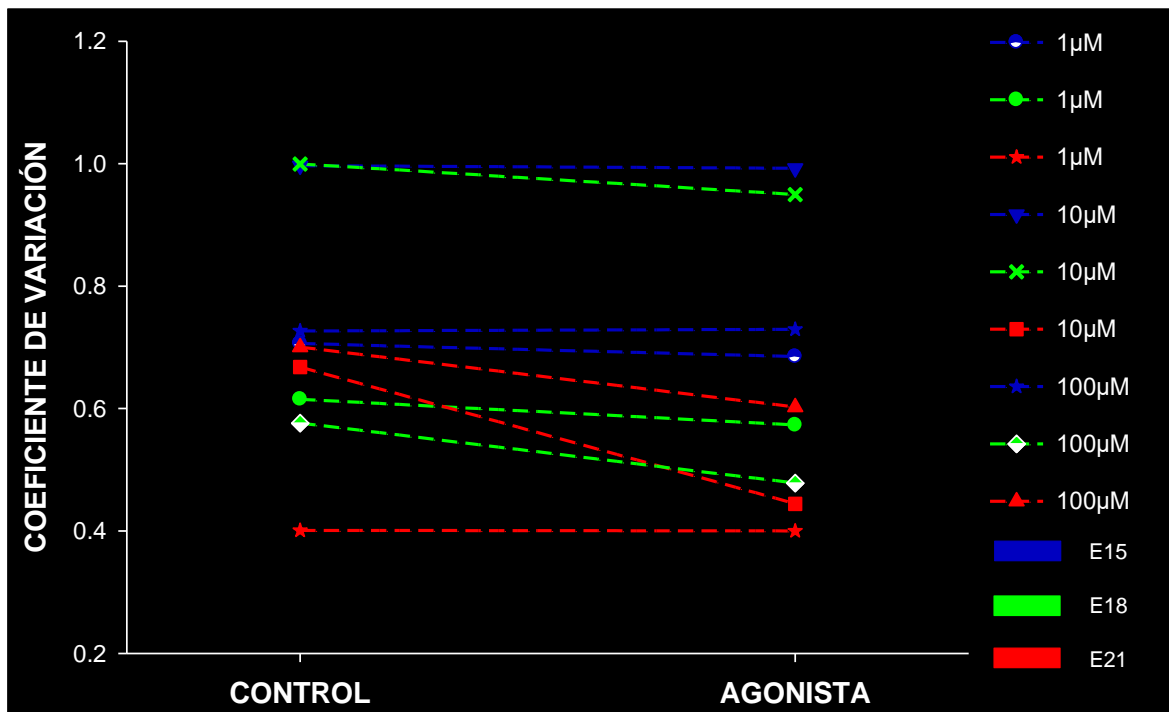


Fig. 20. Grafica que ilustra los cambios de los coeficientes de variación del intervalo entre espigas tras la administración de 1, 10 y 10 μM de CCPA en E15, E18 y E21. Relacionamos el C.V. de la actividad eléctrica espontánea (CONTROL) vs el obtenido tras la aplicación de la droga (AGONISTA). Se aprecia una ligera tendencia del coeficiente de variación hacia valores más pequeños excepto en las preparaciones de 15 días.

Efecto de PSB 0777 Ammonium salt sobre las aferentes auditivas

Con la finalidad de estudiar de manera aislada la participación de receptor A2A sobre la actividad eléctrica de las aferentes auditivas decidimos administrar el agonista selectivo PSB 0777 Ammonium salt en un rango de concentraciones de 1, 10 y 100 μM en las edades embrionarias de 15, 18 y 21 días ($n=30$; figura 21). Encontramos que este agonista genera un ligero incremento en la frecuencia de descarga de las aferentes auditivas en E21 (1 μM : 15.12 ± 11.78 %; 10 μM : 16.31 ± 2.74 %; 100 μM : 20.69 ± 0.20 %) mientras que para E18 únicamente se observa efecto a las concentraciones 10 y 100 μM , en las cuales el incremento en la frecuencia de descarga basal fue de 12.39 ± 5.38 % y 18.09 ± 4.48 %, respectivamente. En las preparaciones de 15 días no se observó efecto excitador al administrar la concentración más baja (0.35 ± 2.03 %). Sin embargo, al realizar el análisis estadístico del efecto de PSB 0777 Ammonium salt sobre las aferentes auditivas en las tres edades estudiadas este no fue significativo.

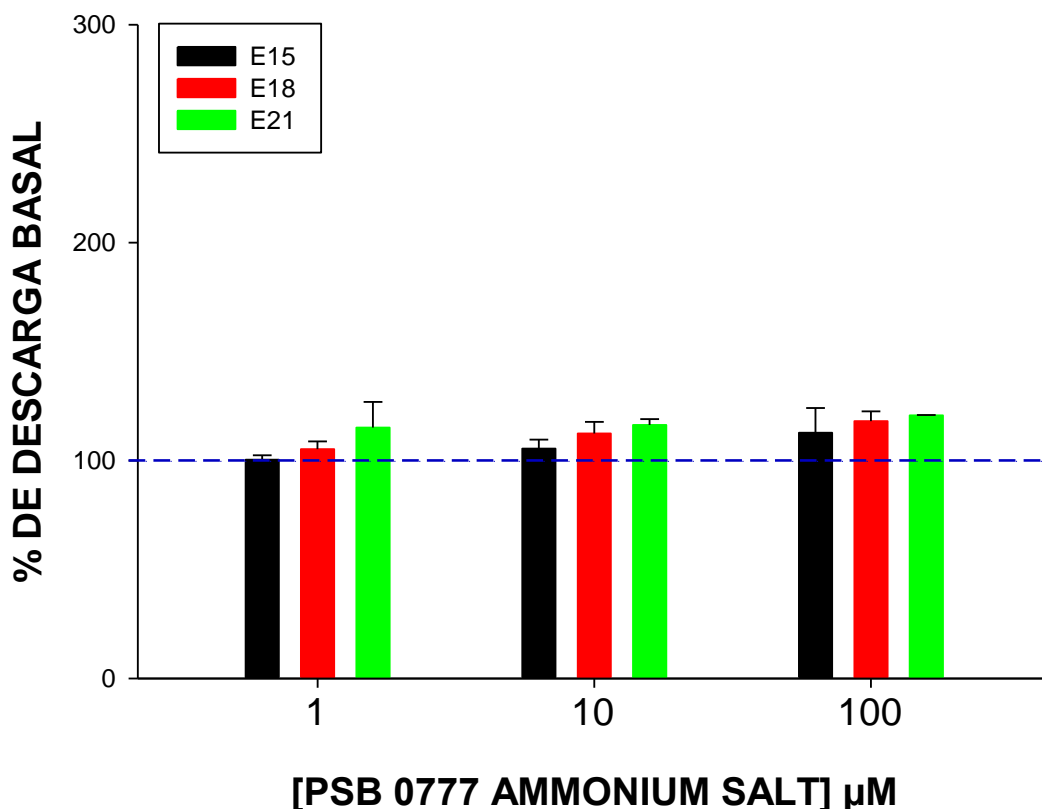


Fig. 21. Gráfica dosis-efecto-edad que muestra la acción de PSB 0777 Ammonium salt sobre la actividad eléctrica espontánea de las aferentes auditivas con edad de E15, E18 y E21. Se observa que la acción del agonista fue excitadora únicamente en E21 a las tres concentraciones administradas mientras que en E18 solo lo fue para dos de ellas. A ninguna de las edades y concentraciones administradas el efecto de PSB 0777 Ammonium salt fue significativo. Cada barra corresponde por lo menos a 3 experimentos. La línea punteada refiere el 100 % de la actividad control.

En la figura 22 se ilustra un registro extracelular unitario de la actividad eléctrica espontánea de una neurona aferente auditiva antes, durante y después de la aplicación del agonista PSB 0777 Ammonium sal:

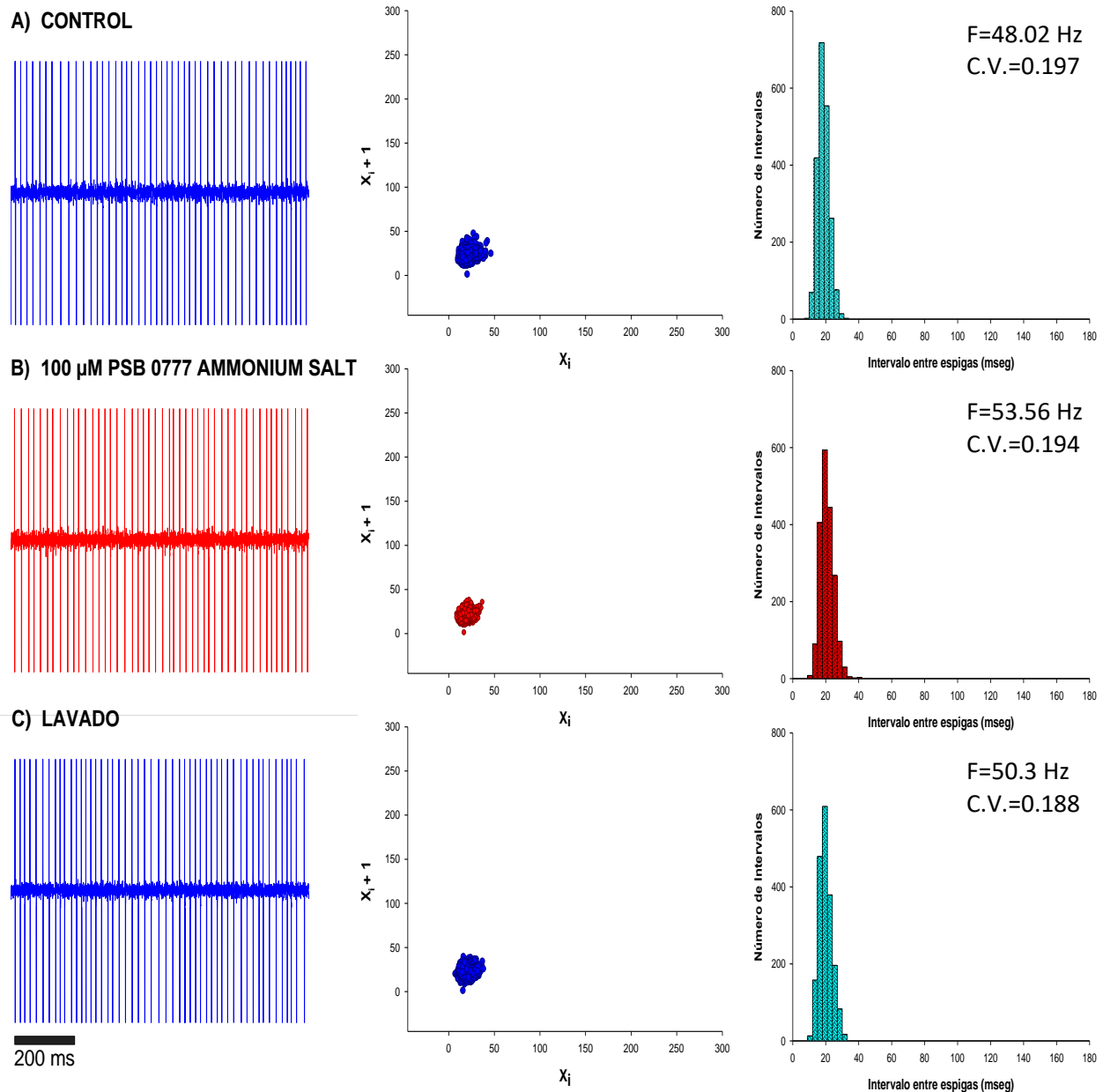


Fig. 22. Registro extracelular unitario de una neurona aferente de la papila basilar de un embrión de 21 días de edad. Obsérvese que con la administración de PSB 0777 Ammonium salt hay un mínimo incremento en la frecuencia de descarga basal. Además al analizar el diagrama de Poincaré e histograma la dispersión de los datos, éstos mantienen una distribución similar en los tres lapsos de tiempo mostrados (A, B, y C), lo que parece indicar que no hay modificación en el coeficiente de variación de intervalo entre espigas y por tanto el patrón de descarga no se ve alterado por acción del agonista.

Realizamos un análisis similar de los cambios del C.V. en los experimentos con el agonista PSB 0777 Ammonium sal. No encontramos cambios significativos con ninguna de las concentraciones administradas y en ninguna de las edades estudiadas. Los datos resumidos se muestran a continuación:

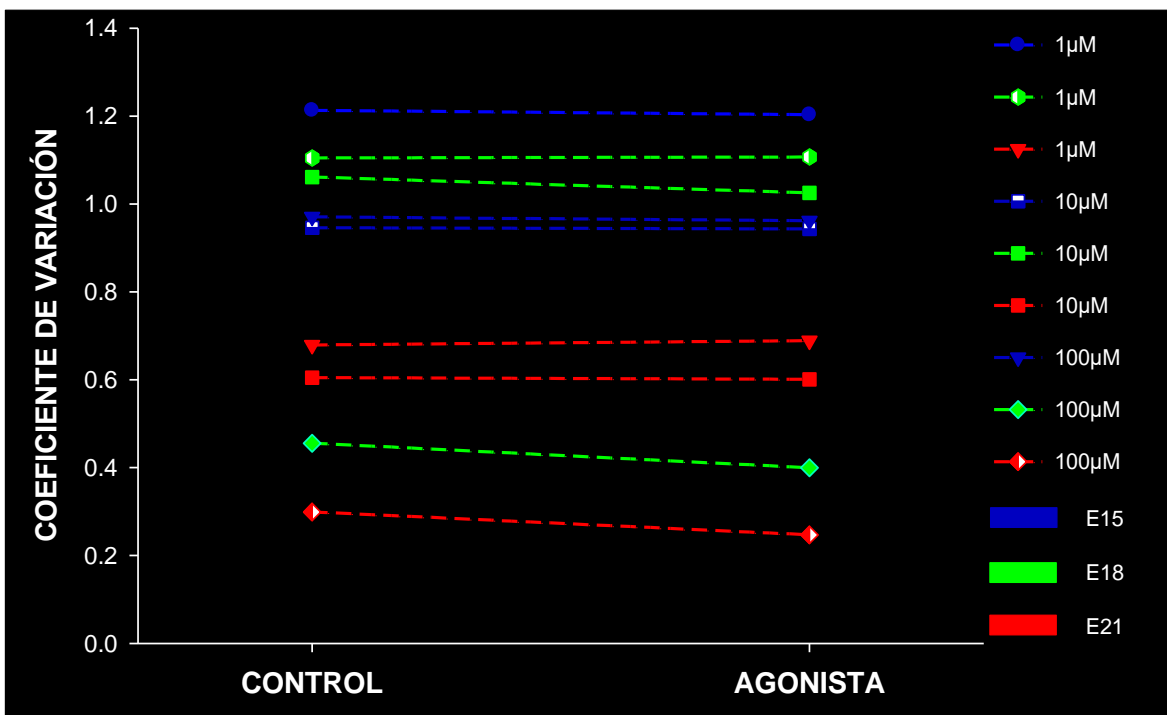


Fig. 23. Gráfica de los coeficientes de variación del intervalo entre espigas de la actividad eléctrica espontánea (Izquierda) con los de la administración de PSB 0777 Ammonium sal (derecha) a diferentes concentraciones (indicado con diferentes símbolos) y en diferentes edades (escala de colores).

Expresión del ARNm codificante para los subtipos de receptores P1 (RT-PCR)

Para correlacionar nuestras observaciones electrofisiológicas realizamos pruebas de RT-PCR mediante las cuales pudimos demostrar que durante E15 únicamente está presente el ARNm que codifica para el receptor a adenosina A_{2A} y que éste se expresa con intensidad similar tanto en el epitelio sensorial como en el ganglio coclear. En embriones de 21 días, la presencia del ARNm para este receptor sigue manteniéndose en ambas estructuras, pero con intensidad mayor, adicionalmente también observamos la presencia del ARNm codificante para el receptor A_1 y A_3 . La intensidad de la banda fue mayor en el epitelio sensorial que en ganglio para el A_1 , mientras que para el A_3 se observó lo opuesto. La banda correspondiente al receptor A_{2B} , fue visualizada únicamente en el epitelio sensorial. En etapas posteriores a la eclosión (P8) los cuatro subtipos de receptores están presentes con intensidad mayor a la observada durante el desarrollo embrionario.

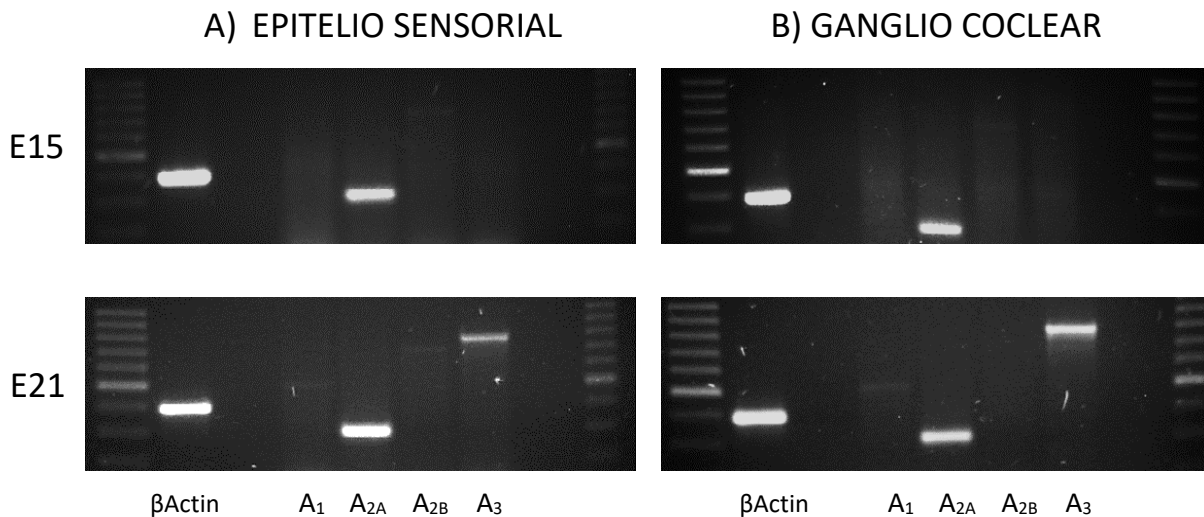


Fig. 24. Determinación del ARNm para los receptores a Adenosina en el epitelio sensorial y en el ganglio coclear del pollo en las edades embrionarias de 15 y 21 días por medio de la técnica de RT-PCR. A) De manera cualitativa en E15 se identificó el ARNm codificante para A_{2A} AR mientras que en E21 lo fue para los cuatro subtipos de receptor (A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3). B) En ganglio coclear se detectó la presencia del A_{2A} AR en ambas edades y del A_1 AR y A_3 AR en E21. Nótese que la banda correspondiente a los receptores A_1 y A_{2B} siempre fue de menor intensidad, además los ensayos de RT-PCR parecen indicar una expresión diferencial entre las dos edades estudiadas.

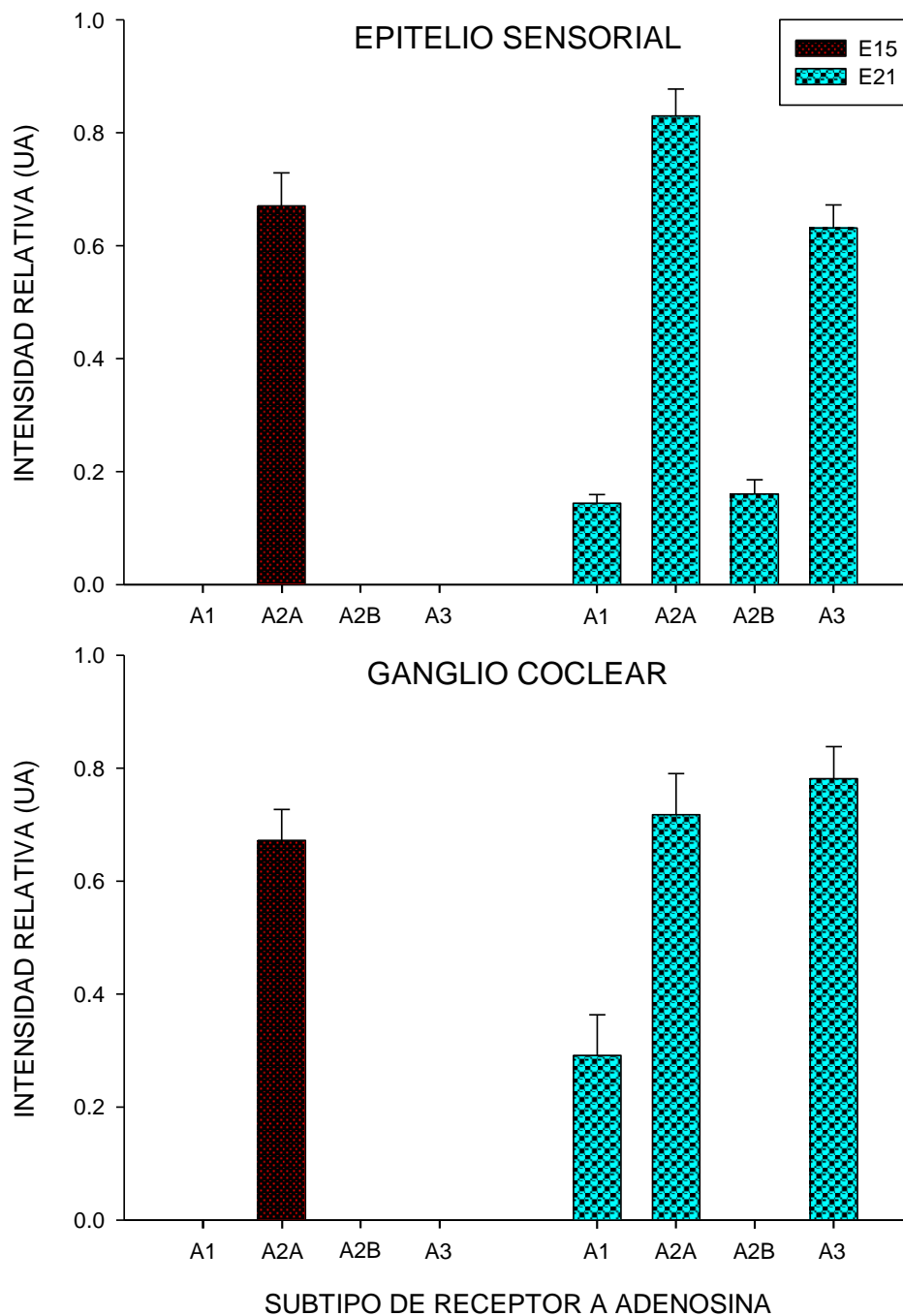


Fig. 25. Gráfica del análisis semi-cuantitativo que muestra los valores de la intensidad de banda (unidades arbitrarias) normalizadas con respecto a B-actina para embriones de pollo de 15 y 21 días en epitelio sensorial y ganglio coclear (n=12). Podemos observar que en el epitelio sensorial a la edad de 21 días la intensidad de la banda correspondiente al ARNm para el receptor A_{2A} fue la que mostro la mayor intensidad seguida de la banda correspondiente al receptor A_3 . Por otra parte, las bandas relacionadas con la expresión del ARNm para los receptores A_1 y A_{2B} fueron las menos intensas. Para el caso del ganglio coclear en esa misma edad el receptor A_3 fue el que mostro la banda más intensa seguida por la banda del receptor A_{2A} mientras que la banda correspondiente al ARNm del receptor A_1 fue la menos intensa. Para estas dos estructuras en la edad de E15 la intensidad promedio de la banda correspondiente al ARNm receptor A_{2A} fue muy similar.

DISCUSIÓN

La señalización purinérgica ha demostrado ser una de las más ubicuas pudiendo regular la proliferación celular, la migración, la diferenciación, la supervivencia y la muerte en el desarrollo embrionario. Así como participar en la inflamación, la neuroprotección, la citoprotección y el cáncer. Sus efectos son mediados a través de la activación de dos diferentes familias de receptores purinérgicos, los P1 y los P2. Los P2 estas conformados por receptores de tipo inotrópico (PX2) y metabotrópico (P2Y) mientras que los P1 solo están conformados por receptores de tipo metabotrópico siendo estos el A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, estos últimos han sido implicados en el funcionamiento del sistema nervioso central y los sentidos especiales (visión y audición).

En la retina y SNC la adenosina suprime la transmisión sináptica excitadora a través de varios mecanismos que incluyen a) la inhibición de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje resultando en una disminución en la liberación del neurotransmisor (Blazynski et al., 1992; Gundlfinger et al., 2007; Hartwick; et al., 2004; Sun et al., 2002; Wu and Saggau 1994;), b) inhibiendo la actividad del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (Wirkner et al., 2000; Wu et al., 1999; Zhang et al., 2010) y la fosfolipasa C (PLC) (Costenla et al., 1999), c) incrementado la actividad de los receptores GABA_A (Feigenspan and Bormann., 1994) o bien, inhibiéndola (Rombo., et al., 2016) y d) estimulando la apertura de canales de potasio sensibles a ATP (K_{APT}) (Sakamoto et al., 2004; Blondeau et al., 2000; Reshef et al., 2000).

En la audición se ha observado que en modelos de sobre estimulación acústica hay una regulación a la alta de los receptores A₁ inducida por un incremento en la concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por la señalización del factor transcripcional NF-κB (Ramkumar et al., 2004). La administración de agonistas de los receptores incrementa la producción de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa que confieren protección contra la ototoxicidad (por ROS) derivada de agentes quimioterapéuticos basados en platino (Ramkumar., et al., 1994; Ford et al., 1997b; Whitworth et al., 2004).

En este trabajo encontramos que la microperfusión de adenosina (1, 10 y 10 μM) en la periferia del sistema auditivo en las edades embrionarias de 15, 18 y 21 días tiene un efecto

excitador sobre la descarga de las neuronas aferentes del nervio coclear, lo que sugiere la presencia y activación de receptores a adenosina durante el desarrollo embrionario. El efecto de adenosina fue dependiente de la edad y de la concentración administrada, observándose el mayor efecto en E21 a la concentración de 100 μM . Los resultados obtenidos con la administración de adenosina se pueden correlacionar con lo hallado por Dulon et al. (1991), quienes demostraron que la aplicación de adenosina en células ciliadas internas de mamífero incrementaba los niveles de Ca^{2+} intracelular, lo que a su vez podría relacionarse con un incremento en la liberación del neurotransmisor dependiente de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular y por ende un incremento en la actividad eléctrica espontánea de la neurona aferente (Ceriani and Mammano, 2012). También han sido observados efectos excitadores por adenosina en rebanadas de la región CA3 de hipocampo y colículo superior en cobayos. Lo interesante es que estos autores encuentran una correlación entre la concentración de adenosina administrada y el efecto observado, de tal manera que a concentraciones de 10 nM a 1 μM se observa un efecto excitador y a concentraciones mayores de 10 μM el efecto es inhibitorio, esto en hipocampo. Sin embargo, en el colículo superior sólo se observó el efecto excitador (concentración mayor a 10 nM) y nunca el inhibidor (Okada et al., 1990; Nishimura et al., 1990). Ellos concluyen que el efecto excitador es debido a un incremento en la liberación de glutamato, aproximadamente 1.7 veces más (Okada et al., 1992).

Por otra parte, resultados opuestos han sido obtenidos al administrar adenosina en la periferia del sistema vestibular de rana, encontrado que esta molécula inhibe la frecuencia de descarga de las neuronas aferentes, mientras que la aplicación del antagonista teofilina incrementa la frecuencia de disparo (Bryant et al., 1987). Además se ha encontrado que la administración de adenosina en la cóclea de cobayos produce un decremento significativo en las potenciales microfónicos cocleares y en el potencial de acción compuesto, lo que posiblemente indique que adenosina a nivel de la sinapsis célula ciliada–neurona aferente, estaría mediando la activación de una vía de segundos mensajeros que involucraría una disminución en el influjo de Ca^{2+} a las células ciliadas, suprimiendo así la liberación del neurotransmisor, así como un incremento en las conductancias de potasio en la neurona aferente generando la hiperpolarización de la célula (Nario et al., 1994).

Algo interesante, además, es que también han sido obtenidos resultados que no apoyan ni contradicen las dos propuestas anteriores. El trabajo realizado por Ford y colaboradores (1997a) demostró que la administración de R-phenylisopropyladenosine (R-PIA) agonista selectivo para el receptor A₁ en la ventana redonda de la cóclea de chinchilla no afecta el potencial endococlear, el potencial de acción compuesto ni las respuestas auditivas evocadas en el tallo cerebral. Resultados similares al administrar adenosina (100 μM -1 μM) en cóclea de cobayo fueron observados por Muñoz et al. (2001) al evaluar el potencial endococlear y el potencial microfónico coclear. Así mismo Wong et al. (2010) demostraron que la administración de agonistas selectivos para los receptores A₁, A_{2A} y A₃ no tiene un efecto significativo en los potenciales cocleares evocados por sonido. Estos resultados sugieren que adenosina no altera ninguno de los parámetros electrofisiológicos de la función coclear normal en organismos adultos. Sin embargo, lo que si se ha observado es que se produce un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa) tras la administración de R-PIA (Ford et al., 1997a) lo que sugiere que la principal función de adenosina en la cóclea bajo condiciones fisiológicas normales sería citoprotección.

Si correlacionamos la magnitud del efecto excitador generado por la administración de adenosina con las edades embrionarias estudiadas podemos darnos cuenta que E15 fue la edad en la cual el efecto de este agonista fue de menor magnitud, por lo que consideramos que esta molécula tendría una participación más activa una vez que la función auditiva ya ha sido establecida, posiblemente mediando la experiencia sensorial, por ejemplo se ha observado que la estimulación auditiva en embriones de pollo y codorniz japonesa provoca que estos presenten un proceso adelantado de eclosión (Sleigh and Casey, 2014; Markham, et al., 2008). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que adenosina podría estar involucrada en la parte final del establecimiento de la función auditiva probablemente regulando el desarrollo funcional de las células ciliadas altas de manera análoga a lo que ha sido observado en mamífero (Marcotti, 2012). Esta propuesta se ve reforzada por el hecho de que la actividad eléctrica espontánea generada durante las dos primeras semanas posnatales en la rata (periodo pre-auditivo) no se ve afectada tras la administración de adenosina o el antagonista 8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX) selectivo para el receptor A₁. (Tritsch et al., 2007).

Una propuesta más del por qué se observa un incremento en la actividad eléctrica espontánea de las aferentes auditivas por la administración de adenosina podría estar ligada a una desregulación en sus niveles intra y extracelulares, esto es debido a que la aplicación exógena de adenosina incrementaría los niveles extracelulares de esta molécula en la periferia auditiva provocando a su vez un incremento en su recaptura a través de la activación de los transportadores de nucleósidos equilibrativos (cuya presencia ya ha sido demostrada en el sistema auditivo por Khan et al., 2007) seguido por su transformación directa a adenosín monofosfato (AMP) por medio de la adenosina quinasa (AdK) (es decir que la adenosina no pasaría por su transformación habitual a inosina a través de la adenosina desaminasa), lo que provocaría un incremento en los niveles intracelulares de AMP que junto con la quinasa de serina/treonina 11 (LKB1) generarían la activación de la quinasa activada por AMP (AMPK) (da Silva et al., 2006) que a su vez provocaría un incremento en los niveles intracelulares de ATP. Ésto podría producir un aumento en la liberación tónica de esta molécula hacia las células ciliadas, las cuales al responder a través de la activación de sus receptores P2Y incrementarían la liberación de glutamato hacia las terminales aferentes en un proceso dependiente de los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Galindo, 2013), de tal forma que el efecto generado por adenosina podría deberse a la activación de ambas familias de receptores purinérgicos (P1 y P2).

Otros autores han encontrado que los receptores a adenosina, en particular el A_1 y A_{2A} pueden interactuar con diferentes tipos de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Ciruela et al., 2011; Ferré et al., 2007a; Fredholm et al., 2011), en especial llama la atención la interacción entre el receptor A_1 y el $P2Y_2$ ya que se ha observado que la heterodimerización de estos receptores genera una proteína con una arquitectura única cuya estimulación simultánea induce un efecto diferencial o aditivo en las vías de señalización, así mismo se ha observado que el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} inducido por Uridin trifosfato (UTP) vía el receptor $P2Y_2$ es potenciado por la adición simultánea de Adenosina-5'-(n-etilcarboxamida) (NECA), agonista de los receptores A_1 y A_{2A} , esto implicaría que si en nuestra preparación estuviese presente este receptor heterómero es probable que el efecto mediado por la administración de adenosina fuese un proceso aditivo de ambas vías de señalización (Fredholm et al., 2011; Suzuki et al., 2006). La presencia de estos receptores heterómeros ha sido demostrada en neuronas de la corteza, del cerebelo (particularmente en

las células de Purkinje) y en las células piramidales del hipocampo (Namba et al., 2010). Sin embargo, la presencia de este tipo de heterómeros aún no ha sido demostrada en el oído interno y mucho menos en el sistema auditivo periférico.

Como sabemos, los receptores purinérgicos P1 están acoplados a proteínas G, por lo que su estimulación generaría la activación de vías de segundos mensajeros. Si correlacionamos esto con el efecto excitador por adenosina sobre la actividad eléctrica espontánea de las aferentes auditivas, podríamos sugerir que la adenosina tendría que estar activando vías de segundos mensajeros que involucren la estimulación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) o el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Fredholm et al., 2001; 2011). Además, si consideramos que ya se ha demostrado la presencia de estos receptores de manera diferencial en la cóclea de mamífero, con principal expresión del A_1 , A_{2A} y A_3 en las células ciliadas y neuronas cocleares aferentes (Ford et al., 1997a; Vljakovic et al., 2007), podríamos utilizar agonistas selectivos para evaluar la participación de cada subtipo de receptor.

Para evaluar la participación del receptor a adenosina A_1 decidimos utilizar el agonista selectivo 2-cloro-N6-ciclopentiladenosina (CCPA), encontrando que éste incrementa la frecuencia de descarga de las aferentes auditivas dependiendo de la concentración y la edad, sobre todo en las edades cercanas a la eclosión (E18 y E21). Hasta el momento no hemos encontrado resultados que apoyen o contradigan los que nosotros hemos obtenidos, pues no hay evidencia experimental durante el desarrollo embrionario del sistema auditivo. Lo que no sucede con organismos adultos, por ejemplo, Ford et al. (1997a) demostraron que la administración de R-PIA no genera ninguna modificación en los parámetros electrofisiológicos en la cóclea bajo condiciones normales, resultados similares fueron obtenidos por Whitworth et al. (2004) y Wong et al. (2010), empleando los agonistas R-PIA, CCPA y el antagonista DPCPX. A pesar de esto se observó en células disociadas de la cóclea que R-PIA conduce a la activación de la PLC incrementando los niveles intracelulares de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), generando así la activación y fosforilación de enzimas antioxidantes. Además estos resultados son corroborados al observar que el tratamiento con R-PIA también disminuye los niveles de malondialdehído (MDA) que es un marcador de la degradación oxidativa de la membrana celular (Ford et al., 1997a). Otros

estudios han revelado que la activación de la PKC por forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) produce un incremento en la amplitud del potencial de acción compuesto, lo que indicaría un incremento en la actividad eléctrica de la cóclea (Kitano et al., 1995). Bajo estas condiciones podríamos sugerir que el receptor A₁ estaría actuando de manera presináptica acoplado a una proteína G cuya vía de señalización activaría a la PLC conduciendo a una producción de diacilglicerol e IP₃, lo cual mediaría la liberación de Ca²⁺ de almacenes intracelulares y activaría la PKC. De esta forma, la liberación de Ca²⁺ provocaría un posible incremento en la liberación del neurotransmisor, en nuestro caso glutamato (Berridge, 2009). Se sugiere que un efecto similar está mediado por la activación de los receptores P2Y en las células ciliadas de mamífero y ave (Galindo et al., 2013; Tritsch et al., 2007). Además, cambios transitorios en las concentraciones de Ca²⁺ intracelular debido a la activación de los P2Y han sido observadas en células no sensoriales de la cóclea (de claudius, böttcher y henssen) (Piazza et al., 2007).

Otra posible funcionalidad de estos receptores es que estos estén modulando a la baja la actividad de canales de potasio de manera dependiente de la activación de la fosfolipasa C en la terminal afrentes, lo cual incrementaría la excitabilidad de estas, haciéndolas más propensa a la estimulación por glutamato. (Yamaguchi and Ohmori, 1993; Pérez et al., 2010) Otros resultados han demostrado que la activación de los A₁ en las dendritas aferentes de la cóclea las protege de la excitotoxicidad inducida por la administración de ácido kaínico, sin embargo la vía de señalización activada aún no ha sido determinada (Tabuchi et al., 2012).

Algo interesante es que los receptores A₁ han sido ampliamente estudiados en modelos de estimulación acústica, por ejemplo la administración de cisplatino un agente cancerígeno a base platino en la cóclea ha mostrado genera un incremento de cinco veces en la expresión de los receptor P1 en particular el A₁ y el A₃, además de observarse una elevación en los umbrales del potencial de acción compuesto (CAP), una disminución en el potencial endococlear (EP) y una pérdida de células ciliadas internas y externas en la región basal y media de la cóclea (Ford et al., 1997b), sin embargo la aplicación del agonista R-PIA posterior a la pérdida auditiva inducida por ruido mostró una recuperación en los umbrales de potenciales evocados en colículo inferior y menor pérdida de células ciliadas externas en la región basal y media de la cóclea (Hu et al., 1997), resultados similares fueron obtenidos

por Wong et al. (2010) en un modelo de pérdida auditiva inducida por ruido. Algo a considerar es que el efecto generado por el R-PIA no es inmediato, sino que demora entre tres a cuatro días en poder ser visualizado, lo que indicaría que este agonista no previene el daño inicial en las células ciliadas, sino que facilita la recuperación de éstas después de la exposición al ruido. Esto podría deberse a que el incremento en los radicales libres de oxígeno se da en un lapso de 3 a 6 días después de la exposición al ruido (Liu, 1992).

Así mismo se ha demostrado que un pre-tratamiento con R-PIA o CCPA disminuye los efectos observados por la posterior administración de cisplatino, es decir genera una recuperación en los umbrales de la respuesta auditiva del tronco cerebral (ABR) además de que CCPA reduce en un 25 % los niveles de malondialdehído inducidos por cisplatino y mantiene la morfología superficial del órgano de Corti intacta, mientras que la administración previa a cisplatino de R-PIA y DPCPX genera un efecto opuesto, un incremento en los umbrales ABR y un excesivo daño coclear en la región basal y media. (Whitworth et al., 2004). El mecanismo por el cual se cree que el receptor A_1 puede mediar sus efectos es través de la activación de la fosfolipasa C cuya vía de segundos mensajeros entre otros activaría a la proteína quinasa C, la activación de la PKC mediaría la fosforilación de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa) suprimiendo la generación de ROS. Además, se puede inducir la trascrición de este receptor a través del mismo incremento en la concentración intracelular de ROS, como por ejemplo el incremento en la producción de la NADPH oxidasa promueve la activación del factor de trascrición NF- κ B que estimula la trascrición del gen que codifica para el receptor A_1 (Ramkumar et al., 1995; 2004)

Otros mecanismos por los cuales la activación del receptor A_1 puede mediar un efecto protector son los siguientes: presinápticamente decremента la liberación del neurotransmisor excitador como glutamato (Dolphin and Archer, 1983; Coradetti et al., 1984), activa conductancias de potasio (Fredholm and Dunwiddie, 1988), inhibe el influjo de Ca^{2+} (Kimura, et al., 2003; Stella et al., 2007), y media la activación de canales de cloro dependientes de voltaje distintos a los activados por GABA (Mager et al., 1990). Postsinápticamente reduce la amplificación sináptica inducida por el receptor NMDA (Schubert et al., 1993) y facilita la recaptura de glutamato por astrocitos (Hosli et al., 1987).

Sin embargo, estos mecanismos han sido principalmente descritos en distintas regiones del SNC, pero no hay reportes al respecto en la fisiología coclear periférica.

Por otra parte, la activación del receptor A_{2A} por la administración de agonistas selectivos no muestra alteraciones en ninguno de los parámetros electrofisiológicos estudiados en la cóclea de mamíferos adultos. Resultados similares fueron obtenidos en modelos de daño coclear inducido por ruido (Wong et al., 2010). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la activación del receptor A_{2A} durante el desarrollo embrionario genera un incremento en la frecuencia de descarga de las aferentes auditivas, pese a ello la magnitud del efecto generado no fue significativo en ninguna de las etapas y concentraciones estudiadas. Resultados análogos a los nuestros han sido observados en modelos de daño coclear inducido por agentes cancerígenos, el pre-tratamiento con el agonista 2-(4-(2-p-carboxi-etil) fenil amino)-5'-N-etil carboxamida adenosina (CGS) selectivo para el receptor A_{2A} incrementa significativamente los umbrales ABR producidos por cisplatino, esto indican que la activación del A_{2A} exacerba el efecto ototóxico generado por cisplatino (Whitworth et al., 2004). Así mismo en modelos de excitotoxicidad inducida por ácido kaínico (KA) los cambios morfológicos observados en las dendritas afrentes cocleares generados por la aplicación de KA no son revertidos ni decrementados por la administración de 5'-N-ciclopropil-carboxamidoadenosina (CPCA) agonista del A_{2A} (Tabuchi et al., 2012). Además, se ha descubierto que cultivos neuronales purificados de retinas de embriones de pollo de 16 días de edad tratados con el agonista 2-[p-(2-carboxietil)feniletilamino]-5'-N-etilcarboxamido adenosina (CGS21680) selectivo para el A_{2A} por cuatro días presentan una gran cantidad de muerte celular. El mismo efecto fue observado en animales inyectados in ovo en E6 y analizados en E9 (Socodato et al., 2011). De hecho, se considera que la activación de estos receptores en el en SNC, principalmente en el periférico conlleva a un incremento en la liberación del neurotransmisor a través de la potenciación presináptica de canales de calcio tipo P y cuya vía de señalización posiblemente involucra la activación de la AC. (Mogul et al., 1993; Correia-de-Sa' and Ribeiro, 1994; Umemiya and Berger, 1994; Gubitzi et al., 1996). Resultados opuestos a los descritos anteriormente fueron obtenidos en cultivos celulares de neuronas corticales en donde se demuestran que la activación del receptor A_{2A} atenúa la excitotoxicidad inducida por KA (Rebola et al., 2005). Se ha encontrado que en cultivos neuronales de retina de embriones de

pollo pre-incubados con el agonista CGS21680 se bloquea la excitotoxicidad inducida por glutamato (Ferreira and Paes de Carvalho, 2001). Algo curioso es que los receptores A_{2A} pueden mediar una inhibición en la generación de aniones superóxido en los neutrófilos y cuya vía de señalización involucra la activación de la proteína fosfatasa serina/treonina de manera independiente de AMPc y PKA (Revan et al., 1996).

Mediante la técnica de RT-PCR pudimos evaluar la presencia del ARNm para los diferentes subtipos de receptores a adenosina en dos periodos distintos de desarrollo embrionario del sistema auditivo de ave. Encontramos que en etapas tempranas del desarrollo (E15) sólo se expresa el receptor A_{2A}, mientras que en periodos más cercanos a la eclosión (E21) la presencia del ARNm codificante para los receptores A₁, A_{2B} y A₃ aparece, además de un ligero incremento en la expresión del A_{2A}.

Nuestros resultados concuerdan con lo encontrado durante el desarrollo embrionario de la retina de pollo ya que ellos también observan la expresión temprana del receptor A_{2A} (E6) (Brito et al., 2012) y conforme avanza el desarrollo (E10) la expresión del A₁ alcanza su pico de expresión en el día E16 (Paes-de-Carvalho, 1990). Una hipótesis interesante del por qué se expresa primero el receptor A_{2A} sugiere que posiblemente este induce la expresión del A₁ a través de la activación de la adenilil ciclasa (AC) y la PKA (Brito et al., 2012). Cabe la posibilidad de que un mecanismo similar suceda en nuestra preparación. Otros datos revelan la expresión y funcionalidad del A_{2A} en piel y músculo de embriones de pollo de 10 días de edad en donde modulan la proliferación y diferenciación de los fibroblastos (Malihi et al., 2006). Así mismo se ha reportado la expresión funcional de receptores a adenosina en E10 sugiriéndose que estos modulan la angiogénesis en la membrana corioalantoidea (CAM) (Dusseau et al., 1986; Adair et al., 1989) posiblemente a través de la activación del receptor A_{2A} (Adair, 2005). En el cerebro de rata mediante estudios de unión a radioligandos se ha encontrado que la expresión de A₁ aparece en E19 mientras que en cobayo antes del nacimiento, además los niveles de expresión incrementan gradualmente posterior al nacimiento hasta alcanzar los niveles adultos. (Morgan et al., 1987; 1990; Geiger et al., 1984). Resultados obtenidos mediante hibridación in situ detectan la expresión restringida del ARNm para el receptor A₁ en E14 alcanzándose los patrones de expresión observados en adulto en el día embrionario 17 (Weaver, 1996). Algo interesante es que también se han

observado cambios en los niveles de expresión de la 5'-Nucleotidase en cerebro fetal de cobayo, niveles bajos de la enzima son visualizados en etapas tempranas de la gestación (E30-E35) mientras que en periodos más cercanos al nacimiento (E40-E60) incrementan rápidamente esto indicaría que hay un incremento gradual en los niveles intracelulares de esta encima conforme el desarrollo avanza. (Mishra et al., 1988). Por otra parte, en la cóclea de mamíferos adultos mediante RT-PCR se observó la expresión del ARNm para los cuatro subtipos de receptores a adenosina. Además, mediante inmunohistoquímica se determinó la expresión de 3 de los 4 subtipos de receptores el órgano de Corti, el A₁, A_{2A} y A₃, de los cuales el último de estos es el que presenta la distribución más amplia (Vlajkovic et al., 2007).

Nuestro trabajo finalmente, contribuye a dilucidar la presencia de dos de los cuatro subtipos de receptores purinérgicos P1 en la sinapsis célula ciliada-neurona aferente en la preparación de papila basilar durante el desarrollo embrionario del pollo. Nosotros planteamos que adenosina actúa como un modulador de la descarga aferente al regular la concentración intracelular de segundos mensajeros tales como: fosfatos de inositol, diacilglicerol, Ca²⁺ y PCK. Además, al activar algunas enzimas a través de la PCK podría ejercer un efecto citoprotector en la cóclea y modular la expresión genética en etapas iniciales del periodo auditivo.

CONCLUSIONES

1.-Los receptores purinérgicos P1 participan en la descarga basal de las aferentes auditivas durante el desarrollo embrionario.

2.-La activación de los receptores purinérgicos P1 tras la administración de Adenosina genera un incremento sobre la actividad eléctrica espontánea de las aferentes auditivas. Dicho incremento es dependiente de la concentración y edad utilizada, observándose un mayor efecto en edades cercanas a la eclosión.

3.-Los antagonistas cafeína y teofilina disminuyen el efecto producido por adenosina en edades cercanas a la eclosión.

4.-El agonista del receptor purinérgico A_1 , CCPA genera un incremento sobre la actividad eléctrica espontánea de las aferentes auditivas que es dependiente de la edad estudiada y la concentración administrada y cuyo efecto es más notable en edades cercanas a la eclosión

5.-El agonista del receptor purinérgico A_{2A} , PSB 0777 Ammonium salt genera un aumento sobre la actividad eléctrica espontánea de las aferentes auditivas que no depende de la edad ni la concentración utilizada.

6.-Los resultados obtenidos mediante los ensayos de expresión génica muestran la presencia del ARNm que codifica para los distintos subtipos de receptores P1 en el epitelio sensorial y el ganglio coclear y cuya expresión difiere dependiendo de la edad embrionaria estudiada.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbracchio M.P., Burnstock G., Boeynaems J.M., Barnard E.A., Boyer J.L., Kennedy C., Knight G.E., Fumagalli M., Gachet C., Jacobson K.A., Weisman G.A., (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 58: 281-341.
- Adair T.H., (2005). Growth regulation of the vascular system: an emerging role for adenosine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 289: R283–R296.
- Adair T.H., Montani J.P., Strick D.M., Guyton A.C., (1989). Vascular development in chick embryos: a possible role for adenosine. *Am J Physiol.* 256: H240-6.
- Aherne C.M., Kewley E.M., Eltzhig H.K., (2011). The resurgence of A2B adenosine receptor signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1808:1329-39.
- Arch-Tirado E., Collado-Corona M.Á., Morales-Martínez J.J., (2004) Comunicación y comportamiento auditivo obtenidos por medio de los potenciales evocados auditivos en mamíferos, aves, anfibios y reptiles. *Cir Ciruj.* 72: 309-15.
- Ashmore J.F., Kolston P.J., (1994). Hair cell based amplification in the cochlea. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 503–08.
- Atkinson M.R., Townsend-Nicholson A., Nicholl J.K., Sutherland G.R., and Schofield P.R., (1997). Cloning, characterisation and chromosomal assignment of the human adenosine A3 receptor (ADORA3) gene. *Neurosci Res* 29: 73–9.
- Ballester, J.A., (2011). Modulación de la actividad de las células ciliadas del órgano de Corti por el sistema eferente olivococlear. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Bar-Yehuda S., Stemmer S.M., Madi L., Castel D., Ochaion A., Cohen S., Barer F., Zabutti A., Perez-Liz G., Del Valle L., Fishman P., (2008). The A3 adenosine receptor agonist CF102 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via de-regulation of the Wnt and NF- κ B signal transduction pathways. *Int. J. Oncol.* 33:287–95.
- Bean B.P., (1992). Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* 13: 87-90.
- Beisel K.W., Wang-Lundberg Y., Maklad A., Fritsch, B., (2005). Development and evolution of the vestibular sensory apparatus of the mammalian ear. *J. Vestib. Res.* 15, 225-41.
- Berridge M.J., (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1793: 933-40.

- Beukers M.W., den Dulk H., van Tilburg E.W., Brouwer J., IJzerman A.P., (2000). Why are A₂B receptors low-affinity adenosine receptors? Mutation of Asn273 to Tyr increases affinity of human A₂B receptor for 2-(1-Hexynyl) adenosine. *Mol. Pharmacol.* 58: 1349–56.
- Beukers M.W., van Oppenraaij J., van der Hoorn P.P., Blad C.C., den Dulk H., Brouwer J., IJzerman A.P., (2004). Random mutagenesis of the human adenosine A₂B receptor followed by growth selection in yeast. Identification of constitutively active and gain of function mutations. *Mol. Pharmacol.* 65: 702–10.
- Beurg M., Tan X., Fettiplace R., (2013). A prestin motor in chicken auditory hair cells: active force generation in a nonmammalian species. *Neuron* 79: 69-81.
- Bhattacharya S., Dewitt D.L., Burnatowska-Hledin M., Smith W.L., Spielman W.S., (1993). Cloning of an adenosine A₁ receptor-encoding gene from rabbit. *Gene*;128: 285-8.
- Bianchi V., Sychala J., (2003). Mammalian 5'-nucleotidases. *J Biol Chem*; 278: 46195-8.
- Bissonnette J.P., Fekete D.M., (1996). Standart atlas of the gross anatomy of the developing inner ear of the chicken. *J. Comp. Neurol.* 368: 620-30.
- Blazynski C., Woods C., Mathews G.C., (1992). Evidence for the action of endogenous adenosine in the rabbit retina: modulation of the light-evoked release of acetylcholine. *J Neurochem.* 58: 761-7.
- Blondeau N., Plamondon H., Richelme C., Heurteaux C., Lazdunski M., (2000). K(ATP) channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. *Neuroscience.* 100: 465-74.
- Borea P.A., Varani K., Vincenzi F., Baraldi P.G., Tabrizi M.A., Merighi S., Gessi S., (2015). The A₃ adenosine receptor: history and perspectives. *Pharmacol Rev.* 67: 74-102.
- Brandon C.I., Vandenplas M., Dookwah H., Murray T.F., (2006). Cloning and pharmacological characterization of the equine adenosine A₃ receptor. *J Vet Pharmacol Ther.* 29: 255–63.
- Braun N., Zhu Y., Kriegelstein J., Culmsee C., Zimmermann H., (1998). Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J. Neurosci.* 18: 4891-900.
- Brigande J.V., Kiernan A.E., Gao X., Iten L.E., Fekete D.M., (2000). Molecular genetics of pattern formation in the inner ear: do compartment boundaries play a role?. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 11700-62.
- Brito R., Pereira M.R., Paes-de-Carvalho R., Calaza Kda C., (2012). Expression of A₁ adenosine receptors in the developing avian retina: in vivo modulation by A₂A receptors and endogenous adenosine. *J Neurochem.*123: 239-49.
- Brownell W.E., Bader C.R., Bertrand D., de Ribaupierre Y., (1985). Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science.* 227: 194–96.

- Bryant G.M., Barron S.E., Norris C.H., Guth P.S., (1987). Adenosine is a modulator of hair cell-afferent neurotransmission. *Hear Res.* 30: 231-7.
- Buell G., Lewis C., Collo G., North R.A., Surprenant A., (1996). An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J.* 15: 55–62.
- Burnstock G., (1972). Purinergic Nerves. *Pharmacol Rev.* 24: 509-814.
- Burnstock G., (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. En: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. Ed. Straub RW. & Bolis L. New York: Raven Press, pp. 107–118.
- Burnstock G., Kennedy C., (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?. *Gen Pharmacol.* 16: 433-40.
- Calon F., Dridi M., Hornykiewicz O., Bédard P.J., Rajput A.H., Di Paolo T., (2004). Increased adenosine A2A receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. *Brain.* 127: 1075-84.
- Ceriani F., Mammano F., (2012). Calcium signaling in the cochlea - Molecular mechanisms and physiopathological implications. *Cell Commun Signal.* 10: 20.
- Chen J.F., Xu K., Petzer J.P., Staal R., Xu Y.H., Beilstein M., Sonsalla P.K., Castagnoli K., Castagnoli N.Jr., Schwarzschild M.A., (2001). Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci.*;21:RC143.
- Chern, Y., King K., Lai H.L., Lai, H.T., (1992). Molecular cloning of a novel adenosine receptor gene from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 304-309.
- Chu Y.Y., Tu K.H., Lee Y.C., Kuo Z.J., Lai H.L., Chern Y., (1996). Characterization of the rat A2a adenosine receptor gene. *DNA Cell Biol.* 15: 329-337.
- Cieślak M., Komoszyński M., Wojtczak A., (2008). Adenosine A2A receptors in Parkinson's disease treatment. *Purinergic Signalling.* 4: 305–312.
- Ciruela F., Gómez-Soler M., Guidolin D., Borroto-Escuela D.O., Agnati L.F., Fuxe K., Fernández-Dueñas V., (2011) Adenosine receptor containing oligomers: their role in the control of dopamine and glutamate neurotransmission in the brain. *Biochim Biophys Acta.* 1808: 1245-55.
- Cohen G.M., (1987). Acetylcholinesterase activity in the embryonic chick's inner ear. *Hear. Res.* 28: 57–63.
- Cohen G.M., Fermin C.D., (1978). The development of hair cells in the embryonic chick's basilar papilla. *Acta Otolaryngol.* 86: 342-58.

- Collo G., North R.A., Kawashima E., Merlo-Pich E., Neidhart S., Surprenant A., Buell G., (1996). Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci.* 16: 2495-507.
- Coradetti R., Lo Conte G., Moroni F., Passani M.B., Pepeu G., (1984). Adenosine decreases aspartate and glutamate release from rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 104: 19 – 26.
- Correia-de-Sa´ P., Ribeiro J.A., (1994). Evidence that the presynaptic A2a-adenosine receptor of the rat motor nerve endings is positively coupled to adenylate cyclase. *Naunyn Schmiedeberg’s Arch Pharmacol.* 350:514–22.
- Costenla A.R., De Mendonça A., Sebastião A., Ribeiro J.A., (1999). An adenosine analogue inhibits NMDA receptor-mediated responses in bipolar cells of the rat retina. *Exp Eye Res.* 68 :367-70.
- Craig C.G., Temple S.D., White T.D., (1994). Is cyclic AMP involved in excitatory amino acid-evoked adenosine release from rat cortical slices? *Eur. J. Pharmacol.* 269: 79-85.
- Cui J., Cox D.H., Aldrich R.W. (1997). Intrinsic voltage dependence and Ca²⁺ regulation of mslo large conductance Ca-activated K⁺ channel. *J Gen Physiol.* 109: 647-73.
- da Silva C.G., Jarzyna R., Specht A., Kaczmarek E., (2006). Extracellular nucleotides and adenosine independently activate AMP-activated protein kinase in endothelial cells: involvement of P2 receptors and adenosine transporters. *Circ Res.* 98: e39-47.
- Davis H., (1983). An active process in cochlear mechanics. *Hear. Res.* 9: 79–90.
- Day B.L., Fitzpatrick R.C., (2005). The vestibular system. *Curr. Biol;* 15: R583-R586.
- de Lera Ruiz M., Lim Y.H., Zheng J., (2014). Adenosine A2A receptor as a drug discovery target. *J Med Chem.* 57: 3623-50.
- Díaz F.C., Álvarez M.J.C., Suarez N.C., (2007). Anatomía del sistema vestibular periférico y central. En: *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello; 2ª Ed.* C. Suarez, LM. Gil-Carcedo y cols. Medica Panamericana. Tomo II; 70: 879-911.
- Dolphin A.C., Archer E.R., (1983). An adenosine agonist inhibits and cyclic AMP analogue enhances the release of glutamate but not GABA from slices of rat dentate gyrus. *Neurosci Lett.* 43: 49 – 54
- Drury A.N., Szent-Györgyi A., (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 68: 213–37.
- Dulon, D., Mollard P., Aran J.M., (1991). Extracellular ATP elevates cytosolic Ca²⁺ in cochlear inner hair cells. *Neuroreport.* 2: 69–72.

- Dunwiddie T.V., Masino S.A., (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*; 24: 31-55.
- Dusseau J.W., Hutchins P.M., Malbasa D.S., (1986). Stimulation of angiogenesis by adenosine on the chick chorioallantoic membrane. *Circ Res*. 59: 163-70.
- Egan T.M., Khakh B.S., (2004) Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci*. 24: 3413-20.
- Fay R.R., Popper A.N., (2000). Evolution of hearing in vertebrates: the inner ears and processing. *Hear. Res*. 149: 1–10.
- Feigenspan A., Bormann J., (1994). Facilitation of GABAergic signaling in the retina by receptors stimulating adenylylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 10893-7.
- Feoktistov I., Biaggioni I., (1997). Adenosine A2B receptors. *Pharmacol Rev*. 49: 381-402.
- Feoktistov I., Biaggioni I., (1998). Pharmacological characterization of adenosine A2B receptors: studies in human mast cells co-expressing A2A and A2B adenosine receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol*. 55:627-33.
- Feoktistov I., Biaggioni I., (2011). Role of adenosine A2B receptors in inflammation *Adv Pharmacol*. 61: 115–44.
- Ferguson G., Watterson K.R., Palmer T.M., (2002). Subtype-specific regulation of receptor internalization and recycling by the carboxyl-terminal domains of the human A1 and rat A3 adenosine receptors: consequences for agonist-stimulated translocation of arrestin3. *Biochemistry*. 41: 14748-61.
- Ferguson G., Watterson K.R., Palmer T.M., (2000). Subtype-specific kinetics of inhibitory adenosine receptor internalization are determined by sensitivity to phosphorylation by G protein-coupled receptor kinases. *Mol. Pharmacol*. 57: 546–52.
- Ferré S., Ciruela F., Quiroz C., Luján R., Popoli P., Cunha R.A., Agnati L.F., Fuxe K., Woods A.S., Lluís C., Franco R., (2007a). Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. *ScientificWorldJournal*. 7: 74-85.
- Ferré S., Diamond I., Goldberg S.R., Yao L., Hourani S.M., Huang Z.L., Urade Y., Kitchen I., (2007b). Adenosine A2A receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry implications for drug addiction, sleep and pain. *Prog Neurobiol*. 83: 332-47.
- Ferreira J.M., Paes de Carvalho R., (2001). Long-term activation of adenosine A2A receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. *Brain Res*. 900: 169–76.
- Fettiplace R., (2006). Active hair bundle movements in auditory hair cells. *J. Physiol*. 576: 29–36.
- Fettiplace R., Fuchs P.A., (1999). Mechanisms of hair cell tuning. *Annu Rev Physiol*. 61: 809-34.
- Fettiplace R., Ricci A.J., (2003). Adaptation in auditory hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 13: 446–51.

- Fettiplace R., Ricci A.J., Hackney C.M., (2001). Clues to the cochlear amplifier from the turtle ear. *Trends Neurosci.* 24: 169-75.
- Figler R.A., Wang G., Srinivasan S., Jung D.Y., Zhang Z., Pankow J.S., Ravid K., Fredholm B., Hedrick C.C., Rich S.S., Kim J.K., LaNoue K.F., Linden J., (2011). Links between insulin resistance, adenosine A2B receptors, and inflammatory markers in mice and humans. *Diabetes.* 60: 669-79.
- Fink J.S., Weaver D.R., Rivkees S.A., Peterfreund R.A., Pollack A.E., Adler E.M., Reppert S.M., (1992) Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Mol. Brain Res.* 14: 186-195.
- Firbas W., Müller G., (1983). The efferent innervation of the avian cochlea. *Hearing Res* 10: 109-16.
- Fishman P., Bar-Yehuda S., Ardon E., Rath-Wolfson L., Barrer F., Ochaion A., Madi L., (2003). Targeting the A3 adenosine receptor for cancer therapy: inhibition of prostate carcinoma cell growth by A3 agonist. *Anticancer Res.* 23: 2077–83.
- Fishman P., Bar-Yehuda S., Barer F., Madi L., Multani A.S., Pathak S., (2001). The A3 adenosine receptor as a new target for cancer therapy and chemoprotection. *Exp Cell Res.* 269: 230-6.
- Fishman P., Bar-Yehuda S., Liang B.T., Jacobson K.A., (2012). Pharmacological and therapeutic effects of A3 adenosine receptor agonists. *Drug Discov Today.* 17: 359-66.
- Fishman P., Bar-Yehuda S., Madi L., Rath-Wolfson L., Ochaion A., Cohen S., Baharav E., (2006). The PI3K-NF- κ B signal transduction pathway is involved in mediating the antiinflammatory effect of IB MECA in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Res. Therap.* 8: 1–9.
- Fishman P., Bar-Yehuda S., Ohana G., Barer F., Ochaion A., Erlanger A., Madi L., (2004). An agonist to the A3 adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 β and NF- κ B. *Oncogene.* 23: 2465–71.
- Flores U.A., Galicia I.S., Ollyni G.R.G., (2001). El sistema vestibular: aspectos generales y Neurodesarrollo. *Temas Selectos de Neurociencias II. UAM-PUIS.* 179-198.
- Ford M.S., Maggirwar S.B., Rybak L.P., fC., Ramkumar V., (1997a). Expression and function of adenosine receptors in the chinchilla cochlea. *Hear Res.* 105: 130-40.
- Ford M.S., Nie Z., Whitworth C., Rybak L.P., Ramkumar V., (1997b). Up-regulation of adenosine receptors in the cochlea by cisplatin. *Hear Res.* 111: 143-52.
- Fredholm B.B., Arslan G., Halldner L., Kull B., Schulte G., Wasserman W., (2000). Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362: 364– 74.
- Fredholm B.B., Dunwiddie T.V., (1988). How does adenosine inhibit neurotransmitter release? *Trends Pharmacol Sci.* 9: 130 – 134

- Fredholm B.B., IJzerman A.P., Jacobson K.A., Klotz K.N., Linden J., (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 53: 527-52.
- Fredholm B.B., IJzerman A.P., Jacobson K.A., Linden J., Müller C.E., (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol Rev.* 63: 1–34.
- Fuchs P.A., Evans M.G., (1988) Voltage oscillations and ionic conductances in hair cells isolated from the alligator cochlea. *J Comp Physiol A.* 164: 151-63.
- Fuchs P.A., Evans M.G., (1990) Potassium currents in hair cells isolated from the cochlea of the chick. *J Physiol.* 429: 529-51.
- Fuchs P.A., Glowatzki E., Moser T., (2003). The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr Opin Neurobiol.* 13: 452-8.
- Fuchs P.A., Murrow B.W., (1991). Inhibition of cochlear hair cells by acetylcholine. *J Gen Physiol.* 98:28a.
- Fuchs P.A., Murrow B.W., (1992a). Cholinergic inhibition of short (outer) hair cells of the chick's cochlea. *J Neurosci* 12: 800–09.
- Fuchs P.A., Murrow B.W., (1992b). A novel cholinergic receptor mediates inhibition of chick cochlear hair cells. *Proc Biol Sci.* 248: 35-40.
- Furlong T.J., Pierce K.D., Selbie L.A., Shine J., (1992). Molecular characterization of a human brain adenosine A2 receptor. *Brain Res Mol Brain Res.* 15: 62-6.
- Galindo F., Flores A., (2006). De la energética a la neurotransmisión: el adenosín trifosfato y sus receptores. *Rev Neurol.* 43: 667-77.
- Galindo F., Monjaraz E., Galicia S., Cebada J., Cortés C., Flores A. (2013). Functional expression of P2 receptors in the inner ear of chicken embryo. *Neuroscience Letters* 553:24-28.
- Galindo F.R., (2013). Participación de los receptores para ATP durante la ontogenia de dos sistemas sensoriales (vestibular y auditivo) en el modelo del embrión de pollo (*Gallus domesticus*). Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Fisiológicas. Instituto de Fisiología. BUAP.
- Ganeshina O.T., (1985). Ultrastructure of the tegmentum vasculosum of the chicken cochlea. *Zh Evol Biokhim Fiziol.* 21:299-302.
- Gao Z., Li B.S., Day Y.J., Linden J., (2001). A3 adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cells from apoptosis. *Mol Pharmacol.* 59: 76–82.
- Geiger J.D., LaBella F.S., Nagy J.I., (1984) Ontogenesis of adenosine receptors in the central nervous system of the rat. *Brain Res.* 13: 97–104.

- Gillespie J.H., (1934). The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol.* 80: 345–59.
- Gillespie P.G., Cyr J.L., (2004). Myosin-1c, the hair cell's adaptation motor. *Ann. Rev. Physiol.* 66: 521–45.
- Gil-Loyzaga P., Poch-Broto J., (2000). El oído interno: El laberinto óseo. Anatomía e histología de la cóclea. En: *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*. Ed. C. Suarez, LM. Gil-Carcedo y cols. Proyectos Médicos S.L. Tomo II; Parte I, 60: 688-97.
- Gil-Loyzaga P., Poch-Broto J., (2007). Fisiología del sistema auditivo periférico. En: *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*; 2ª Ed. C. Suarez, LM. Gil-Carcedo y cols. Medica Panamericana. Tomo II; 74: 953-68.
- Gil-Loyzaga P., Pujol R., (1999). Fisiología del receptor y la vía auditiva. En: *Fisiología Humana*; 2ª Ed. Ed. J.A.F. Tresguerres y cols. Ed. McGraw Hill Interamericana. pp 231-244.
- Gleich O., Fischer F.P., Köppl C., Manley G.A., (2004). Hearing organ evolution and specialization: Archosaurs. En *Evolution of the vertebrate Auditory System*. Eds. Manley G.A., Popper A.N., Fay, R.R. EdSpringer Verlag. New York. pp 224-255.
- Gleich O., Manley G.A., (2000). The Hearing Organ of Birds and Crocodilia. En: *Comparative Hearing: Birds and Reptiles*. Ed. Dooling R.J., Fay R.R., Popper A.N. Springer Handbook of Auditory Research. 13, pp 70-138.
- Gomes J.A., Li X., Pan H.L., Eisenach J.C., (1999). Intrathecal adenosine interacts with a spinal noradrenergic system to produce antinociception in nerve-injured rats. *Anesthesiology.* 91: 1072-9.
- Grondal E.J.M., Janetzko A., Zimmermann H., (1988). Monospecific antiserum against 5'-nucleotidase from Torpedo electric organ. Immunocytochemical distribution of the enzyme and its association with Schwann cell membranes. *Neuroscience* 24: 351-63.
- Gubitza A.K., Widdowson L., Kurokawa M., Kirkpatrick K.A., Richardson P.J., (1996). Dual signalling by the adenosine A2a receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same nerve terminals. *J Neurochem* 67: 374–81.
- Gundlfinger A., Bischofberger J., Johenning F.W., Torvinen M., Schmitz D., Breustedt J., (2007). Adenosine modulates transmission at the hippocampal mossy fibre synapse via direct inhibition of presynaptic calcium channels. *J Physiol.* 582 : 263–77.
- Guth, P.P., (1998). The vestibular hair cells: posttransductional signal processing. *Prog. Neurobiol.* 54: 193-247.
- Hamburger V., and Hamilton H. L., (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* Hernández C. M. C. *Neurobiología Coclear eventos celulares y moleculares. Revista Habanera de ciencias Médicas.* Vol. I. 88: 49-92.

- Hamilton S.R., Yao S.Y., Ingram J.C., Hadden D.A., Ritzel M.W., Gallagher M.P., Henderson P.J., Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A., (2001). Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter rCNT1. *J Biol Chem.* 276: 27981-8.
- Hammarberg C., Fredholm B.B., Schulte G., (2004). Adenosine A3 receptor-mediated regulation of p38 and extracellular-regulated kinase ERK1/2 via phosphatidylinositol-39 kinase. *Biochem Pharmacol.* 67: 129–34.
- Hartwick A.T., Lalonde M.R., Barnes S., Baldrige W.H., (2004). Adenosine A1-receptor modulation of glutamate-induced calcium influx in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45: 3740-8.
- Haskó G., Németh Z.H., Vizi E.S., Salzman A.L., Szabó C., (1998). An agonist of adenosine A3 receptors decreases interleukin-12 and interferon- γ production and prevents lethality in endotoxemic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 358: 261–68.
- Haskó G., Szabó C., Németh Z.H., Kvetan V., Pastores S.M., Vizi E.S., (1996). Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J. Immunol.* 157: 4634–40.
- Hayashida M., Fukuda K., Fukunaga A., (2005). Clinical application of adenosine and ATP for pain control. *J Anesth.* 19: 225-35.
- Hiel H., Luebke A.E., Fuchs P.A., (2000). Cloning and expression of the α 9 nicotinic acetylcholine receptor subunit in cochlear hair cells of the chick. *Brain Res.* 858: 215-25.
- Hirokawa N., (1978). The ultrastructure of the basilar papilla of the chick. *J. Comp. Neurol.* 181: 361-74.
- Hosli L., Hosli E., Della Briotta G., (1987). Electrophysiological evidence for adenosine receptors on astrocytes of cultured rat central nervous system. *Neurosci Lett* 79: 108–12
- Hossler F.E., Olson K.R., Musil G., McKamey M.I., (2002). Ultrastructure and blood supply of the tegmentum vasculosum in the cochlea of the duckling. *Hear Res.* 164: 155-65.
- Howard J, Hudspeth A.J., (1988). Compliance of the hair bundle associated with gating of mechano-electrical transduction channels in the bullfrog's saccular hair cell. *Neuron.* 1: 189–199.
- Hu B.H., Zheng X.Y., McFadden S.L., Kopke R.D., Henderson D., (1997). R-phenylisopropyladenosine attenuates noise-induced hearing loss in the chinchilla. *Hear Res.* 113: 198-206.
- Huang Z.L., Urade Y., Hayaishi O., (2011). The role of adenosine in the regulation of sleep. *Curr Top Med Chem.* 11: 1047-57.
- Hudspeth A. J. (1997). Mechanical amplification of stimuli by hair cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 480–86.
- Hudspeth A.J., (1985). The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells. *Science.* 230: 745-52.

- Hudspeth A.J., (2005). How the ear's works work: mechano-electrical transduction and amplification by hair cells? *C. R. Biologies* 328: 155–62.
- Hudspeth A.J., Lewis R.S., (1998). A model for electrical resonance and frequency tuning in saccular hair cells of the bull-frog, *Rana catesbeiana*. *J. Physiol.* 400: 275–97.
- Irons-Brown S.R., Jones T.A., (2004). Effects of selected pharmacological agents on avian auditory and vestibular compound action potentials. *Hear Res.* 195: 54-66.
- Ishiyama E., Cutt R.A., Keels E.W., (1970). Ultrastructure of the tegmentum vasculosum and transitional zone. *Ann. Otorhinolaryngol.* 79: 998-1009.
- Itoh R., (2013). Enzymatic properties and physiological roles of cytosolic 5'-nucleotidase II. *Curr Med Chem.*; 20: 4260-84.
- Jacobson K.A., Gao Z.G., (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 5: 247-64.
- Jacobson K.A., Stiles G.L., Ji. X-D., (1992) Chemical modification and irreversible inhibition of striatal A2A adenosine receptors. *Mol. Pharmacol.* 42: 123-33.
- Jacobson M.A., Johnson R.G., Luneau C.J., Salvatore C.A., (1995). Cloning and chromosomal localization of the human A2b adenosine receptor gene (ADORA2B) and its pseudogene. *Genomics.* 27: 374–76.
- Jajoo S., Mukherjea D., Kumar S., Sheth S., Kaur T., Rybak L.P., Ramkumar V., (2010). Role of beta-arrestin1/ERK MAP kinase pathway in regulating adenosine A1 receptor desensitization and recovery. *Am J Physiol Cell Physiol*; 298: C56-65.
- Johnson Z.L., Cheong C.G., Lee S.Y., (2012). Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å. *Nature.* 483: 489-93.
- Kachar B., Parakkal M., Kurc M., Zhao Y., Gillespie P.G., (2000). High-resolution structure of hair-cell tip links. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 13336-41.
- Kataoka Y., Ohmori H., (1994). Activation of glutamate receptors in response to membrane depolarization of hair cells isolated from chick cochlea. *J. Physiol.* 477: 403–14.
- Kataoka Y., Ohmori H., (1996). Of known neurotransmitters, glutamate is the most likely to be released from chick cochlear hair cells. *J. Neurophysiol.* 76: 1870-9.
- Kaur T., Borse V., Sheth S., Sheehan K., Ghosh S., Tupal S., Jajoo S., Mukherjea D., Rybak LP., Ramkumar V., (2016). Adenosine A1 Receptor Protects Against Cisplatin Ototoxicity by Suppressing the NOX3/STAT1 Inflammatory Pathway in the Cochlea. *J Neurosci.* 36:3962-77.
- Kawate T., Michel J.C., Birdsong W.T., Gouaux E., (2009). Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. *Nature.* 460: 592-98.

- Keibel A., Singh V., Sharma M.C., (2009). Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Curr. Pharm. Des.* 15: 1949–55.
- Khan A.F., Thorne P.R., Muñoz D.J., Wang C.J., Housley G.D., Vlajkovic S.M., (2007). Nucleoside transporter expression and adenosine uptake in the rat cochlea. *Neuroreport.* 18: 235-9.
- Khoa N.D., Postow M., Danielsson J., Cronstein B.N., (2006). Tumor necrosis factor- α prevents desensitization of G α s-coupled receptors by regulating GRK2 association with the plasma membrane. *Mol. Pharmacol.* 69: 1311–1319.
- Kimura M., Saitoh N., Takahashi T., (2003). Adenosine A1 receptor-mediated presynaptic inhibition at the calyx of Held of immature rats. *J Physiol.* 553: 415–26.
- King B.F., Townsend-Nicholson A., Wildman S.S., Thomas T., Spyer K.M., Burnstock G., (2000). Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci.* 20: 4871-7.
- Kitano I., Nario K., Mori N., Matsunaga T., (1995). The effect of protein kinase C stimulator and inhibitor on cochlear potentials in the guinea pig. *Hear Res.* 85:11-7.
- Kobayashi S., Zimmermann H., Millhorn D.E., (2000). Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport. *J. Neurochem.* 74: 621-32.
- Koda K., Salazar-Rodriguez M., Corti F., Chan N.Y., Estephan R., Silver R.B., Mochly-Rosen D., Levi R., (2010). Aldehyde dehydrogenase activation prevents reperfusion arrhythmias by inhibiting local renin release from cardiac mast cells. *Circulation.* 122: 771–81.
- Kollmar R., Montgomery L.G., Fak J., Henry L.J., Hudspeth A.J., (1997). Predominance of the α 1D subunit in L-type voltage-gated Ca²⁺ channels of hair cells in the chicken's cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 14883–8.
- Köppl C., (2011). Birds—same thing, but different? Convergent evolution in the avian and mammalian auditory systems provides informative comparative models. *Hear Res* 273: 65–71.
- Köppl C., (2015). Avian hearing. En: *Sturkie's Avian Physiology*. Ed. Scanes C.G., Elsevier Inc. Parte II. 6^a Ed. pp 71-84.
- Köppl C., Wegscheider A., Gleich O., Manley G.A., (2000). A quantitative study of cochlear afferent axons in birds. *Hear. Res.* 139: 123-43.
- Kull B., Svenningsson P., Fredholm B.B., (2000). Adenosine A2A receptors are colocalized with and activate Golf in rat striatum. *Mol. Pharmacol.* 58: 771–77.
- Kurian R., Krupp N.L., Saunders J.C., (2003). Tip link loss and recovery on chick short hair cells following intense exposure to sound. *Hear Res.* 181: 40-50.

- Latini S., Pedata F., (2001). Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem.* 2001 79: 463-84.
- Le F., Townsend-Nicholson A., Baker E., Sutherland G.R., Schofield P.R., (1996). Characterization and chromosomal localization of the human A2a adenosine receptor gene: ADORA2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223: 461-7.
- Lê K.T., Babinski K., Séguéla P., (1998). Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci.* 18: 7152-9.
- Lê K.T., Boué-Grabot E., Archambault V., Séguéla P., (1999). Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits. *J Biol Chem.* 274: 15415-9.
- Lee J.E., Bokoch G., Liang B.T., (2001). A novel cardioprotective role of RhoA: new signaling mechanism for adenosine. *FASEB J.* 15: 1886-94.
- Lehninger A.L., Cox M.M., (2006). Principios de bioquímica. En: Nucleótidos y Ácidos Nucleicos, Capítulo 8. Editorial Omega. 273-305.
- LeMasurier M., Gillespie P.G., (2005). Hair-cell mechanotransduction and cochlear amplification. *Neuron.* 48: 403-15.
- Lewis E.R., Leverenz E.L., Bialek, W.S., (1985). *The Vertebrate Ear.* CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Libert F., Parmentier M., Lefort A., Dinsart C., Van Sande J., Maenhaut C., Simons M.J., Dumont J.E., Vassart G., (1989). Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science.* 5; 244: 569-72.
- Libert F., Passage E., Parmentier M., Simons M.J., Vassart G., Mattei, M.G., (1991) Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and new subtype of serotonin receptor. *Genome* 11: 225-227.
- Libert F., Van Sande J., Lefort A., Czernilofsky A., Dumont J.E., Vassart G., Ensinger H.A., Mendla K.D., (1992). Cloning and functional characterization of a human A1 adenosine receptor. *Biochem Biophys Res Commun;* 187: 919-26.
- Linares X.E.C., (2007). Receptores Ionotrópicos a Glutamato en la Papila Basilar del pollo durante la ontogenia. Tesis de Maestría. Instituto de Fisiología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Linden J., (1991). Structure and function of A1 adenosine receptors. *FASEB J.* 5: 2668-76.
- Linden J., Auchampach J.A., Jin X., Figler R.A., (1998). The structure and function of A1 and A2B adenosine receptors, *Life Sci.* 62 1519-24.
- Liu Z., (1992). Experimental study on the mechanism of free radical in blast trauma induced hearing loss. *Chin. J. Otorhinolaryngol,* 27: 24-26.

- Longabaugh J.P., Didsbury J., Spiegel A., Stiles G.L., (1989). Modification of the rat adipocyte A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system during chronic exposure to an A1 adenosine receptor agonist: alterations in the quantity of GS alpha and Gi alpha are not associated with changes in their mRNAs. *Mol Pharmacol*; 36: 681-8.
- Lopes L.V., Rebola N., Pinheiro P.C., Richardson P.J., Oliveira C.R., Cunha R.A., (2003). Adenosine A3 receptors are located in neurons of the rat hippocampus. *NeuroReport* 14: 1645–48.
- Mabley J., Soriano F., Pacher P., Haskó G., Marton A., Wallace R., Salzman A., Szabó C., (2003). The adenosine A3 receptor agonist, N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronic acid, is protective in two murine models of colitis. *Eur. J. Pharmacol.* 466: 323–29.
- MacCollin M., Peterfreund R., MacDonald M., Fink J.S., Gusella J., (1994). Mapping of a human A2a adenosine receptor (ADORA2) to chromosome 22. *Genomics* 20:332–333.
- Madi L., Cohen S., Ochayin A., Bar-Yehuda S., Barer F., Fishman P., (2007). Over-expression of A3 adenosine receptor in PBMC of rheumatoid arthritis patients: Involvement of NF-κB in mediating receptor level. *J. Rheumatol.* 34: 20–26.
- Maenhaut C., Van Sande J., Libert F., Abramowicz M., Parmentier M., Vanderhaegen JJ., Dumont JE., Vassart G., Schiffmann S., (1990). RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 173: 1169-78.
- Mager R., Ferroni S., Schubert P., (1990). Adenosine modulates a voltage-dependent chloride conductance in cultured hippocampal neurons. *Brain research.* 532: 58–62.
- Malihi G., Elson E., Mascarenhas F., (2006). Effect of Adenosine Agonists on the Proliferation and Differentiation of Chick Embryo Fibroblasts in Three Dimensional Reconstituted Tissue Constructs. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics.* 5: 151-7
- Mammano F., (2013). ATP-dependent intercellular Ca²⁺-signaling in the developing cochlea: facts, fantasies and perspectives, *Semin. Cell Dev. Biol.* 24: 31–9.
- Manley G.A., (2000). Cochlear mechanisms from a phylogenetic viewpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; 97: 11736–43.
- Manley G.A., Clack J.A., (2004). An Outline of Evolution of Vertebrate Hearing. In *Evolution of the Vertebrate Auditory System*. Ed Manley G.A., Fay R.R., Popper A.N. Ed. Springer Handbook of Auditory Research. pp 1-26.
- Manley G.A., Gleich O., Kaiser A., Brix J., (1989). Functional differentiation of sensory cells in the avian auditory periphery. *J. Comp. Physiol. A.* 164: 289-96.

- Manley G.A., Kirk D.L., Köppl C., Yates G.K., (2001). In vivo evidence for a cochlear amplifier in the hair-cell bundle of lizards. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98: 2826-31.
- Manley G.A., Köppl C., (1998). Phylogenetic development of the cochlea and its innervation. *Curr Opin Neurobiol* 8: 468–74.
- Mann Z.F., Kelley M.W., (2011) Development of tonotopy in the auditory periphery. *Hear. Res.* 276: 2–15.
- Marcotti W., (2012). Functional assembly of mammalian cochlear hair cells. *Exp Physiol.* 97: 438–51.
- Markham R.G., Shimizu T., Lickliter R., (2008). Extrinsic Embryonic Sensory Stimulation Alters Multimodal Behavior and Cellular Activation. *Dev Neurobiol.* 68: 1463–73.
- Marquardt D.L., Walker L.L., Heinemann S., (1994). Cloning of two adenosine receptor subtypes from mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol.* 152: 4508–15.
- Martin L., Pingle S.C., Hallam D.M., Rybak L.P., Ramkumar V., (2006). Activation of the adenosine A3 receptor in RAW264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factor-kappaB and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 71–8.
- Martin P., Mehta A.D., Hudspeth A.J., (2000). Negative hair-bundle stiffness betrays a mechanism for mechanical amplification by the hair cell *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 12026–31.
- Martinez-Dunst C., Michaels R.L., Fuchs P.A., (1997). Release Sites and Calcium Channels in Hair Cells of the Chick's Cochlea. *J. Neurosci.* 17: 9133–44.
- Masino S, Boison D., (2013). Adenosine. A Key Link between Metabolism and Brain Activity. En: Park J, Gupta SR, editores. *Adenosine Metabolism, Adenosine Kinase, and Evolution.* Springer. New York: Springer. p.23-54.
- Matharu A.L., Mundell S.J., Benovic J.L., Kelly E., (2001). Rapid agonist-induced desensitization and internalization of the A(2B) adenosine receptor is mediated by a serine residue close to the COOH terminus. *J. Biol. Chem.* 276: 30199–207.
- Matthews T.M., Duncan R.K., Zidanic M., Michael T.H., Fuchs P.A., (2005). Cloning and characterization of SK2 channel from chicken short hair cells. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 191: 491-503.
- Mazzon C., Rampazzo C., Scaini M.C., Gallinaro L., Karlsson A., Meier C., Balzarini J., Reichard P., Bianchi V., (2003). Cytosolic and mitochondrial deoxyribonucleotidases: activity with substrate analogs, inhibitors and implications for therapy. *Biochem Pharmacol*; 66: 471-9.
- Meng F., Xie G.X., Chalmers D., Morgan C., Watson S.J. Jr., Akil H., (1994). Cloning and characterization of a pharmacologically distinct A1 adenosine receptor from guinea pig brain. *Brain Res Mol Brain Res*; 26: 143-55.

- Merighi S., Benini A., Mirandola P., Gessi S., Varani K., Leung E., MacLennan S., Baraldi P.G., Borea P.A., (2005). A3 adenosine receptors modulate hypoxia-inducible factor-1 α expression in human A375 melanoma cells. *Neoplasia*. 7: 894–903.
- Merighi S., Benini A., Mirandola P., Gessi S., Varani K., Leung E., MacLennan S., Borea P.A., (2006). Adenosine modulates vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1 in human glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol*. 72: 19–31.
- Merighi S., Benini A., Mirandola P., Gessi S., Varani K., Simioni C., Leung E., MacLennan S., Baraldi P.G., and Borea P.A., (2007). Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, and interleukin-8 expression in hypoxic human colon cancer cells. *Mol Pharmacol* 72: 395–406.
- Merighi S., Mirandola P., Varani K., Gessi S., Leung E., Baraldi P.G., Tabrizi M.A., Borea P.A., (2003). A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol Ther*. 100: 31–48.
- Merighi S., Varani K., Gessi S., Cattabriga E., Iannotta V., Ulouglu C., Leung E., Borea P.A., (2001). Pharmacological and biochemical characterization of adenosine receptors in the human malignant melanoma A375 cell line. *Br. J. Pharmacol*. 134: 1215–26.
- Meyerhof W., Müller-Brechlin R., Richter D., (1991). Molecular cloning of a novel putative G-protein coupled receptor expressed during rat spermiogenesis. *FEBS Lett* 284: 155–60.
- Mishra O.P., Wagerle L.C., Delivoria Papadopoulos M., (1988). 5'-Nucleotidase and adenosine deaminase in developing fetal guinea pig brain and the effect of maternal hypoxia. *Neurochem Res*. 13: 1055–60.
- Mogul D.J., Adams M.E., Fox A.P., (1993). Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca²⁺ current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron*. 10: 327–34.
- Morello S., Petrella A., Festa M., Popolo A., Monaco M., Vuttariello E., Chiappetta G., Parente L., Pinto A., (2008). CI-IB-MECA inhibits human thyroid cancer cell proliferation independently of A3 adenosine receptor activation. *Cancer Biol. Ther*. 7: 278–84.
- Morgan P.F., Deckert J., Nakajima T., Daval J.L., Marangos P.J., (1990). Late ontogenetic development of adenosine A1 receptor coupling to associated G-proteins in guinea pig cerebellum but not forebrain. *Mol Cell Biochem*. 92: 169–76
- Morgan P.F., Montgomery P., Marangos P.J., (1987). Ontogenetic profile of the adenosine uptake sites in rat forebrain. *J Neurochem*. 49: 852–5.
- Moro S., Spalluto G., Jacobson K.A., (2005). Techniques: Recent developments in computer-aided engineering of GPCR ligands using the human adenosine A3 receptor as an example. *Trends Pharmacol Sci*. 26: 44-51.

- Mundell S.J., Loudon R.P., Benovic J.L., (1999). Characterization of G protein-coupled receptor regulation in antisense mRNA-expressing cells with reduced arrestin levels. *Biochemistry*. 38: 8723–32.
- Mundell S.J., Luty J.S., Willets J., Benovic J.L., Kelly E., (1998). Enhanced expression of G protein-coupled receptor kinase 2 selectively increases the sensitivity of A2A adenosine receptors to agonist-induced desensitization. *Br. J. Pharmacol.* 125: 347–56.
- Mundell S.J., Matharu A.L., Kelly E., Benovic J.L., (2000). Arrestin isoforms dictate differential kinetics of A2B adenosine receptor trafficking. *Biochemistry*. 39: 12828–836.
- Muñoz D.J.B., Kendrick I.S., Rassam M., Thorne P.R., (2001). Vesicular storage of adenosine triphosphate in the guinea-pig cochlear lateral wall and concentrations of ATP in the endolymph during sound exposure and hypoxia. *Acta Otolaryngol.* 121: 10–15.
- Murrison E.M., Goodson S.J., Edbrooke M.R., and Harris C.A., (1996). Cloning and characterisation of the human adenosine A3 receptor gene. *FEBS Lett.* 384: 243–6.
- Murrow B.W., Fuchs P.A., (1990). Preferential expression of transient potassium current (IA) by 'short' hair cells of the chick's cochlea. *Proc Biol Sci.* 242: 189-95.
- Namba K., Suzuki T., Nakata H., (2010). Immunogold electron microscopic evidence of in situ formation of homo- and heteromeric purinergic adenosine A1 and P2Y2 receptors in rat brain. *BMC Res Notes.* 3: 323.
- Nario K., Kitano I., Mori N., Matsunaga T., (1994). The effect of adenosine on cochlear potentials in the guinea pig. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 251: 428-33.
- Neary J.T., McCarthy M., Kang Y., Zuniga S., (1998). Mitogenic signaling from P1 and P2 purinergic receptors to mitogen-activated protein kinase in human fetal astrocyte cultures. *Neurosci Lett.* 242: 159–62.
- Necker R., (1999). *The Avian Ear and Hearing: En: Sturkie's Avian Physiology.* Ed Whittow G.C. 5th Ed. Elsevier Science. pp 21-38.
- Nie Z., Mei Y., Ramkumar V., (1997). Short term desensitization of the A1 adenosine receptors in DDT1MF-2 cells. *Mol Pharmacol*; 52: 456-64.
- Nishimura S., Mohri M., Okada Y., Mori M., (1990). Excitatory and inhibitory effects of adenosine on the neurotransmission in the hippocampal slices of guinea pig. *Brain Research.* 525: 165–9
- Noji T., Karasawa A., Kusaka H., (2004). Adenosine uptake inhibitors. *Eur J Pharmacol.* 495: 1-16.
- Ochaion A., Bar-Yehuda S., Cohen S., Barer F., Patoka R., Amital H., Reitblat T., Reitblat A., Ophir J., Konfino I., Chowers Y., Ben-Horin S., Fishman P., (2009). The anti-inflammatory target A3 adenosine receptor is overexpressed in rheumatoid arthritis, psoriasis and Crohn's disease. *Cell. Immunol.* 258: 115–22.

- Oesterle E.C., Cunningham D.E., Rubel E.W., (1992). Ultrastructure of hyaline, border, and vacuole cells in chick inner ear. *J. Comp. Neurol.* 318: 64-82.
- Offermanns S., Simon, M.I., (1995) G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 270: 15175-80.
- Ohmori H., (1985). Mechano-electrical Transduction Currents in Isolated Vestibular Hair Cells of the Chick. *J. Physiol.* 359: 189-217.
- Okada Y, Sakurai T, Mori M., (1992). Excitatory effect of adenosine on neurotransmission is due to increase of transmitter release in the hippocampal slices. *Neurosci Lett.* 142: 233-6.
- Okada Y., Nishimura S., Miyamoto T., (1990). Excitatory effect of adenosine on neurotransmission in the slices of superior colliculus and hippocampus of guinea pig. *Neurosci Lett.* 120: 205-8.
- Olah M.E., (1997). Identification of A2a adenosine receptor domain involved in selective coupling to Gs: analysis of chimeric A1/A2a adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* 272: 337-344.
- Paes-de-Carvalho R., (1990). Development of A1 adenosine receptors in the chick embryo retina. *J Neurosci Res.* 25: 236-42.
- Palmer T.M., Benovic J.L., Stiles G.L., (1995). Agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A3 adenosine receptor. Evidence for a G-protein-coupled receptor kinase-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* 270: 29607-13.
- Palmer T.M., Gettys T.W., Jacobson K.A., Stiles G.L., (1994). Desensitization of the canine A2a adenosine receptor: delineation of multiple processes. *Mol. Pharmacol.* 45: 1082-94.
- Palmer T.M., Stiles G.L., (1997). Identification of an A2a adenosine receptor domain specifically responsible for mediating short-term desensitization. *Biochemistry.* 36: 832-38.
- Palmer T.M., Stiles G.L., (2000). Identification of threonine residues controlling the agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A(3) adenosine receptor. *Mol. Pharmacol.* 57: 539-45.
- Pantelias A.A., Monsivais P., Rubel E.W., (2001). Tonotopic map of potassium currents in chick auditory hair cells using an intact basilar papilla. *Hear Res.* 156: 81-94.
- Parsons WJ., Stiles GL., (1987). Heterologous desensitization of the inhibitory A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat adipocytes. Regulation of both Ns and Ni. *J. Biol. Chem.* 262: 841-847.
- Pérez C., Vega R., Soto E., (2010). Phospholipase C-mediated inhibition of the M potassium current by muscarinic-receptor activation in the vestibular primary-afferent neurons of the rat. *Neurosci Lett.* 468 :238-42.
- Peusner K.D., Giaume C., (1997). Ontogeny of electrophysiological properties and dendritic pattern in second order chick vestibular neurons. *J. comp. Neu.* Vol 284: 621-635.

- Piazza V., Ciubotaru C.D., Gale J.E., Mammano F., (2007). Purinergic signalling and intercellular Ca²⁺ wave propagation in the organ of Corti. *Cell Calcium*. 41: 77-86.
- Pierce K.D., Furlong T.J., Selbie L.A., Shine J., (1992). Molecular cloning and expression of an adenosine A_{2b} receptor from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 86-93.
- Podgorska M., Kocbuch K., Pawelczyk T., (2005). Prevalence of unidirectional Na⁺-dependent adenosine transport and altered potential for adenosine generation in diabetic cardiac myocytes. *Acta Biochim Pol.* 52(4): 749-758.
- Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Katz L.C., LaMantia A.-S., McNamara J.O., (2001). *Sistema Auditivo*. En: *Invitación a la Neurociencia*. Ed. Médica Panamericana. pp. 243-65.
- Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia A.-S., McNamara, J.O., Williams S.M., (2007). *El sistema Auditivo*. En *Neurociencia*. Ed Médica Panamericana. 3^a ed. 12: 283-314.
- Ralevic V., Burnstock G., (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 50: 413-92.
- Ramanathan K., Michael T.H., Jiang G.-J., Hiel H., Fuchs P.A., (1999). A Molecular Mechanism for Electrical Tuning of Cochlear Hair Cells. *Science*. 283: 215-17.
- Ramkumar V., Nie Z., Rybak L.P., Maggirwar S.B., (1995). Adenosine, antioxidant enzymes and cytoprotection. *Trends Pharmacol Sci.* 16: 283-5.
- Ramkumar V., Olah M.E., Jacobson K.A., Stiles G.L., (1991). Distinct pathways of desensitization of A₁- and A₂-adenosine receptors in DDT1 MF-2 cells. *Mol Pharmacol*; 40: 639-47.
- Ramkumar V., Ravi R., Wilson M.C., Gettys T.W., Whitworth C., Rybak L.P., (1994). Identification of A₁ adenosine receptors in rat cochlea coupled to inhibition of adenylyl cyclase. *Am J Physiol.* 267: C731-7.
- Ramkumar V., Whitworth C.A., Pingle S.C., Hughes L.F., Rybak L.P., (2004). Noise induces A₁ adenosine receptor expression in the chinchilla cochlea. *Hear Res.* 188: 47-56.
- Rebola N., Rodrigues R.J., Oliveira C.R., Cunha R.A., (2005). Different roles of adenosine A₁, A_{2A} and A₃ receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons, *Neurochemistry International* 47: 317–25.
- Rees D.C., Duley J.A., Marinaki M.A., (2003). Pyrimidine 5' Nucleotidase Deficiency. *Br. J. Haematol*; 120: 375–383.
- Reshef A., Sperling O., Zoref-Shani E., (2000). Opening of K(ATP) channels is mandatory for acquisition of ischemic tolerance by adenosine. *Neuroreport*. 11: 463-5.
- Revan S., Montesinos M.C., Naime D., Landau S., Cronstein B.N., (1996). Adenosine A₂ receptor occupancy regulates stimulated neutrophil function via activation of a serine/threonine protein phosphatase. *J Biol Chem.* 271: 17114-8.

- Richardson P.J., Brown S.J., Bailyes E.M., Luzio J.P., (1987). Ectoenzymes control adenosine modulation of immunoisolated cholinergic synapses. *Nature* 327: 232-4.
- Ritzel M.W., Ng A.M., Yao S.Y., Graham K., Loewen S.K., Smith K.M., Ritzel R.G., Mowles D.A., Carpenter P., Chen X.Z., Karpinski E., Hyde R.J., Baldwin S.A., Cass C.E., Young J.D., (2001). Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J Biol Chem.* 276: 2914-27.
- Ritzel M.W., Yao S.Y., Huang M.Y., Elliott J.F., Cass C.E., Young J.D., (1997). Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am J Physiol.* 272: C707-14.
- Ritzel M.W., Yao S.Y., Ng A.M., Mackey J.R., Cass C.E., (1998). Young J.D., Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine. *Mol Membr Biol.* 15: 203-11.
- Rivkees S.A., Reppert S.M., (1992). RFL9 encodes an A2b-adenosine receptor. *Mol. Endocrinol.* 6: 1598–1604.
- Robson S.C., Sévigny J., Zimmermann H., (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2: 409–30.
- Rocamora M., (2006). Física del sonido. En: *Apuntes de acústica musical. eMe (estudio de Música electroacústica).* Universidad de la República Oriental del Uruguay. Facultad de Artes.
- Rodríguez H.L., (2008). Receptores Metabotroicos a glutamato en la papila basilar del pollo (*Gallus domesticus*) durante el desarrollo embrionario. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Rombo D.M., Dias R.B., Duarte S.T., Ribeiro J.A., Lamsa K.P., Sebastião A.M., (2016). Adenosine A1 Receptor Suppresses Tonic GABAA Receptor Currents in Hippocampal Pyramidal Cells and in a Defined Subpopulation of Interneurons. *Cereb Cortex.* 26: 1081-95.
- Rosenblatt K.P., Sun Z.P., Heller S., Hudspeth A.J., (1997). Distribution of Ca²⁺-activated K⁺ channel isoforms along the tonotopic gradient of the chicken's cochlea. *Neuron.* 19: 1061-75.
- Ryals B.M., Rubel E.W., (1985). Differential susceptibility of avian hair cells to acoustic trauma. *Hear Res.* 19: 73-84.
- Ryals B.M., Westbrook E.W., (1994). TEM analysis of neural terminals on autoradiographically identified regenerated hair cells. *Hear Res.* 72: 81-8.
- Ryzhov S., Novitskiy S.V., Zaynagetdinov R., Goldstein A.E., Carbone D.P., Biaggioni I., Dikov M.M., Feoktistov I., (2008). Host A2B adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia.* 10: 987–95.
- Saito H., Nishimura M., Shinano H., Makita H., Tsujino I., Shibuya E., Sato F., Miyamoto K., Kawakami Y., (1999). Plasma concentration of adenosine during normoxia and moderate hypoxia in humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 159: 1014-8.

- Saito N., (1980). Structure and Function of the Avian Ear. En: Comparative Studies of Hearing in Vertebrates. Ed. Popper A.N., Fay R.R. Ed. Springer_Verlag New York In. pp 241-60.
- Sakamoto K., Yonoki Y., Kuwagata M., Saito M., Nakahara T., Ishii K., (2004)., Histological protection against ischemia-reperfusion injury by early ischemic preconditioning in rat retina. *Brain Res.* 1015: 154-60.
- San Román C.J., (2001). Los agonistas Dopaminérgicos en la prevención de la sordera experimental inducida por el ácido kaínico en la rata. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Departamento de Cirugía II. Universidad Complutense de Madrid.
- Schlötzer-Schrehardt U., Zenkel M., Decking U., Haubs D., Kruse F.E., Jünemann A., Coca-Prados M., Naumann G.O., (2005). Selective upregulation of the A3 adenosine receptor in eyes with pseudoexfoliation syndrome and glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 2023–34.
- Schmidt R.S, (1964). Blood supply of pigeon inner ear. *J. Comp. Neurol.* 123: 187-204.
- Schoen S.W., Graeber M.B., Kreutzberg G.W., (1987). Light and electron microscopical immunocytochemistry of 50-nucleotidase in rat cerebellum. *Histochemistry.* 87: 107-13.
- Schubert P., Keller F., Rudolphi K.A., (1993). Depression of synaptic transmission and evoked NMDA Ca²⁺ influx in hippocampal neurons by adenosine and its blockade by LTP or ischemia. *Drug Dev Res* 28: 399 – 405.
- Schulte, G., Fredholm, B.B., (2000). Human adenosine A1, A2A, A2B and A3 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2. *Mol. Pharmacol.* 58: 477–82.
- Schwartzkopff J., (1968). Structure and function of the ear and of the auditory brain áreas in birds. Ciba Foundation Symposium on Hearing. Mechanisms in vertebrates. Pag. 41-59.
- Sebastião A.M., Ribeiro J.A., (1996). Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 48: 167–89.
- Sheth S., Brito R., Mukherjea D., Rybak L.P., Ramkumar V., (2014). Adenosine receptors: expression, function and regulation. *Int J Mol Sci.* 15 :2024-52.
- Shryock J.C, Belardinelli L., (1997). Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol.* 79:2-10.
- Sleigh M. J., Casey M.B., (2014). Prenatal sensory experience affects hatching behavior in domestic chicks (*Gallus gallus*) and Japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*). *Developmental Psychobiology.* 56: 935–42
- Smith C.A., (1985). Inner ear. En Form and Function in birds. Ed. Academic Press, London. Vol 3. pp 273-310.
- Smolders J.W., Ding-Pfennigdorff D., Klinke R.A., (1995). Functional map of the pigeon basilar papilla: correlation of the properties of single auditory nerve fibres and their peripheral origin. *Hear. Res.* 92: 151-69.

- Socodato R., Brito R., Calaza K.C., Paes de Carvalho R., (2011). Developmental regulation of neuronal survival by adenosine in the in vitro and in vivo avian retina depends on a shift of signaling pathways leading to CREB phosphorylation or dephosphorylation. *J. Neurochem.* 116: 227–39
- Soma M., Nakayama T., Satoh M., Uwabo J., Rahmutula D., Takahashi Y., Fukuda N., Watanabe Y., Izumi Y., Kanmatsuse K., (1998). A T1083C polymorphism in the human adenosine A2a receptor gene is not associated with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 11: 1492-94.
- Soto E., Vega R., Budelli R., (2002). The receptor potential in type I and type II vestibular system hair cells: a model analysis. *Hear. Res.* 165: 35-47.
- Spassova M., Eisen M.D., Saunders J.C., Parsons T.D., (2001). Chick cochlear hair cell exocytosis mediated by dihydropyridine-sensitive calcium channels. *J Physiol.* 535: 689–96.
- Spelta V., Jiang L.-H., Surprenant A., North A., (2002). Kinetics of antagonist actions at rat P2X2/3 heteromeric receptors. *Br J Pharmacol.* 135: 1524–30.
- Stella S.L., Hu W.D., Vila A., Brecha N.C., (2007). Adenosine Inhibits Voltage-Dependent Ca²⁺ Influx in Cone Photoreceptor Terminals of the Tiger Salamander Retina. *J Neurosci Res.* 85: 1126–37.
- Stryer L., (1998). Metabolism: basic concepts and design. En Stryer L, ed. *Biochemistry*. New York: Freeman. pp. 443-62.
- Suh B.C., Kim T.D., Lee J.U., Seong J.K., Kim K.T., (2001). Pharmacological characterization of adenosine receptors in PGT-beta mouse pineal gland tumour cells. *Br. J. Pharmacol.* 134: 132–42.
- Sun X., Barnes S., Baldrige W.H., (2002). Adenosine inhibits calcium channel currents via A1 receptors on salamander retinal ganglion cells in a mini-slice preparation. *J Neurochem.* 81: 550-6.
- Surprenant A., Buell G., North R.A., (1995). P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends Neurosci.* 18: 224-9.
- Surprenant A., Schneider D.A., Wilson H.L., Galligan J.J., North R.A., (2000). Functional properties of heteromeric P2X(1/5) receptors expressed in HEK cells and excitatory junction potentials in guinea-pig submucosal arterioles. *J Auton Nerv Syst.* 81: 249-63.
- Suzuki T., Namba K., Tsuga H., Nakata H., (2006). Regulation of pharmacology by hetero-oligomerization between A1 adenosine receptor and P2Y2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 351: 559-65.
- Tabuchi K., Sakai S., Nakayama M., Nishimura B., Hayashi K., Hirose Y., Hara A., (2012). The effects of A1 and A2A adenosine receptor agonists on kainic acid excitotoxicity in the guinea pig cochlea. *Neurosci Lett.* 518: 60-3.
- Takasakaa T., Smith C.A., (1971). The structure and innervation of the pigeon's basilar papilla. *J. Ultrastruct. Res.* 35: 20-65.

- Tan X., Beurg M., Hackney C., Mahendrasingam S., Fettiplace R., (2013). Electrical tuning and transduction in short hair cells of the chicken auditory papilla. *J. Neurophysiol.* 109: 2007-20.
- Tanaka K., Smith C.A., (1978). Structure of the chicken's inner ear: SEM and TEM study. *Am. J. Anat.* 153:251-71.
- Terrian D.M., Hernandez P.G., Rea M.A., Peters R.I., (1989). ATP release, adenosine formation, and modulation of dynorphin and glutamic acid release by adenosine analogues in rat hippocampal mossy fiber synaptosomes. *J. Neurochem.* 53:1390-9.
- Thomas S., Virginio C., North A., Surprenant A., (1998). The antagonist trinitrophenyl-ATP reveals co-existence of distinct P2X receptor channels in rat nodose neurones. *J Physiol.* 509: 411-7.
- Thorn J.A., Jarvis S.M., (1996). Adenosine transporters. *General Pharmacol.* 27: 613-20.
- Tilney L.G., Tilney M.S., Saunders J.S., DeRosier D.J., (1986). Actin filaments, stereocilia, and hair cells of the bird cochlea. III. The development and differentiation of hair cells and stereocilia. *Dev. Biol.* 116: 100–18.
- Tilney L.G., y Saunders J.C., (1983). Actin Filaments, Stereocilia, and Hair Cells of the Bird Cochlea I. Length, Number, Width, and Distribution of Stereocilia of Each Hair Cell Are Related to the Position of the Hair Cell on the Cochlea. *The Journal of Cell Biology*; 96: 807-21.
- Todorov L.D., Mihaylova-Todorova S., Westfall T.D., Sneddon P., Kennedy C., Bjur R.A., Westfall D.P., (1997). Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature.* 387: 76-9.
- Torres G.E., Egan T.M., Voigt M.M., (1999). Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem.* 274: 6653-9.
- Townsend-Nicholson A., Baker E., Sutherland G.R., Schofield P.R., (1995). Localization of the adenosine A2b receptor subtype gene (ADORA2B) to chromosome 17p11.2-p12 by FISH and PCR screening of somatic cell hybrids. *Genomics.* 25: 605–07.
- Trincavelli M.L., Marroni M., Tuscano D., Ceruti S., Mazzola A., Mitro N., Abbracchio M.P., Martini C., (2004). Regulation of A2B adenosine receptor functioning by tumour necrosis factor α in human astroglial cells. *J. Neurochem.* 91 1180–90.
- Trincavelli M.L., Tuscano D., Marroni M., Falleni A., Gremigni V., Ceruti S., Abbracchio M.P., Jacobson K.A., Cattabeni F., Martini C., (2002). A3 adenosine receptors in human astrocytoma cells: agonist-mediated desensitization, internalization, and down-regulation. *Mol. Pharmacol.* 62: 1373–84.
- Tritsch N.X., Yi E., Gale J.E., Glowatzki E., Bergles D.E., (2007). The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. *Nature.* 450: 50-5.
- Tucker A.L. y Linden J., (1993). Cloned receptors and cardiovascular responses to adenosine. *Cardiovasc. Res.* 27: 62-67.

- Tucker A.L., Jia L., Holeton D., Taylor A.J., Linden J., (2000). Dominance of Gs in doubly Gs/Gi-coupled chimaeric A1/A2A adenosine receptors in HEK-293 cells. *Biochem. J.* 352: 203-10.
- Tucker AL, Linden J, Robeva AS, D'Angelo DD, Lynch KR., (1992). Cloning and expression of a bovine adenosine A1 receptor cDNA. *FEBS Lett*; 297: 107-11.
- Umemiya M., Berger A.J., (1994). Activation of adenosine A1 and A2 receptors differentially modulates calcium channels and glycinergic synaptic transmission in rat brainstem. *Neuron.* 13: 1439–46.
- Umemoto M., Sakagami M., Fukazawa K., Ashida K., Kubo T., Senda T., Yoneda Y., (1995). Hair cell regeneration in the chick inner ear following acoustic trauma: ultrastructural and immunohistochemical studies. *Cell Tissue Res.* 281: 435-43.
- Usami S., Igarashi M., Thompson G.C., (1987). GABA-like immunoreactivity in the chick basilar papilla and the lagenar macula. *Hear. Res.* 30: 19-22.
- Van Calker D., Muller M., Hamprecht B., (1978). Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature.* 276: 839–841.
- Van Calker D., Muller M., Hamprecht B., (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem*; 33: 999-1005.
- Vickers M.F., Mani R.S., Sundaram M., Hogue D.L., Young J.D., Baldwin S.A., Cass C.E., (1999). Functional production and reconstitution of the human equilibrative nucleoside transporter (hENT1) in *Saccharomyces cerevisiae*. Interaction of inhibitors of nucleoside transport with recombinant hENT1 and a glycosylation-defective derivative (hENT1/N48Q). *Biochem J.* 339: 21-32.
- Virginio C., North R.A., Surprenant A., (1998). Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X2 and P2X3 receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones. *J Physiol.* 510: 27-35.
- Vlajkovic S.M., Abi S., Wang C.J., Housley G.D., Thorne P.R., (2007). Differential distribution of adenosine receptors in rat cochlea. *Cell Tissue Res.* 328: 461-71.
- Vlajkovic S.M., Ambepitiya K., Barclay M., Boison D., Housley G.D., Thorne P.R., (2016). Adenosine receptors regulate susceptibility to noise-induced neural injury in the mouse cochlea and hearing loss. *Hear Res.* 345: 43-51.
- Vlajkovic S.M., Guo C.X., Telang R., Wong A.C., Paramanathasivam V., Boison D., Housley G.D., Thorne P.R., (2011). Adenosine kinase inhibition in the cochlea delays the onset of age-related hearing loss. *Exp Gerontol.* 46: 905-14.
- Vlajkovic S.M., Lee K.H., Wong A.C., Guo C.X., Gupta R., Housley G.D., Thorne P.R., (2010). Adenosine amine congener mitigates noise-induced cochlear injury. *Purinergic Signal.* 6(2):273-81.

- Vollrath M.A., Kwan K.Y., Corey D.P., (2007). The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annu Rev Neurosci* 30: 339-65.
- Von Düring M., Andres K.H., Simon K., (1985). The comparative anatomy of the basilar papillae in birds. *Fortschr Zool.* 30: 681-685.
- Wan T.C., Ge Z.D., Tampo A., Mio Y., Bienengraeber M.W., Tracey W.R., Gross G.J., Kwok W.M., Auchampach J.A., (2008). The A3 adenosine receptor agonist CP-532,903 [N6-(2,5-dichlorobenzyl)-39-aminoadenosine-59-N-methylcarboxamide] protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via the sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel. *J Pharmacol Exp Ther.* 324: 234–43.
- Ward J.L., Leung G.P., Toan S.V., Tse C.M., (2003). Functional analysis of site-directed glycosylation mutants of the human equilibrative nucleoside transporter-2. *Arch Biochem Biophys.* 411: 19-26.
- Weaver D.R., (1996). A1-adenosine receptor gene expression in fetal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 94: 205–23.
- Whitworth C.A., Ramkumar V., Jones B., Tsukasaki N., Rybak L.P., (2004). Protection against cisplatin ototoxicity by adenosine agonists. *Biochem Pharmacol.* 67: 1801-7.
- Wilson J.D, Buffa A.J., (2003). *Sonido: En: Física. 5ª Edición. PEARSON EDUCACION.*
- Wirkner K., Assmann H., Köles L., Gerevich Z., Franke H., Nörenberg W., Boehm R., Illes P., (2000). Inhibition by adenosine A2A receptors of NMDA but not AMPA currents in rat neostriatal neurons. *Br J Pharmacol.* 130: 259–69.
- Wong A.C., Guo C.X., Gupta R., Housley G.D., Thorne P.R., Vlajkovic S.M., (2010). Post exposure administration of A₁ adenosine receptor agonists attenuates noise-induced hearing loss. *Hear Res.* 260: 81-8.
- Wu L.G., Saggau P., (1994). Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron.* 12: 1139-48.
- Wu Y.-C., Art J.J., Goodman M.B., Fettiplace R., (1995). A kinetic description of the calcium-activated potassium channel and its application to electrical tuning of hair cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 63: 131-58.
- Wu Y.-N., Shen K.-Z., Johnson S.W., (1999). Presynaptic inhibition preferentially reduces the NMDA receptor-mediated component of transmission in rat midbrain dopamine neurons. *Br J Pharmacol.* 127: 1422–30.
- Yaar R., Lamperti E.D., Toselli P.A., Ravid K., (2002). Activity of the A3 adenosine receptor gene promoter in transgenic mice: characterization of previously unidentified sites of expression. *FEBS Lett.* 532: 267–72.
- Yamaguchi K., Ohmori H., (1990). Voltage-gated and chemically gated ionic channels in the cultured cochlear ganglion neurone of the chick. *J. Physiol.* 420: 185–206.

- Yamaguchi K., Ohmori H., (1993). Suppression of the slow K⁺ current by cholinergic agonists in cultured chick cochlear ganglion neurones. *J Physiol.* 464: 213-28.
- Yao Y., Sei Y., Abbracchio M.P., Jiang J.L., Kim Y.C., Jacobson K.A., (1997). Adenosine A3 receptor agonists protect HL-60 and U-937 cells from apoptosis induced by A3 antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232: 317-22.
- Ying S., Pingbo H., (2016). Adenosine A2B Receptor: From Cell Biology to Human Diseases. *Front Chem.* 4: 37.
- Zhang M., Hu H., Zhang X., Lu W., Lim J., Eysteinnsson T., Jacobson K.A, Laties A.M, Mitchell C.H., (2010). The A3 adenosine receptor attenuates the calcium rise triggered by NMDA receptors in retinal ganglion cells. *Neurochem Int.* 56: 35–41.
- Zheng J., Wang R., Zambraski E., Wu D., Jacobson K.A., Liang B.T., (2007). A novel protective action of adenosine A3 receptors: attenuation of skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:3685–91.
- Zhou Q.Y., Li C., Olah M.E., Johnson R.A., Stiles G.L., Civelli O., (1992). Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7432–36.
- Zidanic M., (2002). Cholinergic innervation of the chick basilar papilla. *J. Comp. Neurol.* 445: 159-75.
- Zidanic M., Fuchs P.A., (1995b). Kinetic analysis of barium currents in chick cochlear hair cells. *Biophys J.* 68: 1323-36.
- Zidanic M., Fuchs, P.A., (1995a). Efferent innervation of the chick cochlea revealed by antibodies to choline acetyltransferase (ChAT) and synapsin. *Assoc. Res. Otolaryngol.* 18: 770.
- Zimmermann H., (2001). Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res.* 52: 44–56.
- Zimmermann H., Braun N., Kegel B., Heine P., (1998). New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. *Neurochem Int.*; 32:421-5.