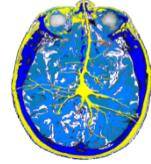




Programa Magister  
**NEUROCIENCIA**



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**MENCION NEUROCIENCIA**

**PAPEL DE HEMICANALES EN EL DAÑO AUDITIVO INDUCIDO  
POR RUIDO MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTOR DE  
ADENOSINA A<sub>2A</sub>**

*Yesenia de Lourdes Torres Manríquez*

**Tesis para optar al grado de**

**Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

**Directores de Tesis:**

**Prof. Dr. Agustín Martínez Carrasco**

**Prof. Dr. Carlos Escudero Orozco**



**PROGRAMA MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MENCIÓN NEUROCIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE VALPARAISO**

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Coordinación de Post-Grado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata**

**YESENIA DE LOURDES TORRES MANRÍQUEZ**

**Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencia, en el examen de defensa de Tesis rendido el 01 de Octubre de 2020**

**Directores de Tesis:**

**Prof. Dr. Agustín D. Martínez Carrasco. ....**

**Prof. Dr. Carlos Escudero Orozco. ....**

**Evaluadores:**

**Prof. Dr. ORL Juan Cristóbal Maas .....**

**Prof. Dra. Helmuth Sánchez. ....**

**Prof. Dr. Pável Prado .....**

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Sin duda han sido largos años de estudio y dedicación que gracias a Dios se han podido concretar en este escrito.

Agradezco a mis padres, hermanos (Camilo, Valentina y Evelyn), pareja (Rodrigo), cuñada (Paula), amigos y amigas que han sido parte de este hermoso y sacrificado proceso.

Agradezco mis profesores guías de tesis Dr. Escudero y Dr Martínez, por la paciencia, entrega y disposición a enseñarme, y a mis queridos colegas y amigos que estuvieron ahí en los momentos buenos y sobretodo en los malos, en especial a Pavel Prado, Hellmuth Sánchez, Jaime Maripillán, Ana Abbott, Jesenia Acurio, Felipe Troncoso, Jose León y Daphne Marfull.

Agradezco también al Centro Interdisciplinario de Neurociencia de la Universidad de Valparaíso, Laboratorio de Fisiología Vascul ar de la Universidad del Bío-Bío, Laboratorio de comunicación intercelular, Laboratorio de fonoaudiología de la Universidad de Valparaíso, a becas conicyt, a los proyectos Fondecyt de mis profesores tutores

Dedicado a todos/as los/as que buscamos verdades y perseguimos nuestros sueños

## INDICE

INDICE	4
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	3
ABREVIATURAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	10
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	16
Fisiología de la audición en el oído interno	19
Mecanismos de protección auditiva	20
Pérdida auditiva o hipoacusia	22
Trauma acústico agudo e hipoacusia inducida por ruido	23
Hemicanales de conexina y su expresión en la cóclea	26
Adenosina	27
Receptores de adenosina y su expresión en la cóclea	29
Receptor A <sub>2A</sub> de adenosina y Ototoxicidad	33
OBJETIVOS	36
Objetivo General	36
Objetivos Específicos	36
MATERIALES Y MÉTODOS	38
Extracción de RNA y transcripción reversa	39
PCR no cuantitativo	39
Modelo de daño auditivo inducido por ruido	40
Evaluación de la audición	40
Explantes cocleares	41

Estado funcional de los hemicanales frente a la activación del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> mediante captación de etidio	42
Estado funcional de los Hemicanales frente a la inactivación del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> mediante captación de Etidio	44
Análisis estadísticos	46
RESULTADOS	47
Expresión de receptores de adenosina en cóclea de ratones C57BL/6	47
Efecto de la eliminación del gen del receptor de Adenosina A <sub>2A</sub> en los umbrales auditivos de ratones expuestos a ruido	47
Efecto de agonistas y antagonistas del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> en el estado funcional de hemicanales en la cóclea mediante la captación de tasadores fluorescentes.	49
DISCUSIÓN	58
ANEXOS	62
BIBLIOGRAFIA	67

## **ABREVIATURAS**

A<sub>1</sub> AR: Receptor de adenosina A<sub>1</sub>.

A<sub>2A</sub>AR: Receptor de adenosina A<sub>2A</sub>

A<sub>2B</sub> AR: Receptor de adenosina A<sub>2B</sub>.

A<sub>3</sub> AR: Receptor de adenosina A<sub>3</sub>.

A<sub>2A</sub>KO: Ratón deficiente para el receptor A<sub>2A</sub> de adenosina

ABR: Auditory Brainstem Response

ADAC: Adenosine Amine Congener

ATP: Trifosfato de Adenosina.

AMP: Adenosin Monofosfato

Au/min: Tasa de absorción del tinte

BC: Células Boettcher

BM: Membrana Basilar

Ca<sup>2+</sup>: Ion calcio.

Ca<sup>+</sup>: calcio

C: Control.

CAE: Conducto Auditivo Externo

CC: Células de Claudius

CCE: células ciliadas externas

CCI: células ciliadas internas

cd: cluster of differentiation

CD39: ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1

CD73: ecto-5'-nucleotidasa

CGS21680: agonista específico del receptor del subtipo de adenosina A<sub>2A</sub>

CI: Colículo Inferior

CIE 10: Clasificación Internacional de las Enfermedades (10ª edición)

COS: Complejo Olivar Superior

CS: Células de sostén

CNTs: Transportadores de Nucleósidos Concentrativos

Cxs: Conexinas

Cx 26: Conexina 26.

cAMP: Adenosín mono fosfato cíclico

cGMP: Guanosín mono fosfato cíclico

DAIR: Réficit Auditivo Inducido por Ruido

dB: Decibel

DC: Células de Deiters

DTU: Descenso Temporal del Umbral

DPU: Descenso Permanente del Umbral

EGTA: 10.0 ácido etilén-bis(oxonitrilo)-tetracético.

ENTs: Transportadores de Nucleósidos Equilibrativos

ERK: Kinasa Regulada por señal Extracelular

HC: Células de Hensen

HCS: Hemicanales

HIR: Hipoacusia inducida por ruido

IBC: Células del Limbo espiral

IHC: células ciliadas internas

IPhCs: Células Falangeales internas

IPC: Células pilar interno

ISC: Células del surco interno

JNK: c-Jun N-terminal kinase

K<sup>+</sup>: Ion potasio.

Kg: Kilógramo

Khertz: Kilo Hertz

MAPK: Proteína Kinasa Activada por Mitógenos

mg: Miligramos

ml: Mililitros.

ms: milisegundos

mM: Milimolar.

mV: Microvoltio.

Na: Sodio

NF-KB: Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas

PCR: Proteína C Reactiva

P8: día postnatal 8

μl: Microlitro.

μM: Micromolar.

OHC: células ciliadas externas

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPC: Células pilar externo

PAIR: Pérdida Auditiva Inducida por Ruido

PKA: Protein Kinasa A

PFA: Paraformaldehido.

PEATC: Potencial Evocado Auditivo de Tronco Cerebral

RER: Retículo Endoplasmático Rugoso

RI: Ruido de tipo Impulsivo

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

SGN: Neuronas ganglionares espirales

TM: Membrana Tectorial

WT: ratón control

ZM 241385: antagonista del receptor del subtipo de adenosina A<sub>2A</sub>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág.
Figura 1. Cóclea en su porción ósea (A) y membranosa (B).	16
Figura 2. Órgano de Corti y esterocilios	17
Figura 3. Órgano de corti y Células del órgano de corti.	19
Figura 4. Producción de adenosina, transporte y metabolismo.	28
Figura 5. Cronograma de Experimentos de Modelo de daño auditivo inducido por ruido.	41
Figura 6. Cronograma de Experimentos de Captación de etidio en epitelio coclear expuesto a diferentes concentraciones de agonista del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> (CGS-21680).	44
Figura 7. Cronograma de Experimentos de Captación de etidio en epitelio coclear expuesto a diferentes concentraciones de antagonista del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> (ZM-241385).	45
Figura 8. Expresión del receptor de adenosina en la cóclea de ratón C57BL/6.	47
Figura 9. Evaluación de la audición de 3 ratones WT (A,B y C) y 3 ratones A <sub>2A</sub> KO (D, E y F).	48
Figura 10. Generación de gráficos de pendientes de captación.	49
Figura 11. Captación de Etidio en células de sostén del epitelio coclear expuesto a distintas concentraciones de agonista del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> (CG21680).	50
Figura 12. Captación de etidio en células ciliadas externas del epitelio coclear expuesto a distintas concentraciones de agonista del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> (CGS 21680).	52

---

Figura 13. Captación de etidio en células ciliadas internas del epitelio coclear expuesto a distintas concentraciones de agonista del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> (CGS 21680).	53
Figura 14. Captación de etidio en células de sostén de epitelio coclear expuesto a distintas concentraciones de antagonista del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> (ZM- 241385).	54
Figura 15. Captación de etidio en células ciliadas externas de epitelio coclear expuesto a distintas concentraciones de antagonista del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> (ZM-241385).	56
Figura 16. Captación de etidio en células ciliadas internas de epitelio coclear expuesto a distintas concentraciones de antagonista del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> (ZM-241385).	57
Tabla 1. Receptores de Adenosina en la Cóclea	32
Figura Suplementaria 1. Receptores de adenosina y producción de cAMP	64
Figura Suplementaria 2. Receptores de adenosina en cóclea	64
Figura Suplementaria 3. Receptor de adenosina	65
Figura Suplementaria 4. Captación de Bromuro de Etidio en Cóclea expuesta a distintas concentraciones de agonista del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> (CG21680).	65
Figura Suplementaria 5. Captación de Bromuro de Etidio en Cóclea expuesta a distintas concentraciones de antagonista del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> (ZM-241385).	66
Tabla Suplementaria 1. Análisis animales utilizados.	62
Tabla Suplementaria 2. Secuencia de Partidores utilizados.	63

---

## RESUMEN

**Antecedentes:** La pérdida auditiva inducida por ruido es una de las principales causas de pérdida auditiva adquirida. En ella se producen distintas alteraciones estructurales y funcionales en la cóclea. Diversos estudios han vinculado a la adenosina como un otoprotectores contra el daño oxidativo, regulando la actividad de los canales iónicos y la liberación de neurotransmisores. En este sentido, previas investigaciones farmacológicas sugieren que la activación del receptor  $A_1$  genera una otoprotección frente a la exposición a ruido y a cisplatino, mediante su capacidad de incrementar la producción de enzimas antioxidantes, su acción anti inflamatoria y la estimulación de la adenilatociclasa. Lo anterior contrarresta tanto los efectos de las especies reactivas de oxígeno y de la ototoxicidad del glutamato. Por su parte, el receptor  $A_{2A}$  ha sido vinculado a exacerbación de la ototoxicidad producida por el cisplatino, pero no se conoce su mecanismo. Estudios previos sugieren que los hemicanales de conexina y panexina están involucrados en la sordera de tipo no sindrómica y el daño coclear, pero su participación en la pérdida auditiva inducida por ruido aún no se ha demostrado. Presumimos que la activación receptor  $A_{2A}$  induce la apertura de hemicanales que contribuyen al daño coclear en la pérdida auditiva inducida por ruido.

**Objetivo:** Estudiar el estado funcional de hemicanales en cócleas de ratones WT y deficientes para el receptor  $A_{2A}$  de adenosina ( $A_{2A}$  KO) expuestos a ruido nocivo.

**Metodología** se investigó el rol de la adenosina en la expresión de los hemicanales mediante técnicas de explante coclear, evaluación de funcionalidad de la vía auditiva mediante Potenciales evocados auditivos, inmunocitoquímica, PCR y captación de moléculas fluorescentes.

**Resultados:** Los análisis de RT-PCR permitieron evidenciar que el mRNA de los receptores de adenosina A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> A<sub>3</sub> están presentes en el epitelio coclear. Por otro lado, tras la exposición a ruido, los umbrales auditivos pre y post exposición a ruido de los animales deficientes del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> no sufrieron cambios significativos. Por el contrario, los ratones de tipo salvaje presentan un aumento de la respuesta del umbral auditivo después de la exposición a ruido, lo que indica un daño auditivo irreversible. Por su parte, el agonista de adenosina A<sub>2A</sub> (CGS-21680) modificó la permeabilidad de canales presentes en las células ciliadas, no así en las células de sostén. Lo anterior no ocurrió con la exposición a antagonista del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (ZM-241385), pues no se observaron cambios significativos en las células del epitelio coclear.

**Conclusiones:** La eliminación del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> protege contra la pérdida auditiva inducida por el ruido, lo que sugiere que la activación de este receptor causa daño coclear durante la exposición al ruido dañino. Después de los análisis realizados, no pudimos observar una relación directa entre la activación o inhibición del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> y la actividad de los hemicanales en las células de soporte. Sin embargo, encontramos cambios significativos en la permeabilidad de la membrana de las células ciliadas, lo que sugiere que hay otros canales que podrían estar involucrados en el daño de las células ciliadas.

**Palabras clave:** A<sub>2A</sub> AR, Hipoacusia inducida por ruido, hemicanales de conexina, adenosina.

## **ABSTRACT**

**Background:** Noise-induced hearing loss is one of the leading causes of acquired hearing loss. In it, different structural and functional alterations occur in the cochlea. Various studies have released adenosine as an otoprotector against oxidative damage, regulating the activity of ion channels and the release of neurotransmitters. In this sense, previous pharmacological investigations that the activation of the A<sub>1</sub> receptor generates an otoprotection against exposure to noise and cisplatin, through its ability to increase the production of antioxidant enzymes, its anti-inflammatory action and the stimulation of adenylyl cyclase. This counteracts both the effects of reactive oxygen species and glutamate ototoxicity. For its part, the A<sub>2A</sub> receptor has been linked to an exacerbation of ototoxicity caused by cisplatin, through unknown mechanisms. Previous studies suggest that hemichannels made by Connexins or Pannexins are involved in syndromic deafness and cochlear damage, but its involvement in noise-induced hearing loss have not been determined yet. We hypothesized that activation of adenosine A<sub>2A</sub> receptors induce the opening of hemichannels contributing to the cochlear damage in noise-induced hearing loss.

**Objective:** To study the functional status of hemichannels in cochleae of WT mice and deficient for the A<sub>2A</sub> adenosine receptor (A<sub>2A</sub> KO) exposed to harmful noise.

**Methodology:** The role of adenosine in the expression of hemichannels was investigated using cochlear explant techniques, evaluation of the functionality of the auditory pathway using auditory evoked potentials, immunocytochemistry, PCR, and uptake of fluorescent molecules.

**Results:** RT-PCR analyzes showed that el mRNA of adenosine A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> and A<sub>3</sub> receptors are present in the cochlear epithelium. On the other hand, after noise exposure, the pre and post noise exposure thresholds of the adenosine A<sub>2A</sub> receptor deficient animals did not undergo significant changes. On contrary, wild type mice present increased auditory threshold response after exposure to noise, indicating a irreversible hearing damage. For its part, the adenosine agonist A<sub>2A</sub> (CGS-21680) modified the permeability of channels present in hair cells, but not in supporting cells. This did not occur with exposure to the adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist (ZM-241385), since no significant changes were observed in the cochlear epithelial cells.

**Conclusions:** Elimination of adenosine A<sub>2A</sub> receptor is protecting from noise-induced hearing loss, suggesting that activation of this receptor cause cochlear damage during harmful noise exposure. After the analyzes carried out, we could not observe a direct relationship between activation or inhibition of the adenosine A<sub>2A</sub> receptor and the activity of hemichannels in the support cells. However, we find significant changes in the membrane permeability of hair cells, suggesting that there are other channels that could be involved in hair cell damage.

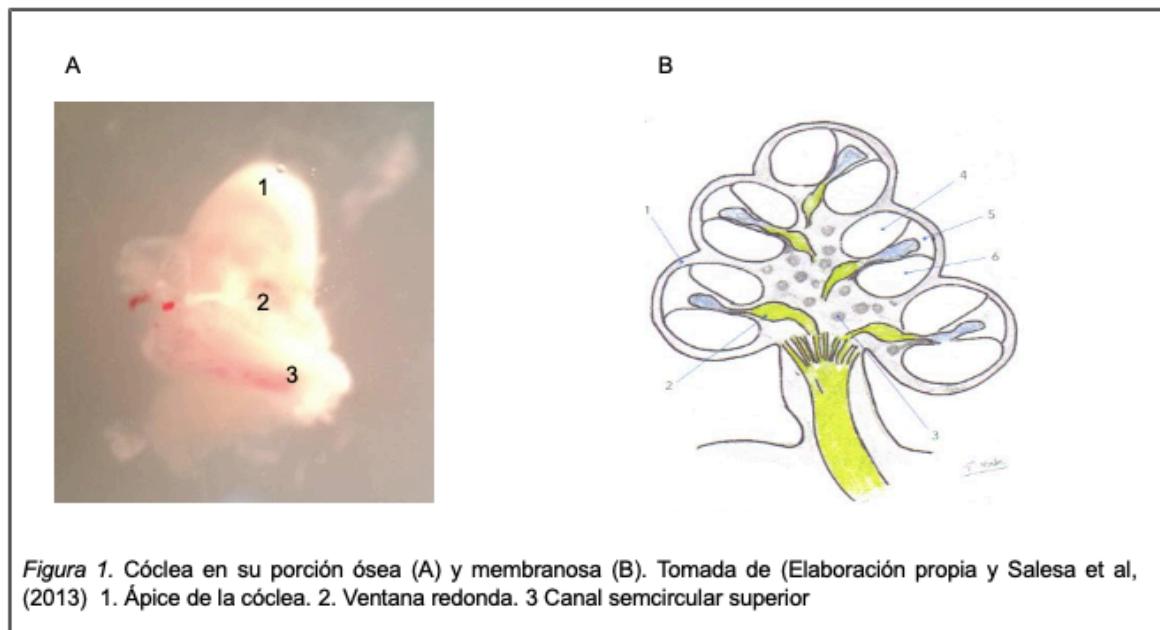
**Key words:** A<sub>2A</sub> AR, Noise-induced hearing loss, connexin hemichannels, adenosine.

## INTRODUCCIÓN

La audición es un sentido fundamental para la comunicación humana y su alteración genera lo que se denomina pérdida auditiva, que afecta a cerca de 400 millones de personas en todo el mundo (OMS, 2020).

El oído es el órgano sensorial capaz de convertir las vibraciones mecánicas (sonido) en impulsos nerviosos que son procesados en el cerebro (De Sebastián, 1999) y se conforma de tres partes: oído externo, oído medio y oído interno.

En este último apartado se encuentra la cóclea, y en ella el epitelio sensorial coclear, una estructura con forma de tubo espiral enrollado, de dos vueltas y media (Salesa, B., Perello, S., Bonavida, E, 2013). Esta estructura presenta una distribución tonotópica, con recepción de frecuencias agudas en la base, graves en el ápice y medias entre ambas.

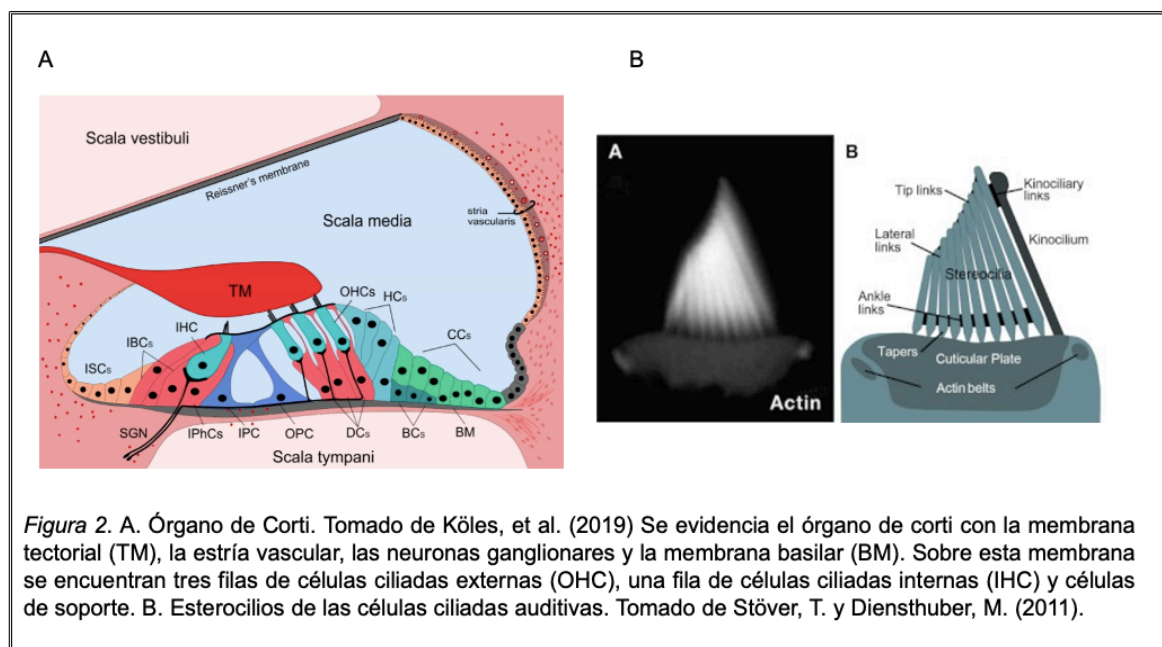


La cóclea tiene como eje un tubo óseo, sobre el cual gira la cóclea, que se denomina modiolo. La cóclea se subdivide en tres escalas, la vestibular, la media y la timpánica. Estas presentan dos tipos de líquido, la endolinfa, que es rica en potasio y que está presente en la escala media; y la perilinfa, que es rica en sodio y está presente en las escalas vestibular y timpánica (Patuzzi, 2011; Rivas, J., Ariza, H, 2007).

La diferencia de potenciales eléctricos entre los líquidos cocleares genera lo que se denomina potencial endococlear. Este potencial evidencia que la endolinfa es aproximadamente 80 a 100 mV más positiva que la perilinfa. Esta diferencia electroquímica genera la fuerza para el flujo de iones en las células ciliadas, y con ello permite la despolarización (Patuzzi, 2011).

La escala media se encuentra delimitada por la membrana de Reissner (que la separa de la escala vestibular) y por la membrana basilar (que la separa de la escala timpánica) se encuentra el Órgano de Corti, que a su vez contiene el receptor auditivo (células ciliadas mecanotransductoras)

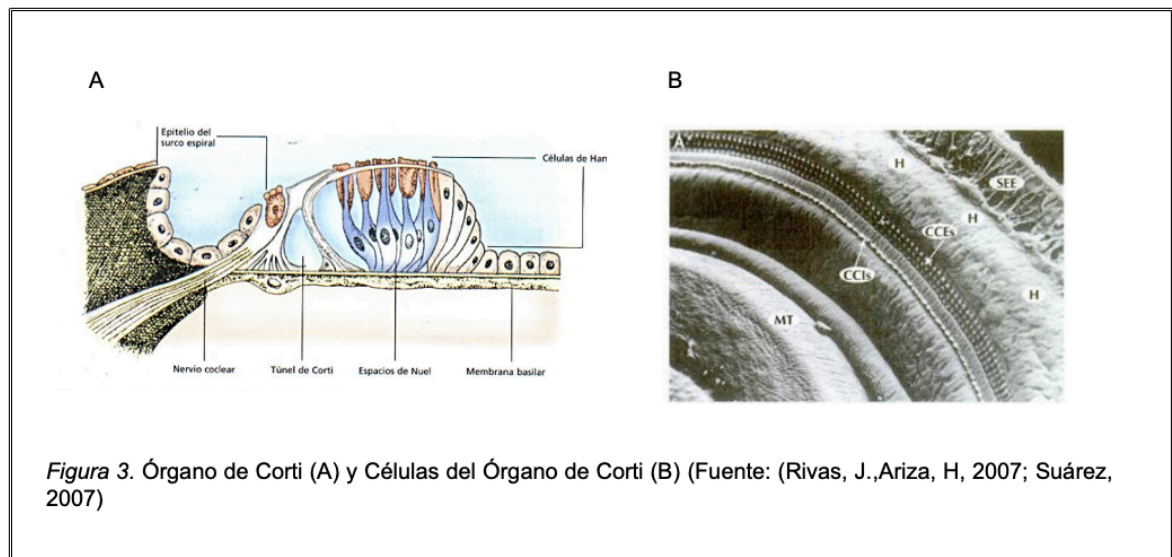
El órgano de Corti se encuentra ubicado sobre la membrana basilar y alberga a las células ciliadas, epiteliales y las de soporte. Las primeras están organizadas en dos tipos, las células ciliadas externas y las células ciliadas internas y son receptores auditivos capaces de ser sensibles a sonidos desde 20 Hertz a 20 kHz en humanos. Dichos receptores presentan cilios rígidos (esterocilios) que se proyectan desde la zona apical y son diferentes funcional e histológicamente, cambiando sus características según su ubicación en la cóclea. Por su parte, las células de sostén se encargan del soporte mecánico y metabólico de las células ciliadas. (Smith, 2003).



Las células ciliadas externas, son las que transforman el estímulo mecánico generado por la vibración de la membrana timpánica en estímulo eléctrico. Estas células presentan una forma tubular y se conectan de forma directa, en su parte basal, con las células de sostén (principalmente las células de Deiters) mediante “uniones estrechas y adherentes”. Están dispuestas en tres hileras y actúan como transductores mecano-eléctricos y electromecánicos. Poseen cilios que se disponen en forma de w ó v, y que están en contacto con la membrana tectoria. Su innervación es en un 95% eferente (Smith, 2003).

Las células ciliadas internas, contribuyen igual que las células de sostén a una adecuada función y conservación de la audición. Específicamente, presentan una forma globular y se conectan de forma lateral con las células de soporte. Están dispuestas en una hilera y actúan como transductores mecano eléctricos. Su innervación es principalmente aferente (Smith, 2003).

Las células de soporte se encargan de sostener a las células ciliadas de manera mecánica, pueden separar los compartimentos que contienen endolinfa de los que contienen perilinfa, formar y mantener ambos fluidos. Lo anterior se logra, entre otras cosas, gracias a que presentan uniones de hendidura intercelular (gap junction, desmosomas, uniones adherentes y uniones estrechas). Autores como Köles (2019) y Bramhall et al (2014), mencionan que otra de sus funciones es poseer la capacidad de volver a entrar en el ciclo celular, dividirse y sustituir a las células ciliadas dañadas.



### Fisiología de la audición en el oído interno

La estimulación auditiva genera la desviación de los estereocilios. Lo anterior provoca el flujo de iones de potasio desde la endolinfa, mediante los canales de transducción mecanoeléctricos, al interior de las células ciliadas internas, despolarizándolas. Esta despolarización activa canales de calcio voltaje dependientes en el polo basal de la célula y

su entrada desencadena la liberación de glutamato, que genera los impulsos nerviosos en las neuronas del ganglio espiral (Zhu et al., 2010)

Una vez terminada la despolarización, el  $K^+$  es eliminado mediante canales de  $K^+$  dependientes de voltaje, ubicados en las membranas laterales de las células ciliadas y luego pasa a las células sensoriales vecinas a través de hendidura o uniones “gap junction” (Szucs et al., 2006). Luego llega hasta la estría vascular, ubicada en la pared lateral de la cóclea. En este sitio el potasio es recapturado y secretado nuevamente a la endolinfa (Zhu, 2010).

El  $K^+$  se recicla en la estría vascular para su regreso a la escala media, lo que favorece el mantenimiento del potencial endococlear. Este mecanismo es mediado por el ATP, quien modula la actividad de canales activados por voltaje y acoplamiento de uniones entre células de soporte.

En condiciones patológicas (exposición a ruido, hipoxia, isquemia, entre otros) la concentración de ATP a nivel coclear incrementa. Como resultado se produce un aumento en la entrada de  $K^+$  a la célula ciliada por el canal mecanotransductor y la consecuente disminución del mismo en la endolinfa. Lo anterior disminuye el potencial endococlear y ajusta la sensibilidad auditiva (David, et al 1995)

### **Mecanismos de protección auditiva**

La onda sonora que viaja a través del oído, desencadena mecanismos de protección auditiva frente a ruidos de alta intensidad, partículas, líquidos, presión atmosférica u otras noxas. Estos mecanismos ubicados en el oído externo, medio e interno permiten al oído auto

protegerse de estos perjuicios. En relación a lo anterior, en el oído externo se encuentra el cerumen, que es el encargado de lubricar el Conducto Auditivo Externo (CAE) y protegerlo frente a agentes externos, en el oído medio actúa el reflejo acústico, que se da por la contracción del músculo estapedial, posterior a la presencia de un sonido de por lo menos 80 dB (Kogan, 2004) por sobre el umbral auditivo liminar, donde el cerebro envía la información de contracción a los músculos y fija la platina del estribo a la ventana oval para evitar parcialmente su movimiento. El reflejo se desencadena con una latencia de 60 a 200 ms (Suarez y Velluti, 2001), por lo tanto, ruidos que se presenten con un tiempo menor no lo desencadenan.

A nivel de oído interno se ha comprobado la existencia de mecanismos reflejos a nivel coclear, que protegen al oído frente a ruidos; el reflejo acústico eferente medial y el reflejo acústico eferente lateral, que corresponden a mecanismos intrínsecos de la cóclea. El reflejo acústico eferente medial tiene como objetivo detener la acción nociva del ruido en el oído, disminuyendo la movilidad de la membrana basilar y la ganancia acústica coclear al minimizar el feedback de las células ciliadas externas, el potencial de acción y la respuesta generada. Se señala también, que este reflejo ayuda a proteger la integridad de las células ciliadas internas. Además, permite mejorar la audición en un medio ambiente ruidoso y ayuda a identificar una señal acústica de ruido. Por su parte, el reflejo eferente lateral permite la protección a nivel del nervio auditivo frente a respuestas auditivas inadecuadas (Werner, 2006).

## **Pérdida auditiva o hipoacusia**

La hipoacusia es definida como la “incapacidad total o parcial para escuchar sonidos en uno o ambos oídos o problema de la audición caracterizado por la disminución de la sensibilidad al sonido en comparación con una audición normal” (Muller, 1998).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la pérdida auditiva es la 6ta causa de trastorno que afecta significativamente a 466 millones de personas en el mundo (OMS, 2020). Tiene un gran impacto en la calidad de vida y aspectos psicológicos. Las dificultades de la comunicación pueden causar depresión, ansiedad y posiblemente alteraciones cognitivas (Vlajkovic et al., 2009).

Existen diferentes clasificaciones de la hipoacusia, entre ellas la que se refiere a la localización de la lesión. En este sentido, las hipoacusias se clasifican en conductivas (si afectan al oído externo o medio), neurosensoriales (si afectan a la cóclea o nervio auditivo) y centrales si afectan la vía auditiva central.

La pérdida auditiva neurosensorial produce alteraciones en su mayoría irreversibles y discapacitantes, produciendo aislamiento social y depresión, entre otras. En este sentido, según Köles (2019) la hipoacusia neurosensorial es un gran desafío para la ciencia farmacéutica, ya que no existen productos eficaces que puedan disminuirla.

## **Trauma acústico agudo e hipoacusia inducida por ruido**

Una de las mayores causas de discapacidad auditiva e injuria coclear es la exposición a ruido (Vlajkovic et al.,2009). Esta disfunción puede ser causada tanto por una única exposición a sonidos intensos, así como la exposición repetida y crónica a altos niveles de ruido (Vlajkovic, et al 2009). Los efectos auditivos dependen de las características del ruido, de la frecuencia e intensidad, de la cronicidad, de la duración de la exposición y de la susceptibilidad individual al ruido (Sanz, 2015). Sus consecuencias son tanto efectos auditivos, como extra-auditivos (Daniel, 2007; Le Prell et al., 2007; Nae et al 2013).

En relación a los efectos extra-auditivos, los daños que el ruido causa al organismo llevan consigo perjuicios en la salud de las personas, tales como hipertensión arterial, taquicardia, disminución del apetito, pérdida de la concentración, neurosis, efectos sociales y de conducta, trastornos del sueño y alteración en el rendimiento, alteración en procesos cognitivos como memoria, atención y resolución de problemas (OMS, 2020)

Daniel (2007) plantea efectos a corto y largo plazo de la exposición a ruido de alta intensidad. Entre los efectos a corto plazo están tensión muscular, efectos sobre el sueño, alteración del reflejo respiratorio, aumento de la presión arterial y la circulación periférica; A su vez, los efectos a largo plazo producen alteraciones metabólicas inducidas por el cambio en la concentración de hormonas en el torrente sanguíneo.

En relación a los efectos auditivos, la exposición a ruidos de alta intensidad produce efectos adversos y consecuencias auditivas descritas y diferenciadas en la literatura como trauma acústico agudo y trauma acústico crónico; este último es también denominado como

Hipoacusia Inducida por Ruido (HIR), Pérdida Auditiva Inducida por Ruido (PAIR) o Daño Auditivo Inducido por Ruido (DAIR) (Werner, 2006).

El trauma acústico agudo es entendido como la “alteración de la audición que ocurre como resultado de la exposición a ruido de tipo impulsivo (R.I.); puede ser uni o bilateral y afectar la porción neurosensorial o conductiva del oído. Es plausible a la recuperación. (Arauz y Debas 2001).

El trauma acústico crónico (Hipoacusia inducida por ruido) es definida por la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE 10 (H83,3)) como una Hipoacusia Neurosensorial, que se produce por la exposición prolongada a niveles dañinos de ruido.

A nivel de umbrales auditivos la Hipoacusia inducida por ruido puede causar cambios en los umbrales que pueden ser temporales, durando minutos, horas o días luego de cesado el estímulo, lo que es denominado como un Descenso Temporario del Umbral (DTU). La recuperación completa de los umbrales en el DTU se genera en humanos luego de un reposo auditivo de 16 horas (Lieberman, 2016; Nordmann et al., 2000).

Si la exposición se mantiene de manera reiterada, la lesión en el oído interno puede producir un Descenso Permanente del Umbral (DPU), lo que causa una pérdida irreparable en la audición.

En términos morfológicos, Werner (2006) establece que la exposición a ruido afecta a las células ciliadas externas, nervio auditivo, y en menor proporción a nivel de las células ciliadas internas. Estas alteraciones se describen como cicatrices, alteraciones ultra estructurales, degeneración del ganglio espiral de Corti, pérdida de células ciliadas externas e internas y esterocilios, fusión de esterocilios y cambios en la morfología ciliar, alteraciones en la membrana basilar, pared lateral (estría vascular y ligamento espiral) principalmente en

la región basal de la cóclea (Park et al, 2013; Kurabi et al, 2017). Estos cambios se han vinculado a diferentes vías de muerte celular, entre ellas la apoptosis, necrosis y oncosis (Bohne et al (2007).

Estudios recientes indican que el primer signo de daño se sitúa en el nervio auditivo aferente, incluso antes de que ocurra la pérdida de células ciliadas sensoriales (Wang et al., 2002; Kujawa, S. G., & Liberman, M. C., 2009; Wong, 2015; Shi et al., 2015). Lo anterior genera una neuropatía coclear, que puede no ser obvia como un cambio en el umbral auditivo, pero conduce a dificultades en la discriminación del habla. Se ha mencionado que este daño neural puede ser la causa de anomalías generadas por la inducción a ruido como acúfenos e hiperacusia (Plontke, S. K., Bauer, M., & Meisner, C., 2007)

Los elementos claves en la patogénesis de la injuria coclear producida por hipoacusia inducida por ruido son el estrés oxidativo y la producción de especies reactivas de oxígeno. Esto, en conjunto con la neurotoxicidad del glutamato son los mecanismos comúnmente vinculados a la pérdida auditiva (Wong & Ryan, 2015; Vlajkovic, 2002; Sanz et al, 2015).

Adicionalmente, la pérdida auditiva inducida por ruido genera elevación tanto de ATP como de ectonucleotidasas. Este cambio indica que el sistema purinérgico está involucrados en la deficiencia auditiva (Chen et al.,1995; Wang, 2003). Este último es de vital importancia y será discutido con mayor extensión más adelante.

En cuanto al daño por estrés oxidativo, el ruido a altas intensidades genera un aumento de la actividad mitocondrial que, a su vez aumenta especies reactivas de oxígeno, incrementando la actividad metabólica y sobrepasando la cantidad de antioxidante endógeno, lo que lleva a una peroxidación lipídica e inactivación de enzimas antioxidantes (Vlajkovic et al 2009). Además, el ruido a alta intensidad impulsa actividad y producción de radicales

libres, reducción del flujo sanguíneo coclear, inflamación de terminales nerviosos e induce tanto a la necrosis como la apoptosis celular en el órgano de Corti. (Vlajkovic et al 2009).

### **Hemicanales de conexina y su expresión en la cóclea**

Las conexinas son un conjunto de proteínas que participa en la formación de uniones de hendidura o gap junction que comunican el citoplasma de dos células adyacentes (Anselmi, 2008). Estos canales intercelulares compuestos por dos mitades conformadas por 6 moléculas de conexina cada una, forman un sistema de comunicación e intercambio de electrolitos, metabolitos y mensajeros secundarios en las células.

La síntesis de conexinas se realiza en el Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) y luego se oligomerizan y van al aparato de Golgi para formar hemicanales (HCS). Estos hemicanales son exportados a la membrana plasmática, de las células de sostén (células de Deiters), donde se inserta (Zhao, Zhu, Liang, & Chen, 2015).

Su papel principal en la audición se vincula a asegurar un flujo de iones de potasio requerido para el mecanismo de audición (Menéndez, 2001), pues, cuando el sonido se propaga por la ventana oval, los iones de potasio entran a las células ciliadas, luego los iones son liberados a las células de sostén o soporte mediante los hemicanales de conexina 26 y luego se recicla en la endolinfa. Otra función es la de participar en la amplificación coclear y selectividad frecuencial (Zhu., et al 2013; Luckashkina., et al 2017)

Los hemicanales de conexinas y panexinas son los principales conductos de liberación de ATP. Este cuando se libera de las células dañadas desencadena la movilización y señalización del  $\text{Ca}^{+2}$  (Anselmi, 2008; Shen et al 2006). Además, juegan un papel crucial en la liberación regenerativa del ATP en células de soporte (North, 2002).

Las mutaciones en Cx26, un tipo de isoforma de conexina, han sido asociadas a sordera no sindrómica. En efecto, la eliminación en células de Deiters y células pilares genera un cambio en la electromotilidad de las células ciliadas externas, reduciendo la amplificación coclear activa (Zhu., et al 2013; Lukashkina., et al 2017; Verselis, 2019).

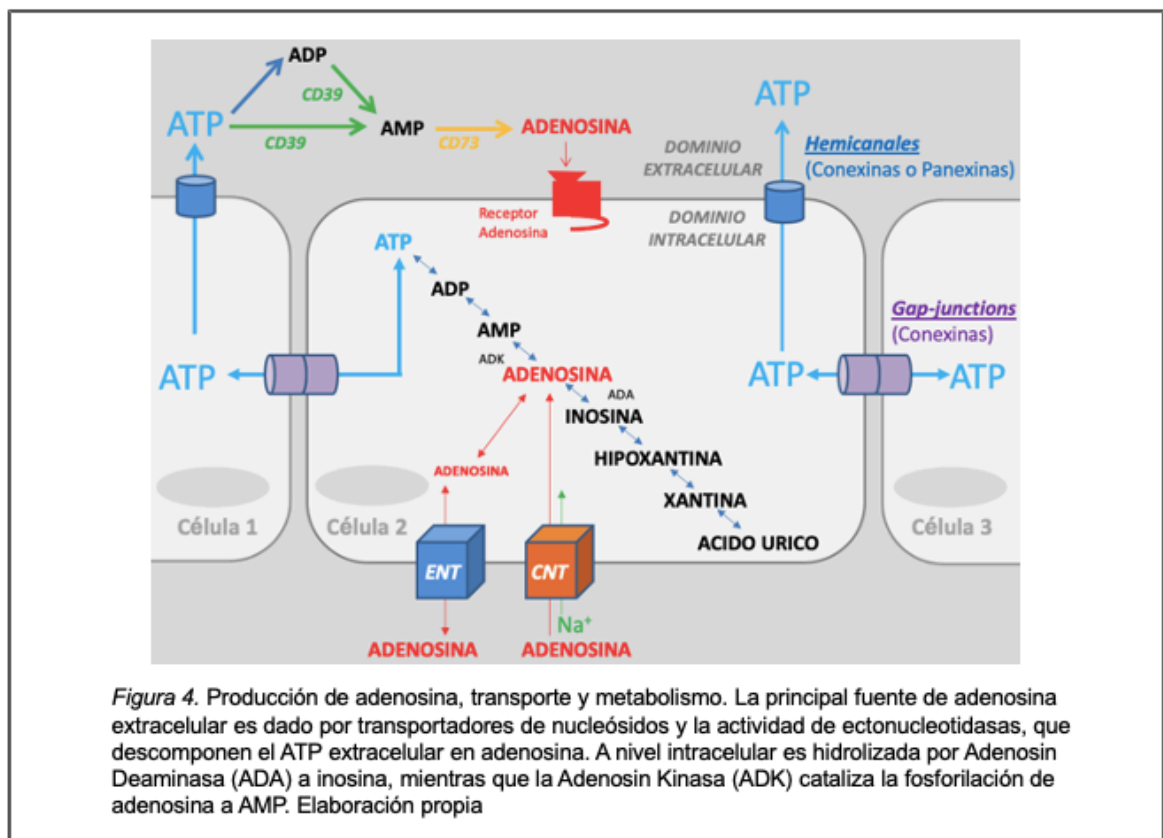
### **Adenosina**

La adenosina es un nucleósido producido principalmente por el metabolismo del Adenosin Trifosfato (ATP) que ejerce múltiples funciones en el cuerpo humano (Sheth, 2014). Entre ellas están el jugar un rol importante en la modulación de la liberación de neurotransmisores, plasticidad sináptica y neuroprotección de isquemia y estrés oxidativo, maduración neuronal, control del sueño, memoria, cognición y control del daño neuronal (Sheth, 2014; Fredholm et al 2011; Lappas et al., 2005). En el tejido cardiovascular produce vasoconstricción o vasodilatación en venas y arterias, regula la producción células T, agregación plaquetaria, angiogénesis y modulación del sistema inmune (Fredholm 2013, Sheth, 2014)

La adenosina puede generarse de manera intracelular como extracelular (Figura 4). De manera extracelular es producida desde el metabolismo del Adenosin Trifosfato (ATP) y del Adenosin Monofosfato AMP mediante ectoenzimas CD39 y CD73. Intracelularmente es producida y controlada por niveles e hidrólisis de AMP por la enzima 5' nucleotidasa y puede ser metabolizada a inosina e hipoxantina por adenosindeaminasa y a ácido úrico por xantina oxidasa (Fredholm 2013, Sheth, 2014).

Puede ser convertido de regreso a AMP por acción de Adenosin Kinasa, quien asegura una cantidad de adenosina intracelular (Fredholm 2011).

Los transportadores de adenosina tanto transportadores equilibrativos (ENTs) o concentrativos (CNT) también contribuyen en la regulación del nivel extracelular de adenosina (Sheth 2014; Vlajkovic, 2009).



La adenosina inicia sus efectos biológicos y media acciones fisiológicas vía una familia de cuatro receptores acoplados a proteína G. Éstos son designados como A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> (Vlajkovic et al., 2007).

Los receptores de adenosina  $A_1$  y  $A_3$  están acoplados a la proteína  $G_i/o$ , lo que reduce la producción de cAMP e inhibe la activación de adenilatosiclasa y la Proteín Kinasa A (PKA) y . Por su parte, los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  están acoplados a proteína  $G_s/olf$ , lo que incrementa la producción de cAMP, la activación de la Proteín Kinasa A y adenilatociclasa (Ver figura Suplementaria 1).

En general, para cumplir sus funciones en el Sistema Nervioso Central los receptores se distribuyen de la siguiente manera:

El receptor de adenosina  $A_1$  está presente en neuronas de la corteza, hipocampo, cerebelo, en oligodendrocitos, astrocitos y microglia (Sheth 2014); el receptor de adenosina  $A_{2A}$  está presente en las espinas dendríticas y regiones post sinápticas de los ganglios basales; el receptor de adenosina  $A_{2B}$  está expresado en neuronas, células gliales como microglia y astrocitos; y el receptor de adenosina  $A_3$  se encuentra en hipocampo, corteza, cerebelo y striatum.

En condiciones fisiopatológicas la adenosina se libera de los tejidos en respuesta al estrés oxidativo y puede promover la protección y reparación de los tejidos (Linden, 2012). Lo anterior lo logra mediante el incremento de defensas antioxidantes, aumento en el suministro de oxígeno, mejora en el flujo sanguíneo, estimulación o inhibición de la liberación de neurotransmisores, genera respuestas antiinflamatorias y promueve las vías antiapoptóticas (Fredholm, 2005).

## **Receptores de adenosina y su expresión en la cóclea**

La adenosina es un nucleósido que ha sido involucrado en la modulación de la detección del sonido y la sensibilidad auditiva coclear. Según Vljakovic (2007) tiene efectos otoprotectores en el oído, principalmente por la capacidad del receptor A1 para prevenir injurias cocleares causadas por trauma acústico o drogas ototóxicas (Vljakovic et al 2009; Nie et al., 1998). En el espacio extracelular funciona como una molécula de señalización que regula el flujo sanguíneo coclear y la protección contra el daño oxidativo. (Vljakovic et al, 2007) (Fredholm, et al 2001)

Tanto la adenosina como el ATP son intrínsecamente liberados como moléculas que regulan un gran número de procesos fisiológicos y fisiopatológicos (estrés oxidativo) en el sistema auditivo, con sitios de liberación identificados en el órgano de corti (Sirko, 2019) Típicamente actúan de manera autocrina y paracrina y son sensibles a cambios en el ambiente extracelular como hipoxia, ruido, isquemia o trauma. (Vljakovic et al, 2009).

Los cuatro receptores de adenosina activan tanto la Kinasa Regulada por señal Extracelular (ERK), como las Proteína Kinasa Activada por Mitógenos MAPK, los receptores de adenosina A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> pueden también activar a JNK y p38 (Lahne & Gale, 2008). La señalización de la MAPK representa una importante vía para modificar la transcripción genética (Lahne & Gale, 2008). En este sentido, en la cóclea la inhibición de las JNK protege a las células ciliadas de la muerte y la pérdida auditiva inducida por ruido (Wang et al., 2003)

En el oído interno, los receptores de adenosina se ubican de la siguiente manera (Ver Figura Suplementaria 2) (Ramkumar, 2004) (Vljakovic et al 2007):

- A)** El receptor de adenosina  $A_1$  se expresa de forma predominante en las células de Deiters y células ciliadas internas y en las fibras nerviosas aferentes del ganglio espiral de Corti. (Vlajkovic et al, 2007) (Vlajkovic et al, 2010) (Vlajkovic et al, 2017)
- B)** El receptor de adenosina  $A_{2A}$  fue detectado en el ganglio espiral de Corti, células de Deiters, células ciliadas internas, ligamento espiral, vasos sanguíneos modiolares. En este último sitio permite regular el flujo sanguíneo coclear. (Vlajkovic et al., 2007; Tan, 2015; Han et al., 2019)
- C)** El receptor de adenosina  $A_3$  se expresó en las células ciliadas externas, internas, células de Deiters, de Hensen y de Claudius, ganglio espiral de Corti y ligamento espiral. También ha sido identificada en partes del sistema auditivo central en núcleo coclear dorsal, Complejo Olivar Superior (COS), Colículo Inferior (CI), corteza auditiva. (Vlajkovic et al., 2007) (Vlajkovic et al, 2017).

Tabla 1. *Receptores de Adenosina en la Cóclea*

<b>Receptor de Adenosina</b>	<b>Célula ciliada externa (CCE)</b>	<b>Célula ciliada interna (CCI)</b>	<b>Célula de sostén (CS)</b>	<b>Neuronas del Ganglio espiral</b>	<b>Estría Vascular</b>	<b>Limbo Espiral</b>
A <sub>1</sub>		x	x	x		
A <sub>2A</sub>		x	x	x	x	x
A <sub>3</sub>	x	x	x	x		x

Expresión de los receptores de adenosina en la cóclea de ratones. ((Vlajkovic et al., 2007; Vlajkovic et al, 2017; Tan, 2015).

Sheth (2014) menciona que la funcionalidad de la activación de estos receptores en la cóclea está relacionada a la otoprotección o exacerbación del daño auditivo. En este sentido, el balance entre los receptores de adenosina A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> es concebido como un factor crítico en la respuesta al estrés oxidativo producido en patologías cocleares comunes como la hipoacusia inducida por ruido. Mientras el receptor A<sub>1</sub> confiere otoprotección en respuesta al estrés oxidativo, el A<sub>2A</sub> exagera la ototoxicidad inducida por cisplatino, un ototóxico utilizado en tratamientos quimioterapéuticos en diversos tipos de cáncer (Sheth 2014, Ramkumar, 2004, Vlajkovic, 2009).

Las injurias producidas por la exposición a ruido pueden prevenirse o disminuirse por la activación del A<sub>1</sub>, mediante la administración local o sistémica de sus agonistas (Wong et al., 2010; Hight et al., 2003; Gunewardene et al., 2013; Vlajkovic et al., 2019).

El uso de Adenosine Amine Congener (ADAC), agonista del receptor de adenosina A<sub>1</sub>, mejora el flujo sanguíneo coclear y oxígeno, aumentando la producción de antioxidantes que contrarrestan los efectos tóxicos de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) (Vlajkovic

et al., 2014; Vlajkovic et al., 2010). Lo anterior produce una mayor supervivencia de células ciliadas y una recuperación de umbrales auditivos (Vlajkovic et al., 2010).

Otro mecanismo es la inhibición de la liberación del glutamato vía receptor de adenosina  $A_1$  pre sináptico (Fredholm, 2007). La activación de este receptor reduce el flujo de  $Ca^{+2}$ , mediante la inhibición preferencial de canales tipo N y tipo Q, y por ende, genera hiperpolarización de las células ciliadas. (Fredholm, 2007).

La expresión de los receptores de adenosina en las Células Ciliadas Internas (CCI) es consistente con que la adenosina induce la elevación intracelular de calcio en estas células en cobayo. A su vez, tanto  $A_1$  como  $A_3$  han sido implicados en la regulación de la liberación pre sináptica de glutamato desde las CCI, consistente con el rol de modulación de la liberación glutamatérgica en las neuronas del cerebro (Wong et al., 2010).

Por otro lado, las injurias cocleares pueden disminuirse al inhibir farmacológicamente al receptor de adenosina  $A_{2A}$ . En este sentido, Vlajkovic (2009) muestra que tanto la inhibición combinada de  $A_{2A}$  y adenosin kinasa, como la inhibición del transporte de adenosina por transportadores de nucleósidos y el incremento de adenosina producida desde ATP son todas vías otoprotectoras frente a la injuria inducida por ruido.

### **Receptor $A_{2A}$ de adenosina y Ototoxicidad**

El receptor A<sub>2A</sub> de adenosina es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G (Figura Suplementaria 3) y está compuesto de múltiples exones que codifican transcripciones alternantes iniciadas por 4 promotores independientes

Este receptor es capaz de interactuar con otros receptores, mediante la formación en canales homodimeros y heterodimeros, lo que produce que a bajas concentraciones de adenosina se activa principalmente el receptor de Adenosina A<sub>1</sub>, mientras que a altas concentraciones de adenosina se activa el A<sub>2A</sub>.

En la vía de señalización del A<sub>2A</sub> la estimulación del receptor activa la adenilciclase que conduce a la producción de AMPc y la activación de Protein Kinasa A (ver figura suplementaria 1). La activación de este último activa una respuesta de CREB, quien inhibe la actividad del Factor nuclear de transcripción denominado factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas (NF-kB), lo anterior suprime la expresión de citoquinas. En células inmunes, la proteína CREB tiene efectos antiinflamatorios, ya que inhibe la transcripción del NF-KB y lo anterior suprime la expresión de citoquinas (Fredholm et al., 2007; Fredholm et al., 2000; Schreck et al., 1992).

Otro blanco de la vía de señalización mediada por la activación de la Proteín Kinasa A (PKA) es el canal de calcio tipo L, proteína kinasa C atípica, DARPP, Rac1/Cdc42 y SRC. La estimulación del A<sub>2A</sub> también regula la actividad del ERK dependiente e independiente de la vía de activación de PKA. Se ha comprobado que el daño coclear produce una activación de la Kinasa Regulada Extracelularmente (ERK) en las células de soporte, principalmente en las células de Deiters (Fredholm et al., 2007).

Por otro lado, la cascada de cAMP/PKA aumenta la comunicación intercelular, afectando la fosforilación de conexinas o proteínas reguladoras de conexinas (Begandt, et al 2010). Lo anterior conduce a un incremento en la expresión e inserción de conexinas en la membrana celular y un aumento de apertura de los hemicanales.

En resumen, se conoce que los hemicanales de conexina actúan frente a estímulos de nocivos liberando ATP al medio extracelular. Lo anterior ha sido relacionado como una vía de muerte celular frente a noxas (Zhou et al., 2016). Por otro lado, se ha encontrado que en un tipo de sordera sindrómica, como síndrome KID, hay ganancia de función de los hemicanales mutados por pérdida del mecanismo de control que cierra estos canales (García et al., 2015). Por su parte, el receptor  $A_{2A}$  ha sido vinculado a exacerbación de la ototoxicidad producida por el cisplatino (Cunha, 2005), no descartándose en otros modelos de daño como el daño auditivo inducido por ruido. Estos antecedentes nos permiten proponer la siguiente hipótesis.

## **HIPÓTESIS**

El receptor  $A_{2A}$  media el daño auditivo inducido por ruido asociado al incremento en la actividad de hemicanales en la cóclea

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Estudiar el estado funcional de hemicanales en cócleas de ratones WT y deficientes para el receptor  $A_{2A}$  de adenosina ( $A_{2A}$  KO) expuestos a ruido nocivo.

### **Objetivos Específicos**

Los objetivos específicos son:

1. Estudiar la expresión del receptor de adenosina  $A_{2A}$  en la cóclea de ratones WT y su funcionalidad auditiva frente al daño auditivo inducido por ruido.
  - 1.1 Determinar expresión de mRNA de receptores de adenosina en cóclea
  - 1.2 Generación de un modelo de daño auditivo inducido por ruido
  - 1.3 Estudiar el efecto de la eliminación del gen del receptor de Adenosina  $A_{2A}$  en el daño auditivo inducido por ruido.
  
2. Estudiar si la activación del receptor de Adenosina  $A_{2A}$  aumenta el estado funcional de hemicanales en la cóclea, mediante la captación de tasadores fluorescentes (Etidio)

2.1 Estudiar el efecto de agonistas y antagonistas de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> sobre el estado funcional de hemicanales en explantes cocleares de ratones WT del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> mediante captación de etidio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para lo anterior, el estudio se realizó con un total de 10 animales machos C57BL/ 6 de dos meses de edad. De ellos, 3 ratones fueron deficientes para el receptor A<sub>2A</sub> de adenosina (A<sub>2A</sub> KO) pre y post exposición a ruido nocivo, 3 ratones WT C57BL/ 6 pre y post exposición a ruido, 2 ratones P8 C57BL/ 6 y 2 ratones machos adultos WT C57BL/6 sin exposición a ruido (ver Tabla Suplementaria 1).

Los animales deficientes para el receptor A<sub>2A</sub> de adenosina (A<sub>2A</sub> KO) fueron donados por Juan Fan Chen, académico del Laboratorio de Neurobiología Molecular de la Universidad de Boston, (MA, Estados Unidos). En resumen, un fragmento genómico del receptor A<sub>2A</sub> se dividió por un marcador de selección positiva (cassette de neomicina), que reemplazó el extremo 3' del exón 2, la unión de empalme 5' adyacente y las secuencias de intrón (Day, et al 2003) La confirmación de A<sub>2A</sub> KO se realizó mediante la amplificación del casete de neomicina mediante PCR realizado por el Laboratorio de Fisiología Vascular de la Universidad del Bío-Bío. Los ratones se alojaron en la instalación de animales de la Universidad de Valparaíso, Chile, donde se mantuvieron en condiciones ambientales estándar, que incluían temperatura controlada (25 ° C) y humedad, exposición a ciclos de luz / oscuridad de 12/12 h, y suministro de alimentos y agua a libitum. Este estudio se realizó de acuerdo con las recomendaciones de las pautas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicadas por el Instituto Nacional de Salud de EE. UU. El Comité de Ética de la Universidad del Bio Bío (UBB) y FONDECYT (1140586, Chile) que aprobó el protocolo.

## **Extracción de RNA y transcripción reversa**

La expresión de los receptores de adenosina en cócleas de ratones WT C57BL/6 se realizó en 2 ratones machos adultos sin exposición a ruido. Para lo anterior se realizó la extracción de cócleas mediante el método expuesto por Khujista D. Haque (2015). Una vez realizada la extracción se procedió a homogeneizar y extraer RNA de las muestras mediante trizol (Invitrogen, USA).

La cuantificación de RNA fue realizada mediante espectrofotometría ( $A_{260\text{nm}}$ ) y su integridad fue evaluada por la relación de  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  y visualización en gel de agarosa (2%). Alicuotas de 2 ug de RNA fueron utilizadas en la reacción de transcripción reversa usando oligo dT, random primers y enzima MMLV-RT (Moloney Murine Leukaemia Virus-Reverse Transcriptasa, Promega USA) en un ciclo de transcripción reversa a 37°C.

Como controles positivos se utilizó RT PCR de glándula suprarrenal, de bazo, de vejiga y de pulmón, que expresan gran cantidad de mRNA para el receptor  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$  respectivamente.

## **PCR no cuantitativo**

El nivel de mRNA para los receptores de adenosina  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$  y el control de carga 18 S fueron determinados por PCR semicuantitativo (RT-PCR). Los parámetros de la secuencia de temperaturas utilizadas para la reacción fueron definidos de acuerdo al tamaño del producto esperado y a la temperatura de alineación de los partidores utilizados (Ver Tabla Suplementaria 2).

## **Modelo de daño auditivo inducido por ruido**

La exposición a ruido nocivo de los 6 animales (3 C57BL/6 y 3 deficientes para el receptor  $A_{2A}$  de adenosina ( $A_{2A}KO$ )) se realizó mediante ruido blanco (presenta componentes espectrales de un rango de frecuencias amplio y es la suma de todas las ondas) una única vez a 90 dB durante dos horas. Para lo anterior se utilizará un audiómetro GSI 61 (Auditrón) calibrado según norma ISO 389 (Adaptado de Park., et al 2013).

El ruido fue entregado por un altoparlante en una cabina sono amortiguada, y los animales fueron colocados en cajas a 10 cm del parlante.

## **Evaluación de la audición**

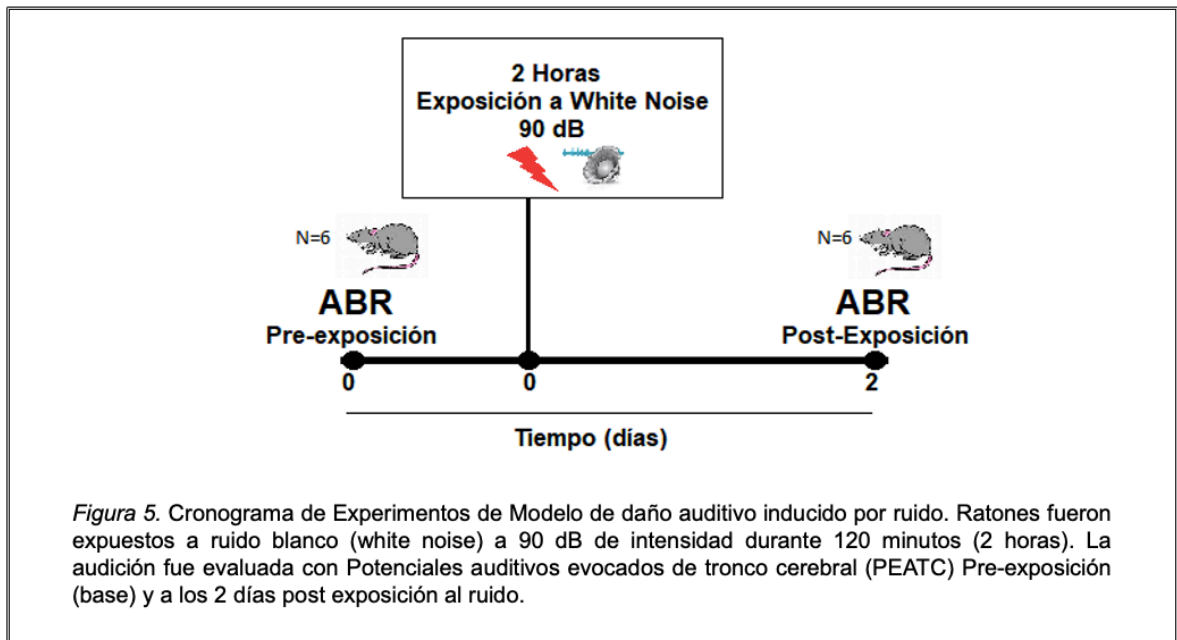
El estudio funcional de la vía auditiva de 6 animales (3 C57BL/6 y deficientes para el receptor  $A_{2A}$  de adenosina ( $A_{2A}KO$ )) se realizó mediante técnicas de registro de *Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral (PEATC)*. Para lo anterior, se utilizó el equipo Interacoustics Eclipse, con el programa oto acus EP 25.

Los animales fueronn anestesiados con una inyección de fenobarbital sódico (40 mg/kg) y posterior a esto se les colocó electrodos de acero inoxidable de inserción en sitios análogos de los humanos, en el vértex (positivo), mastoides de oído (negativo) y espalda (tierra). Los estímulos fueron amplificados con un filtro de pasa banda de 100 a 3000 Hz,

Para la obtención de los PEATC se estimuló a los animales con 2000 estímulos de tipo klik con polaridad rarefacción y condensación a intensidades de 75 dB, 70 dB, 65 dB, 60 dB, 55 dB, 50 dB, 45 dB, 40 dB, 35 dB, 30 dB, 25 dB y 20 dB por auriculares situados a 10 cm de la cabeza del ratón.

Las evaluaciones se realizaron una hora de la exposición a ruido blanco 90 dB SPL por dos horas y dos días después de la exposición a ruido (Adaptado de Vlajkovic., et al 2010)

Para el análisis de la audición de los ratones se determinó el umbral electrofisiológico para los click, definido como la mínima intensidad de estimulación requerida para generar un potencial evocado con un pico III localizado en una ventana temporal de 2,25 ms y 3,25 ms a 70 dB de estimulación. Las latencias absolutas de las ondas I, III y V y las latencias interondas de I-III, III y-V y I -V.



## Explantos cocleares

Se realizó un cultivo celular primario de 4 cócleas de ratones C57BL/6 según método de Haque y cols., (2015). Brevemente, los animales P8 (8 días después del parto) fueron sacrificados por decapitación. Ambas cócleas fueron extraídas por disección del cráneo y extracción del cerebro. Se aislaron ambos oídos internos ubicados en el hueso temporal, y ambas cócleas se extrajeron. Una vez separado del ligamento espiral, el epitelio sensorial se transfirió a una placa con medio (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con 10% de FBS), asegurando que el tejido se adhiriera al cubreobjetos de 12 o 25 mm, previamente tratado con Geltrex (Gibco) e incubado durante 24 horas a 37 ° C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

### **Estado funcional de los hemicanales frente a la activación del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> mediante captación de etidio**

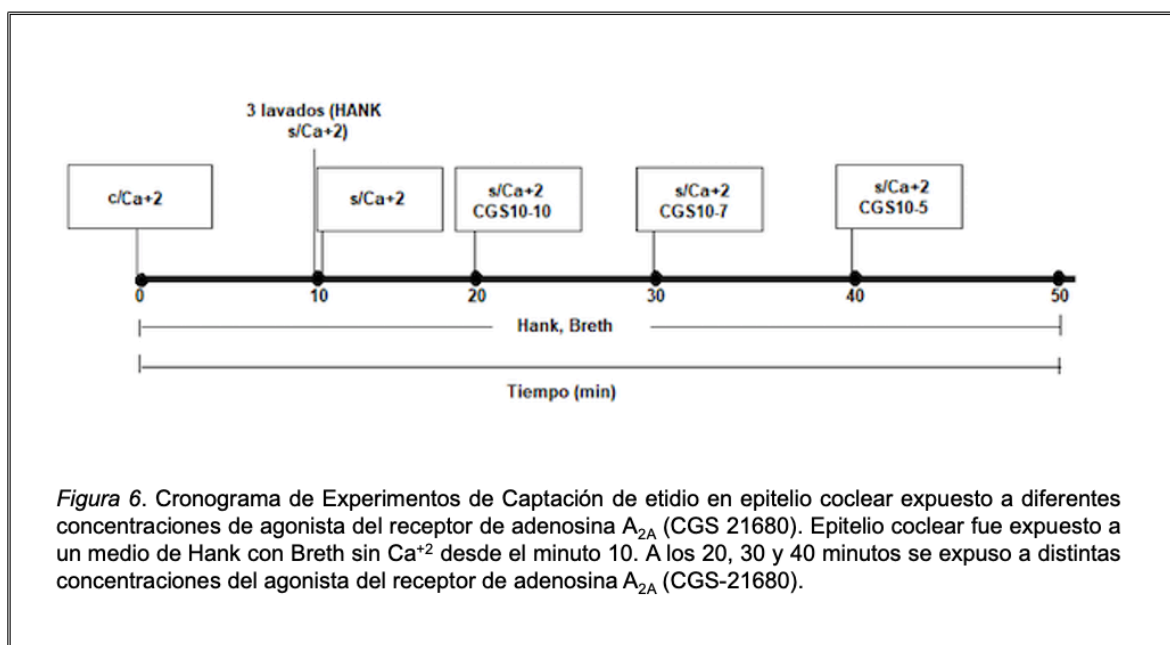
Para determinar el estado funcional de los hemicanales frente a la activación o inactivación del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> se evaluó la tasa de captación de etidio a distintas concentraciones del agonista selectivo para A<sub>2A</sub>, denominado CGS-21680 (Figura 6); o su antagonista selectivo, ZM 241385 (Figura 7).

Las mediciones se realizaron en 2 explantes cocleares de ratones C57BL/6 preparados, se retiró el medio DMEM y se lavó con medio HANKS con Ca<sup>+2</sup> para eliminar el exceso de tinte del medio de cultivo (rojo fenol). Luego, se colocaron los explantes en una cámara de registro, que contenía medio HANK' S con Ca<sup>+2</sup> y trazadores (5 μM Bromuro de

etidio, BrEt) con un volumen de 400 uL. La cámara de registro fue montada en un microscopio NIKON Eclipse TE2000U (que contenía el software NIS Elements).

En esta instancia se tomaron las fotografías iniciales (para evaluar morfología coclear) y se seleccionaron los ROIS. Luego se tomaron fotografías cada treinta segundos con filtros para trazadores. Posterior a 10 minutos se lavó tres veces el epitelio con 1ml de medio HANK'S sin  $\text{Ca}^{+2}$ , se extrajo el medio y se agregó HANK'S sin  $\text{Ca}^{+2}$  y trazador (5  $\mu\text{M}$  Bromuro de etidio). Esta condición se mantuvo durante todos los experimentos. Luego a los 20, 30 y 40 minutos se agregó el agonista del receptor de adenosina  $\text{A}_{2\text{A}}$  CGS 21680 en concentraciones de  $10^{-10}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-5}$  respectivamente.

Se tomaron fotografías cada 30 segundos, durante el tiempo que duró la grabación (50 minutos total) mediante el software NIS Elements AR 4,4 (Nikon GmbH).



Para el análisis de la tasa de captación de etidio (Absorción en arbitrary units/min Au/min) se utilizó el software FIJI y se calcularon las pendientes de cada ROI mediante Excel y Graph Pad Prism 7 (Ver Figura Suplementaria 4).

### **Estado funcional de los Hemicanales frente a la inactivación del receptor de adenosina $A_{2A}$ mediante captación de Etidio**

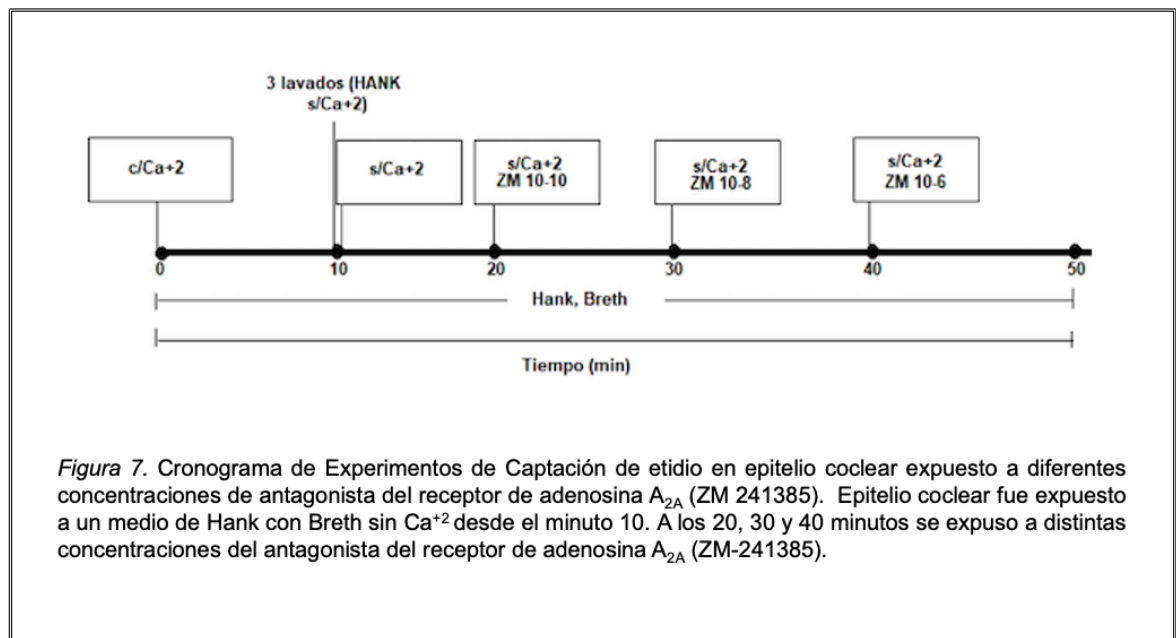
Para determinar el estado funcional de los hemicanales frente a la inactivación del receptor de adenosina  $A_{2A}$  se evaluó la tasa de captación de etidio en ambas condiciones a distintas concentraciones (antagonista ZM 241385).

Las mediciones se realizaron en 2 explantes cocleares de ratones C57BL/6 preparados, se retiró el medio DMEM y se lavó con medio HANKS con  $Ca^{+2}$  para eliminar el exceso de tinte del medio de cultivo (rojo fenol). Luego, se colocaron los explantes en una cámara de registro, que contenía medio HANK' S con  $Ca^{+2}$  y trazadores (5  $\mu$ M Bromuro de

etidio) con un volumen de 400 uL. La cámara de registro fue montada en un microscopio NIKON Eclipse TE2000U (que contenía el software NIS Elements)

En esta instancia se tomaron las fotografías iniciales y se seleccionaron las regiones de interés (region of interest, ROIs). Luego se tomaron fotografías cada treinta segundos con filtros para trazadores. Posterior a 10 minutos se lavó tres veces el epitelio con 1 ml de medio HANK'S sin calcio, se extrajo el medio y se agregó HANK' S sin  $\text{Ca}^{+2}$  y trazadores ( $5 \mu\text{M}$  Bromuro de etidio). Esta condición se mantuvo durante todos los experimentos. Luego a los 20, 30 y 40 minutos se agregó el antagonista del receptor de adenosina  $\text{A}_{2\text{A}}$  ZM-241385 en una concentración de  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  respectivamente (ver figura 6).

Se tomaron fotografías cada 30 segundos, durante el tiempo que duró la grabación (50 minutos total) mediante el software NIS Elements AR 4,4 (Nikon GmbH).



Para el análisis de la tasa de captación de etidio (Absorción en Au/min) se utilizó el software FIJI y se calcularon las pendientes de cada ROI mediante Excel y Graph Pad Prism 7 (Ver Figura Suplementaria 5).

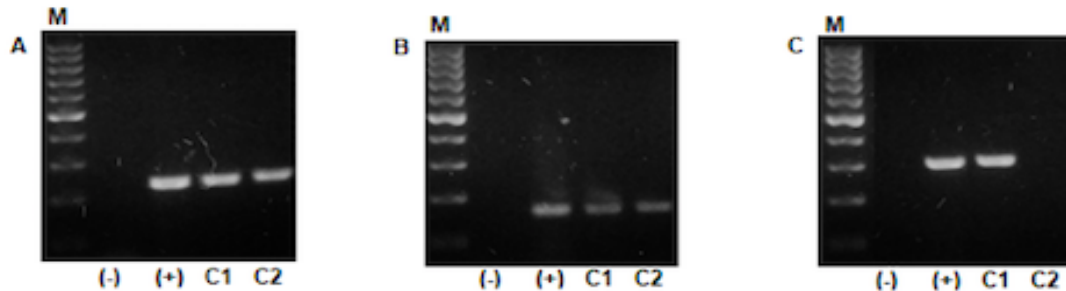
### **Análisis estadísticos**

Las variables cuantitativas son expresadas en promedios y errores estándar de la media. Para el análisis estadístico y comparación de los resultados entre los grupos estudiados (expuestos y no expuestos a ruido) se empleó el análisis no paramétrico de Kruskal y Wallis, y en aquellos casos en los cuales existían diferencias significativas, la prueba de Mann Whitney. El nivel nominal de significancia estadística (P) fue establecido como menor a 0,005 ( $P < 0,005$ ). Todos los datos fueron ingresados en una base electrónica del software Graph Pad Prism 7.0.

## RESULTADOS

### Expresión de receptores de adenosina en cóclea de ratones C57BL/6

Se realizaron ensayos de PCR no cuantitativo para estudiar la expresión de mRNA de los receptores de adenosina en la cóclea de ratones C57 BL/6. Los datos demuestran que en la cóclea existen los receptores de adenosina A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> y A<sub>3</sub> (Fig. 8), mientras que el subtipo A<sub>2B</sub> no pudo ser detectado (no mostrado)

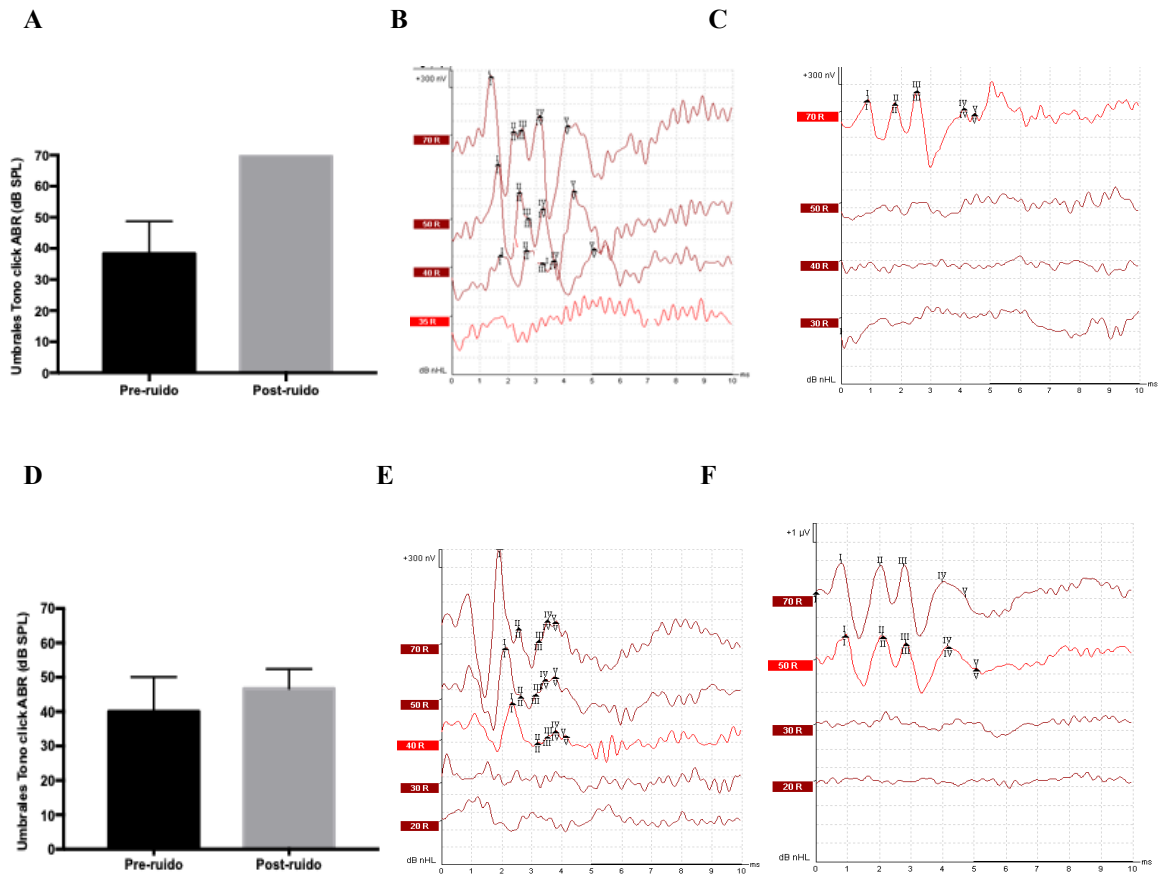


*Figura 8.* Expresión de receptores de adenosina en cóclea de ratón C57BL/6. Los experimentos de RT-PCR mostraron la expresión de mRNA de los receptores de adenosina A<sub>1</sub> (A), A<sub>2A</sub> (B) y A<sub>3</sub> (C). Los resultados evidencian control (-), control (+) y cóclea 1 (C1) y cóclea 2 (C2).

### Efecto de la eliminación del gen del receptor de Adenosina A<sub>2A</sub> en los umbrales auditivos de ratones expuestos a ruido

Realizamos evaluaciones electrofisiológica en seis ratones C57BL/6, tres ratones control (wild type WT) y tres deficientes para el receptor A<sub>2A</sub> de adenosina (A<sub>2A</sub> KO),

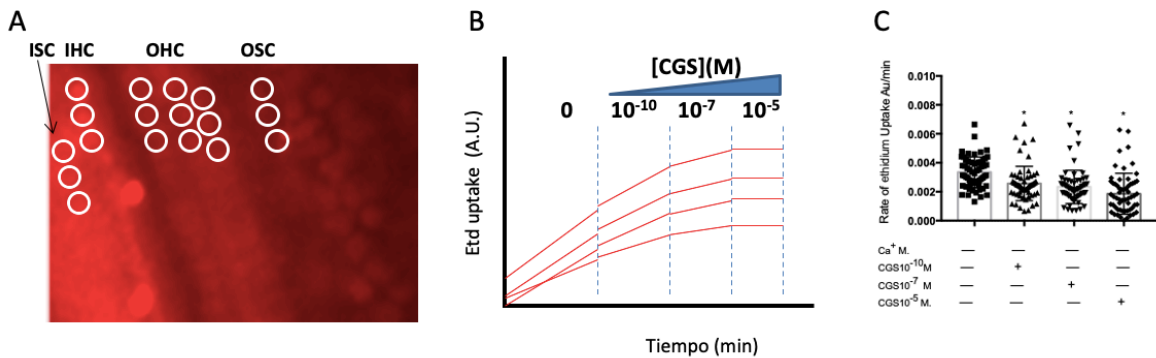
mediante potenciales evocados auditivos antes y después de exposición a ruido blanco de 90 dB durante dos horas. Observamos que los ratones WT presentaron un aumento significativo en los umbrales auditivos medidos 2 días después de la exposición al ruido (Figura 9 A-C), en cambio en los ratones A<sub>2A</sub> KO observamos que la exposición al ruido no produjo cambios significativos en los umbrales auditivos (Figura 9 D-F).



**Figura. 9:** Evaluación de la audición de 3 ratones WT (A,B y C) y 3 ratones A<sub>2A</sub> KO (D, E y F) antes y después de la inducción del daño inducido por ruido. La media de los umbrales electrofisiológicos de ratones WT antes de la exposición a ruido es de 38,3±10 dB SPL y posterior a la exposición a ruido es de 70±0 dB SPL. A su vez, la media de los umbrales electrofisiológicos de ratones A<sub>2A</sub> KO antes de la exposición a ruido es de 40 ±10 dB SPL y posterior a la exposición a ruido es de 46.6 ± 5.7 dB SPL.

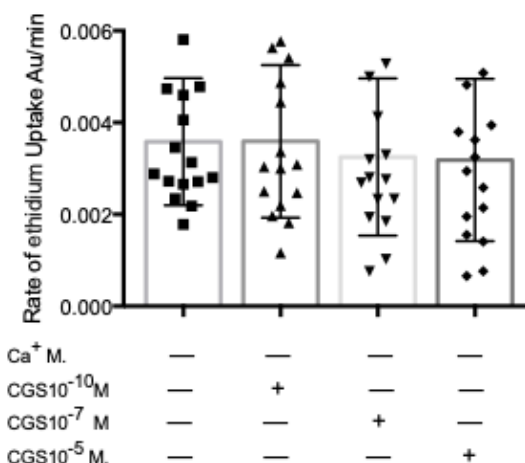
**Efecto de agonistas y antagonistas del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> en el estado funcional de hemicanales en la cóclea mediante la captación de tasadores fluorescentes.**

La exposición de distintas concentraciones de agonista del receptor de adenosina A<sub>2A</sub>(CGS21680) en explantes cocleares produce disminución de la captación de etidio en las diferentes líneas celulares del tejido epitelial coclear (Fig 10, 11, 12 y 13).



*Figura 10.* Generacion de graficos de pendientes de captacion. A) Captacion de BrEt en explante de coclea. Se muestra las regiones donde los ROIs fueron asignados. B) Registro de captacion de colorante (dye-uptake). C) Valores de pendiente de captacion (rate of uptake, A.U./min). \* i p<0,05 versus control sin estimulo. Test de Mann Whitney

Según lo anterior, tras la exposición a CGS 21680 a distintas concentraciones, las células de sostén (Fig.11) presentaron una disminución en la tasa de captación de etidio, en comparación a la condición basal, que no fue considerada significativa en ninguna de las concentraciones (CGS 10<sup>-10</sup> (p: 0,95), CGS 10<sup>-7</sup> (p: 0,49) y CGS10<sup>-5</sup> (p: 0,51)).



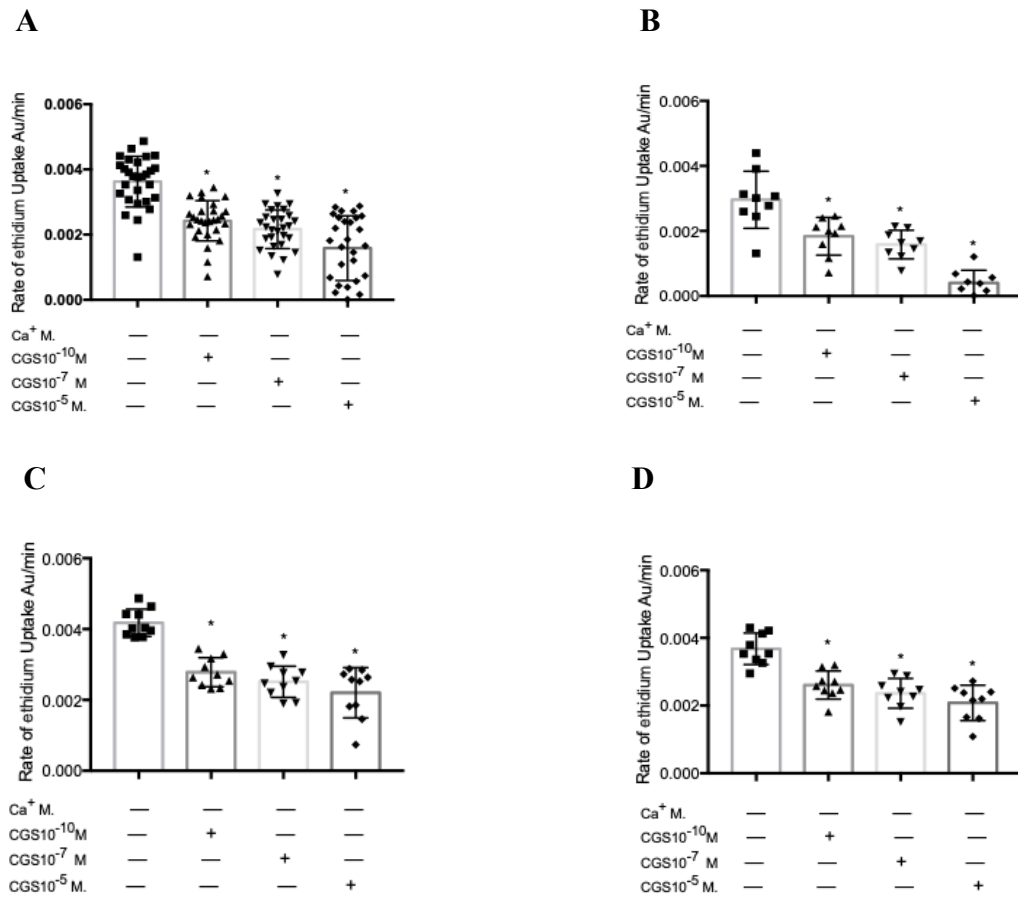
*Figura 11.* Captación de etidio en células de sostén de epitelio coclear expuesto a distintas concentraciones de agonista del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (CGS21680), n=16. Se expresan la media y desviación estándar de la tasa de captación de etidio en las distintas condiciones: Basales de Breth, HANK, s/Ca<sup>+</sup>, siendo  $0,00358 \pm 0,00138$  (Au/min), con agonista del receptor de adenosina a distintas concentraciones CGS  $10^{-10}$ , CGS  $10^{-7}$  y CGS $10^{-5}$ , siendo  $0,00359 \pm 0,001662$  (Au/min);  $0,00325 \pm 0,001715$  (Au/min) ,  $0,003185 \pm 0,001769$  (Au/min) respectivamente.

Por su parte, las células ciliadas externas (Fig.12) presentan, en la totalidad de sus filas (Fig. 12 A) una disminución significativa ( $p < 0,0001$ ) en la tasa de captación de etidio, con las siguientes medias y desviaciones estándar en las distintas condiciones: Basal (Breth, HANK, s/Ca<sup>+</sup>)  $0,00362 \pm 0,000775$ , con agonista del receptor de adenosina a distintas concentraciones CGS  $10^{-10}$ , CGS $10^{-7}$  y CGS $10^{-5}$ , siendo  $0,002424 \pm 0,000616$  (Au/min);  $0,002165 \pm 0,000591$  (Au/min) ,  $0,001585 \pm 0,00099$  (Au/min) respectivamente.

En la Fila 1 de células ciliadas externas (Fig. 12 B) se evidencia una disminución significativa ( $p < 0,0001$ ) en la tasa de captación de etidio, con las siguientes medias y desviaciones estándar en las distintas condiciones: Basal (Breth, HANK, s/Ca+)  $0,00296 \pm 0,000877$ , con agonista del receptor de adenosina a distintas concentraciones CGS  $10^{-10}$ , CGS $10^{-7}$  y CGS $10^{-5}$ , siendo  $0,001839 \pm 0,000581$  (Au/min);  $0,001582 \pm 0,000438$  (Au/min),  $0,000402 \pm 0,000388$  (Au/min) respectivamente.

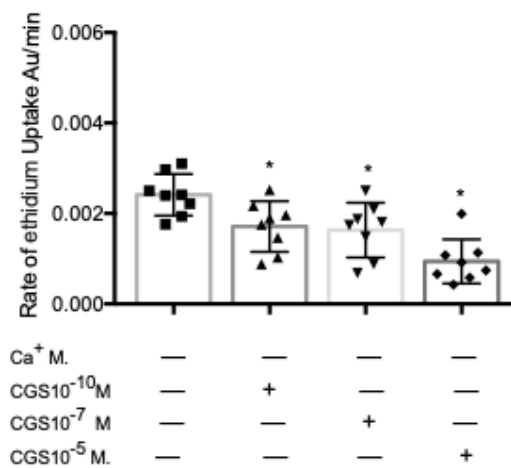
Lo mismo ocurre en la Fila 2 de células ciliadas externas (Fig. 12 C), cuyas medias y desviaciones estándar en las distintas condiciones son: Basal (Breth, HANK, s/Ca+)  $0,004176 \pm 0,000384$  (Au/min), con agonista del receptor de adenosina a distintas concentraciones CGS  $10^{-10}$ , CGS $10^{-7}$  y CGS $10^{-5}$ , siendo  $0,002783 \pm 0,00040$  (Au/min);  $0,002513 \pm 0,000439$  (Au/min) ,  $0,00220 \pm 0,00071$  (Au/min) respectivamente.

La fila 3, por su parte, (Fig. 12 D) también evidencia una disminución significativa ( $p < 0,0001$ ) en la tasa de captación de etidio, con las siguientes medias y desviaciones estándar en las distintas condiciones: Basal (Breth, HANK, s/Ca+)  $0,00367 \pm 0,000465$  (Au/min), con agonista del receptor de adenosina a distintas concentraciones CGS  $10^{-10}$ , CGS $10^{-7}$  y CGS $10^{-5}$ , siendo  $0,002608 \pm 0,0004165$  (Au/min);  $0,002362 \pm 0,00044$  (Au/min) ,  $0,002081 \pm 0,00052$  (Au/min) respectivamente.



*Figura 12.* Captación de etidio en células ciliadas externas de epitelio coclear expuesto a distintas concentraciones de agonista del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (CGS21680), n=28. Se muestra la totalidad de las células ciliadas externas (A), la Fila 1 de Células ciliadas externas (B), Fila 2 de Células ciliadas externas (C) y Fila 3 de Células ciliadas externas (D). Se expresan la media y desviación estándar de la tasa de captación de etidio en las distintas condiciones: Basales de Breth, HANK, s/Ca+, CGS 10<sup>-10</sup>, CGS 10<sup>-7</sup> y CGS10<sup>-5</sup>.

Al igual que las células ciliadas externas, las células ciliadas internas (Fig.13) presentan disminución significativa de la captación de etidio tras la exposición a distintas concentraciones del agonista del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (CGS21680) (CGS 10<sup>-10</sup> (p Value: 0,02), CGS10<sup>-7</sup> (p Value: 0,02) y CGS10<sup>-5</sup> (p Value: 0,0006))

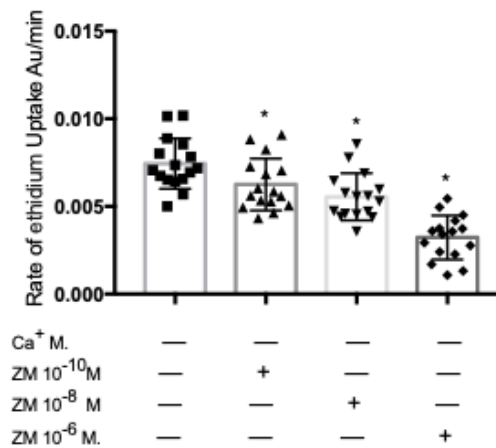


*Figura 13.* Captación de etidio en células ciliadas internas de epitelio coclear expuesto a distintas concentraciones de agonista del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (CGS21680), n=8. Se expresan la media y desviación estándar de la tasa de captación de etidio en las distintas condiciones: Basales Breth, HANK, s/Ca<sup>+</sup> 0,00241 ± 0,000460 (Au/min) y con agonista del receptor de adenosina a distintas concentraciones CGS 10<sup>-10</sup>, CGS10<sup>-7</sup> y CGS10<sup>-5</sup>, siendo 0,001712 ± 0,000558 (Au/min); 0,00163 ± 0,000604 (Au/min) , 0,000941 ± 0,000488 (Au/min) respectivamente.

Por otro lado, la exposición de distintas concentraciones de antagonista del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (ZM 241385) en explantes cocleares produce, al igual que la exposición a

agonista CGS 21680, una disminución de la captación de etidio en las diferentes líneas celulares del tejido epitelial coclear (Fig. 14, 15 y 16).

Tras la exposición a ZM 241385 a distintas concentraciones, las células de sostén (Fig.14) presentaron una disminución significativa en la tasa de captación de etidio, en comparación a la condición basal. (ZM  $10^{-10}$  (p Value: 0,028), ZM  $10^{-8}$  (p Value: 0,0005) y ZM  $10^{-6}$  (p Value: <0,0001)).



*Figura 14.* Captación de etidio en células de sostén de epitelio coclear expuesto a distintas concentraciones de antagonista del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (ZM 241385), n=16. Se expresan la media y desviación estándar de la tasa de captación de etidio en las distintas condiciones: Basales de Breth, HANK, s/Ca<sup>+</sup>  $0,0074 \pm 0,0014$  (Au/min), con agonista del receptor de adenosina a distintas concentraciones ZM  $10^{-10}$ , ZM $10^{-8}$  y ZM $10^{-6}$ , siendo  $0,0062 \pm 0,0014$  (Au/min);  $0,0055 \pm 0,0013$  (Au/min) ,  $0,0032 \pm 0,0012$  (Au/min) respectivamente.

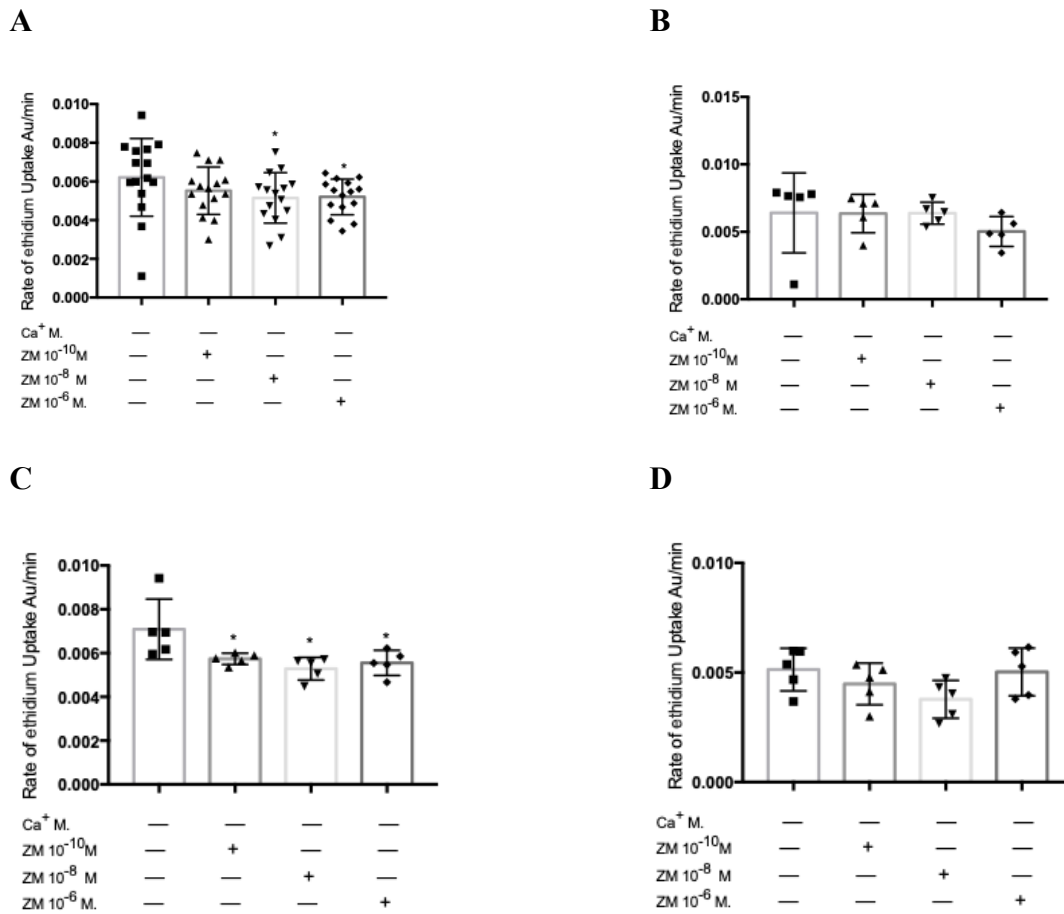
Por su parte, las células ciliadas externas (Fig.15) presentan, en la totalidad de sus filas (A), una disminución significativa en la captación de etidio tras la exposición a concentraciones de ZM $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  (p Value: 0,029 y 0,026 respectivamente). Sus medias y desviaciones estándares en las distintas concentraciones son: Basal (Breth, HANK, s/Ca<sup>+</sup>)

0,0062 ± 0,0020, con antagonista del receptor de adenosina a distintas concentraciones ZM 10<sup>-10</sup>, ZM10<sup>-8</sup> y ZM10<sup>-6</sup>, siendo 0,0055 ± 0,0012 (Au/min); 0,0051 ± 0,0013 (Au/min) , 0,0052 ± 0,0009 (Au/min) respectivamente.

En la Fila 1 de células ciliadas externas (Fig. 15 B) se evidencia una leve disminución en la tasa de captación de etidio, con las siguientes medias y desviaciones estándar en las distintas condiciones: Basal (Breth, HANK, s/Ca<sup>+</sup>) 0,0064 ± 0,0029, con antagonista del receptor de adenosina a distintas concentraciones ZM 10<sup>-10</sup>, ZM10<sup>-8</sup> y ZM10<sup>-6</sup>, siendo 0,0063 ± 0,0014 (Au/min); 0,0063 ± 0,0008 (Au/min) , 0,0050 ± 0,0011 (Au/min) respectivamente.

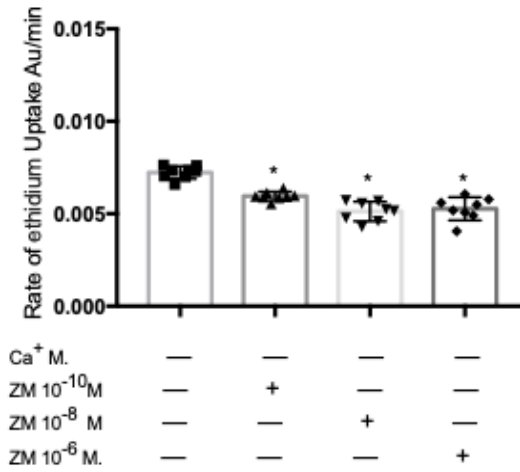
Por su parte, la Fila 2 de células ciliadas externas (Fig. 15 C) evidencia una disminución significativa tras la exposición a distintas concentraciones de ZM (ZM 10<sup>-10</sup> (p Value: 0,015), ZM10<sup>-8</sup> (p Value: 0,007) y ZM10<sup>-6</sup> (p Value: 0,031)). Sus medias y desviaciones estándar en las distintas condiciones son: Basal (Breth, HANK, s/Ca<sup>+</sup>) 0,0070 ± 0,0013 (Au/min) , con antagonista del receptor de adenosina a distintas concentraciones ZM 10<sup>-10</sup>, ZM10<sup>-8</sup> y ZM10<sup>-6</sup>, siendo 0,0057± 0,0002 (Au/min); 0,0052 ± 0,0005 (Au/min) , 0,0055 ± 0,0005 (Au/min) respectivamente.

La fila 3, por su parte, (Fig. 15 D) evidencia una leve disminución en la tasa de captación de etidio, con las siguientes medias y desviaciones estándar en las distintas condiciones: Basal (Breth, HANK, s/Ca<sup>+</sup>) 0,0051 ± 0,0009 (Au/min), con antagonista del receptor de adenosina a distintas concentraciones ZM 10<sup>-10</sup>, ZM10<sup>-8</sup> y ZM10<sup>-6</sup>, siendo 0,0044 ± 0,0009 (Au/min); 0,0037 ± 0,008 (Au/min), 0,0050± 0,0010 (Au/min) respectivamente.



*Figura 15.* Captación de etidio en células ciliadas externas de epitelio coclear expuesto a distintas concentraciones de antagonista del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (ZM 241385), n=15. Se muestra la totalidad de las células ciliadas externas (A), la Fila 1 de Células ciliadas externas (B), Fila 2 de Células ciliadas externas (C) y Fila 3 de Células ciliadas externas (D). Se expresan la media y desviación estándar de la tasa de captación de etidio en las distintas condiciones: Basales de Breth, HANK, s/Ca<sup>+</sup>, ZM 10<sup>-10</sup>, ZM10<sup>-8</sup> ZM10<sup>-6</sup>.

Al igual que las células de sostén, las células ciliadas internas (Fig.16) presentan disminución significativa (pValue: <0,0002) de la captación de etidio tras la exposición a distintas concentraciones del antagonista del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (ZM 241385)



*Figura 16.* Captación de etidio en células ciliadas internas de epitelio coclear expuesto a distintas concentraciones del antagonista del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (ZM 241385), n=8. Se expresan la media y desviación estándar de la tasa de captación de etidio en las distintas condiciones: Basales Breth, HANK, s/Ca<sup>+</sup> 0,0072 ± 0,0003 (Au/min) y con agonista del receptor de adenosina a distintas concentraciones ZM 10<sup>-10</sup>, ZM10<sup>-8</sup> y ZM10<sup>-6</sup>, siendo 0,0059 ± 0,0002 (Au/min); 0,0051 ± 0,0005(Au/min), 0,0052 ± 0,0006(Au/min) respectivamente.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se muestra que la ausencia del receptor  $A_{2A}$  se asocia a otoprotección en modelos in vivo de hipoacusia por ruido. Mediante RT-PCR confirmamos la presencia de los transcritos de los receptores de Adenosina  $A_1$ ,  $A_{2A}$  y  $A_3$  en cultivos de coclea (Figura 8). Lo anterior concuerda con lo observado en estudios previos (Vlajkovic et al 2007, Vlajkovic et al 2009 y Nikolic et al 2001) (Figura suplementaria 2). Su presencia y distribución heterogénea en esta juega un papel preponderante en aspectos fisiológicos como la transmisión sináptica, despolarización neuronal, micromecánica coclear, señalización intercelular de calcio, mantención en el reciclaje del potasio, entre otros. (Vlajkovic et al 2009; Brand et al 2001; Linden, 2012; Ford et al., 1997). A su vez, se han identificado su papel en procesos fisiopatológicos como la hipoacusia inducida por ototóxicos como el cisplatino y la hipoacusia inducida por ruido (Vlajkovic et al, 2017, Ramkumar et al 2004; Chi, et al 2010).

En este último punto la fisiopatología de la pérdida auditiva inducida por ruido es diversa, incluyendo un aumento de actividad mitocondrial y con ello un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), reducción del flujo sanguíneo coclear, apoptosis y necrosis celular en el órgano de Corti y aumento de liberación de glutamato (Vlajkovic et al 2009; Fetoni et al., 2013). Lo anterior se refleja en cambios en el tejido coclear, muerte de células ciliadas, interrupción de esterocilios, alteraciones en las células del ganglio espiral y membrana basilar e inflamación de las células ciliadas (Liberman 2016; Abrashkin, et al 2006).

La adenosina parece prevenir el desarrollo de hipoacusias neurosensoriales, en este sentido los resultados presentados evidencian un efecto protector de la deficiencia del receptor de adenosina  $A_{2A}$  tras la exposición a ruido (Figura 9), lo que se evidencia en una preservación de los umbrales auditivos. Lo anterior discrepa con resultados de Mujica et al (2014), quienes evidenciaron que el antagonista del receptor de adenosina, cafeína, inhibe la regeneración espontánea de los umbrales auditivos en cobayas expuestas a ruido. Por el contrario, la eliminación de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  resultó en un aumento de la resistencia coclear al daño auditivo inducido por ruido (Vlajkovic, et al 2017). El daño coclear produce una activación de la ERK en las células de soporte, principalmente en las células de Deiters (Lahne., et al 2008).

No se pudo observar una relación entre el receptor de adenosina  $A_{2A}$  y los hemicanales de panexina y conexina presentes en las células de sostén, puesto que tras la exposición a agonista del receptor no se afecta su captación de etidio (Figura 11), y por ende, su permeabilidad. Lo anterior concuerda con estudios en tejido pulmonar que, al igual que en células de sostén, expresan hemicanales de conexina. Dierks, et al (2019) evidenció que la actividad de hemicanales no se ve afectada tras la exposición tanto al agonista del receptor de adenosina  $A_{2A}$ (CGS21680), como tras la exposición a antagonista del receptor de adenosina  $A_{2A}$ (SCH58261). No ocurre el mismo efecto en las células ciliadas, puesto que se observa una disminución significativa en la captación de etidio tras la exposición a agonista del receptor de adenosina  $A_{2A}$  en las células ciliadas externas e internas (Figuras 12 y 13) . Con base a ello, creemos que este efecto del receptor  $A_{2A}$  sobre la captación de etidio se asociaría a un efecto paracrino o directo en la liberación de ATP. Podríamos especular

ademas que dicha actividad del transportador debiera ser por un canal distinto a conexinas, dado que no requiere calcio, como por ejemplo alguno de la familia TRP (TRPA1, TRPML3 o TRPV4). Por otra parte, es posible que la captación de etidio por las células ciliadas, este dado por actividad del canal mecanotransductor de los estereocilios, que se ha demostrado es permeable a otras moléculas fluorescentes como FM1-43 (Zappia., et al 2016). Lo anterior implicaría que el agonista del receptor  $A_{2A}$  reduciría la actividad o presencia del canal en los estereocilios, lo que debe ser evaluado en futuros estudios.

Por su parte el antagonista del receptor de adenosina ZM 241385 tiene un efecto muy marginal o no tiene efecto en la captación basal de etidio de las células ciliadas (Figuras 15 y 16). Sin embargo, el tratamiento con antagonista produce una clara reducción en la captación de las células de soporte, dependiente de la concentración del antagonista utilizada (Figura 14). Lo anterior sugiere que hay un tono basal de activación del receptor de  $A_{2A}$  en la preparación de cóclea en cultivo, lo que podría inducir activación basal de hemicanales. Cabe destacar que no existen evidencias en el epitelio coclear que establezcan esta relación, por lo que este aspecto será evaluado en futuros estudios.

Dentro de las limitaciones de este estudio se encuentran la baja cantidad de animales KO del receptor de adenosina  $A_{2A}$  evaluados y el análisis farmacológico de los hemicanales de conexina y panexina en la cóclea.

Pese a que la eliminación del receptor de adenosina  $A_{2A}$  incrementa la resistencia coclear al daño auditivo inducido por ruido, en este estudio no pudimos comprobar la hipótesis de que su estimulación genera un aumento en la actividad de hemicanales presentes en células de sostén cocleares.

Por lo anterior se sugieren nuevas investigaciones en las que se realicen mediciones con liberación de ATP y que involucren la evaluación de la estimulación o inhibición del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> y el análisis farmacológico de hemicanales de conexina y panexina y los canales TRPA presentes en las células ciliadas tanto en animales WT, como en KO del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> y KO de Cx26.

## ANEXOS

Tabla Suplementaria 1:

*Análisis de animales utilizados*

	<b>KO</b>	<b>KO</b>	<b>WT</b>	<b>WT</b>	<b>Ratones</b>	<b>Cócleas</b>
	<b>A<sub>2A</sub>R</b>	<b>A<sub>2A</sub> R</b>	<b>S/HIR</b>	<b>HIR</b>		
	<b>S/HIR</b>	<b>HIR</b>				
<b>Generación de daño auditivo inducido por ruido y evaluación funcional de la vía auditiva</b>	3	3	3	3	6	12
<b>PCR (expresión receptores de adenosina en cóclea)</b>	0	0	2	0	2	4
<b>Estado funcional hemicanales tras antagonista de A<sub>2A</sub> R (tasador fluorescente)</b>	0	0	2	0	2	4
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>

KO A<sub>2A</sub> R S/HIR: ratón KO del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> R no expuesto a ruido.

KO A<sub>2A</sub> R HIR: ratón KO del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> R expuesto a ruido.

WT S/HIR: ratón C57BL/6 no expuesto a ruido

WT HIR: ratón C57BL/6 expuesto a ruido

Tabla Suplementaria 2

*Secuencia de Partidores utilizados.*

<b>Nombre</b>	<b>Partidores</b>		<b>Producto (pb)</b>
<b>A<sub>1</sub></b>	S	5'- CGGGATCCTACATCTCGGCCTTCCAGG- 3'	219
	AS	5'- GGAATTCAGTAGGTCTGTGGCCCAATG- 3'	
<b>A<sub>2A</sub></b>	S	5'- AGCCAGGGGTTACATCTGTG- 3'	163
	AS	5'- AGACAATCGGCTGCTCTGAT- 3'	
<b>A<sub>2B</sub></b>	S	5'- GGAATCCCCTCAGTGCTGTGAGC- 3'	256
	AS	5'- CGGGATCCTTTCACGGCTGCCTCTTC- 3'	
<b>A<sub>3</sub></b>	S	5'- CGGGATCCCGTCCGTGGTCAGTTTG- 3'	348
	AS	5'- GGAATTCGCAGGCGTAGACAATAGG- 3'	

S: Partidor Sentido, AS: Antisentido. Tamaño del producto esperado en pares de bases (pb)

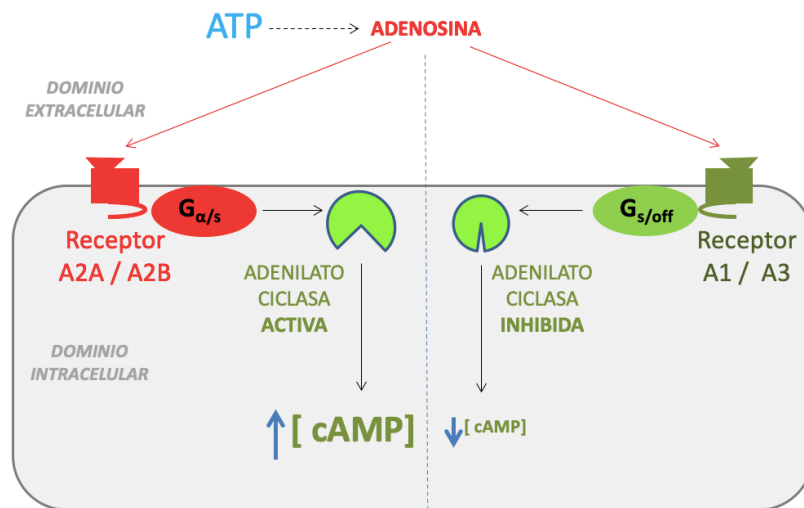


Figura Suplementaria 1. Receptores de adenosina y producción de cAMP

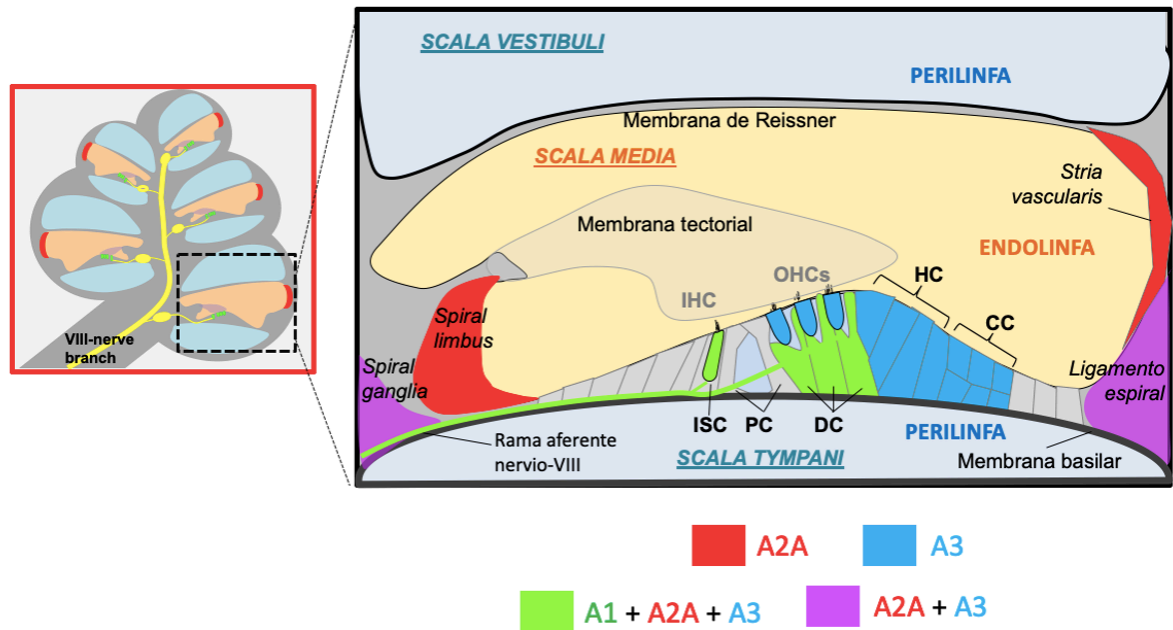


Figura Suplementaria 2. Receptores de Adenosina en cóclea

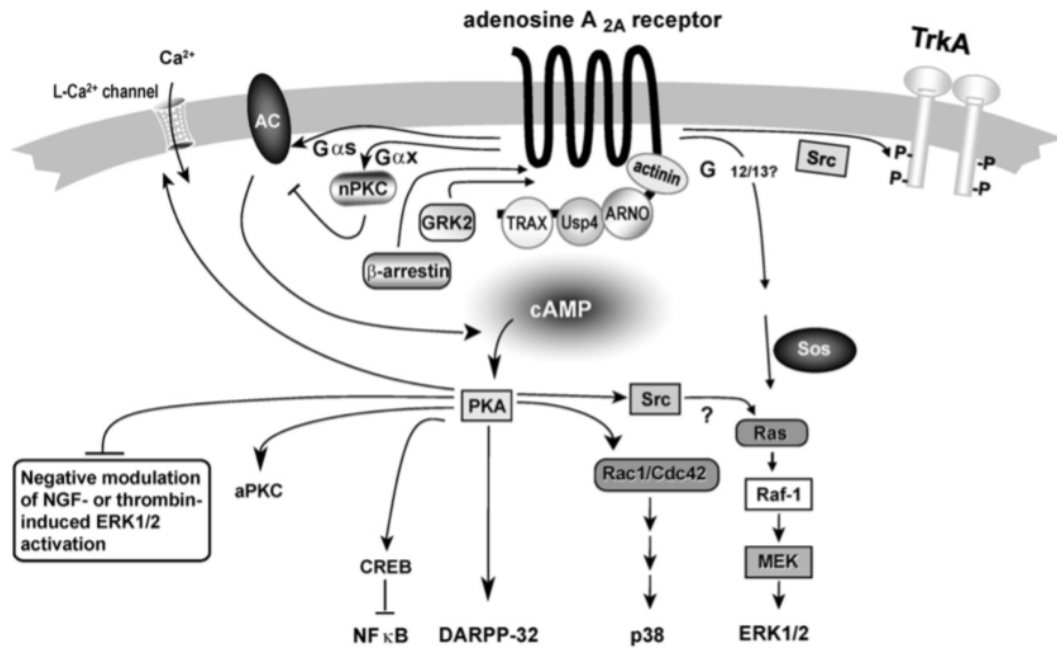


Figura Suplementaria 3. Receptor de Adenosina (Tomada de Vlajkovic, et al 2007). Evidencia la vía de señalización intracelular del receptor de adenosina A<sub>2A</sub>.

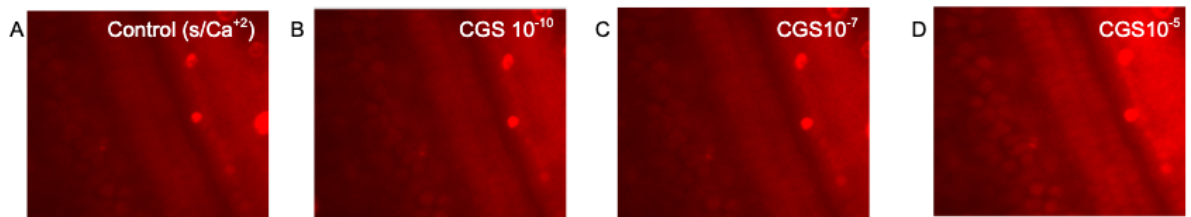
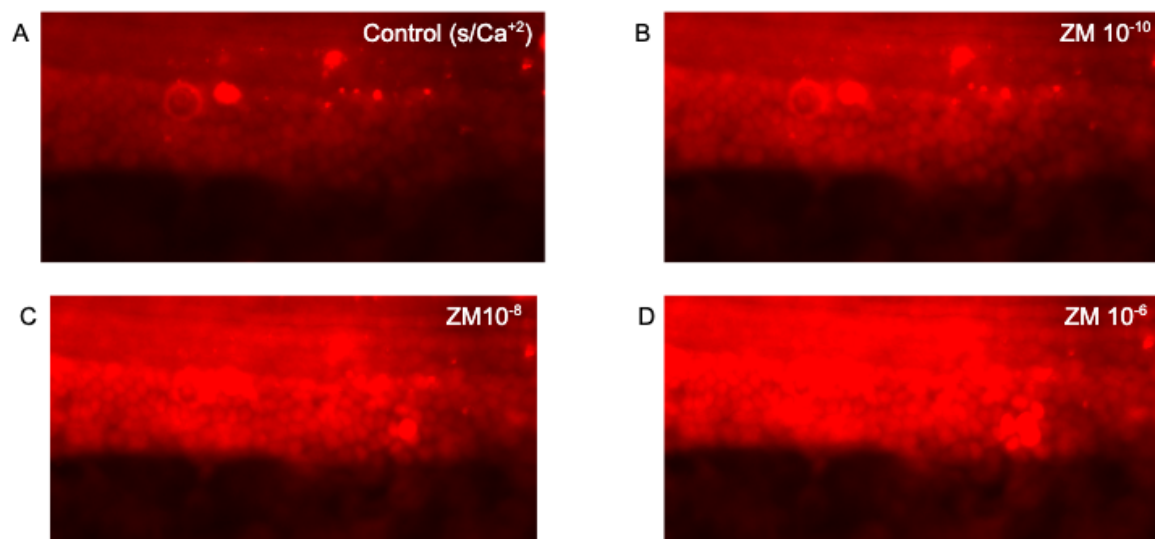


Figura Suplementaria 4. Captación de Bromuro de Etidio en Cóclea expuesta a distintas concentraciones de CGS 21680 (Agonista del receptor de Adenosina A<sub>2A</sub>) CGS 10<sup>-10</sup> (B), CGS 10<sup>-7</sup> (C) y CGS 10<sup>-5</sup> (D).



*Figura Suplementaria 5.* Captación de Bromuro de Etidio en Cóclea expuesta a distintas concentraciones de ZM 241385 (Antagonista del receptor de Adenosina A<sub>2A</sub>) ZM 10<sup>-10</sup> (B), ZM 10<sup>-8</sup> (C) y ZM 10<sup>-6</sup> (D).

## BIBLIOGRAFIA

- Abrashkin, K. A., Izumikawa, M., Miyazawa, T., Wang, C. H., Crumling, M. A., Swiderski, D. L., ... Raphael, Y. (2006). The fate of outer hair cells after acoustic or ototoxic insults. *Hearing Research*, 218(1-2), 20–29. <http://doi.org/10.1016/j.heares.2006.04.001>.
- Arauz S, Debas J (2012) Trauma Acústico. Segunda Versión. Ediciones Tricle.
- Anselmi, F., Hernandez, V. H., Crispino, G., Seydel, A., Ortolano, S., Roper, S. D., ... Mammano, F. (2008). ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca<sup>2+</sup> signals across the inner ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18770–18775. <http://doi.org/10.1073/pnas.0800793105>.
- Begandt, D., Bintig, W., Oberheide, K., Schlie, S. (2010). Dipyridamole increases gap junction coupling in bovine GM-7373 aortic endothelial cells by a cAMP-protein kinase a dependent pathway. *J Bioenerg Biomembr* 42, 79–84. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9262-2>.
- Bohne, B. A., Harding, G. W., & Lee, S. C. (2007). Death pathways in noise-damaged outer hair cells. *Hearing Research*, 223(1-2), 61–70. <http://doi.org/10.1016/j.heares.2006.10.004>.
- Brand, F., Klutz, A., Jacobson, K. A., & Fredholm, B. B. (2009). NIH Public Access, 590, 36–42. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.05.036>.
- Branstetter, B. K., Trickey, J. S., & Finneran, J. J. (2012). The Effects of Noise on Aquatic Life. *The Effects of Noise on Aquatic Life*, 730, 29–31. [67](http://doi.org/10.1007/978-1-</a></p></div><div data-bbox=)

4419-7311-5.

Bramhall NF, Shi F, Arnold K, Hochedlinger K, Edge AS. Lgr5- positive supporting cells generate new hair cells in the postnatal cochlea. *Stem Cell Reports*. 2014;2:311---22.

Brigitta Berglund B, Lindvall T, Schwela D. Guías para el ruido Urbano. Organización Mundial de la Salud.

Sip, Cunha, R.A. (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A<sub>2A</sub> receptor blockade. *Purinerg. Signal.*, 1:111-134.

Cyril M, Harris. 1995. Manual de medidas acústicas y control del ruido. Mc Graw-Hill. ISBN 8448116194.

Chen, C., Nenov, A., Bobbin, R.P. (1995). Noise exposure alters the response of outer hair cells to ATP. *Hearing research*, 215–221.

Chi, A. Guo, C. Gupta, R. Housley, G. Thome, P. Vlajkovic, S. 2010. Post exposure administration of A1 adenosine receptor agonists attenuates noise-induced hearing loss. *Hearing Research* 260, 81-88.

De Sebastián G, Badaraco J, Postan D. 1999. *Audiología Práctica*. Editorial medica Panamericana. España.

David, J., Muñoz,P., Thorne,G., Housley,T., Billett,J., Battersby. (1995). Extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP) in the endolymphatic compartment influences cochlear function. *Hearing Research*, 106-118.

Daniel, E. (2007). Noise and Hearing Loss: A Review. *Journal of School Health*, 225-231.

Day, Y. J., Huang, L., McDuffie, M. J., Rosin, D. L., Ye, H., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A., Fink, J. S., Linden, J., & Okusa, M. D. (2003). Renal protection from ischemia mediated by A<sub>2A</sub> adenosine receptors on bone marrow-derived cells. *The Journal of*

- clinical investigation, 112(6), 883–891. <https://doi.org/10.1172/JCI15483>
- Dierks, A., Bader, A., Lehrich, T., & Ngezahayo, A. (2019). Stimulation of the A<sub>2B</sub>Adenosine Receptor Subtype Enhances Connexin26 Hemichannel Activity in Small Airway Epithelial Cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 53(4), 606–622. <https://doi.org/10.33594/000000160>.
- Fetoni, A. R., De Bartolo, P., Eramo, S. L. M., Rolesi, R., Paciello, F., Bergamini, C., ... Troiani, D. (2013). Noise-induced hearing loss (NIHL) as a target of oxidative stress-mediated damage: cochlear and cortical responses after an increase in antioxidant defense. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(9), 4011–23. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2282-12.2013>.
- Ford, M. S., Maggirwar, S. B., Rybak, L. P., Whitworth, C., & Ramkumar, V. (1997). Expression and function of adenosine receptors in the chinchilla cochlea, 105, 130–140.
- Ford, M. S., Nie, Z., Whitworth, C., Rybak, L. P., & Ramkumar, V. (1997). Up-regulation of adenosine receptors in the cochlea by cisplatin. *Hearing research*, 111(1-2), 143–152. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(97\)00103-2](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(97)00103-2)
- Fredholm, B. B. (2007). Adenosine , an endogenous distress signal , modulates tissue damage and repair, 1315–1323. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402132>.
- Fredholm, B. B. (2011). Adenosine receptors as drug targets. *Exp Cell Res*, 316(8), 1284–1288. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.004.Adenosine>.
- Fredholm, B. B. (2013). Adenosine-a physiological or pathophysiological agent? *Journal of Molecular Medicine*, 1–6. <http://doi.org/10.1007/s00109-013-1101-6>.

- Fredholm, B. B., AP, I. J., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., & Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, 53(4), 527–552.
- Fredholm, B. B., Chen, J.-F., Masino, S. A., & Vaugeois, J.-M. (2005). ACTIONS OF ADENOSINE AT ITS RECEPTORS IN THE CNS: Insights from Knockouts and Drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 385–412. <http://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095731>.
- Fredholm, B. B., Chern, Y., Franco, R., & Sitkovsky, M. (2007). Aspects of the general biology of adenosine A<sub>2A</sub> signaling. *Progress in Neurobiology*, 83(5), 263–276. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.07.005>.
- Fredholm, B. B., Cunha, R. a, & Svenningsson, P. (2003). Pharmacology of adenosine A<sub>2A</sub> receptors and therapeutic applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(4), 413–26. <http://doi.org/10.2174/1568026033392200>.
- Fredholm, B. B., Ijzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J., & Mu, C. E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors — An Update, 63(1), 1–34. <http://doi.org/10.1124/pr.110.003285.1>.
- Fredholm, B. B., Johansson, S., & Wang, Y. (n.d.). Adenosine and the Regulation of Metabolism and Body Temperature, 61. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00003-5>.
- Gunewardene N, Guo CX, Wong AC, Thorne PR, Vljakovic SM. (2013). Adenosine amine congener ameliorates cisplatin-induced hearing loss. *World J Otorhinolaryngol*, 100-107.

- Han, B. R., Lin, S. C., Espinosa, K., Thorne, P. R., & Vljakovic, S. M. (2019). Inhibition of the Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Mitigates Excitotoxic Injury in Organotypic Tissue Cultures of the Rat Cochlea. *Cells*, 8(8), 877. <https://doi.org/10.3390/cells8080877>.
- Haque, K. D., Pandey, A. K., Kelley, M. W., Puligilla, C. . (2015). Culture of Embryonic Mouse Cochlear Explants and Gene Transfer by Electroporation. *J. Vis. Exp.* doi:10.3791/52260.
- Hight, N., McFadden, S., Henderson, R., Burkard., F Nicotera, T. (2003). Noise-induced hearing loss in chinchillas pre-treated with glutathione monoethylester and R-PIA,. *Hearing Research*, 21–32.
- Köles, L., Szepesy, J., Berekméri, E., & Zelles, T. (2019). Purinergic Signaling and Cochlear Injury-Targeting the Immune System? *International journal of molecular sciences*, 20(12). doi:10.3390/ijms20122979.
- Kujawa, S. G., & Liberman, M. C. (2009). Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(45), 14077–14085. doi:10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009.
- Kurabi A., Keithley E.M., Housley G.D., Ryan A.F., Wong A.C. (2017). Cellular mechanisms of noise-induced hearing loss. *Hear.* 349:129–137. doi: 10.1016/j.heares.2016.11.013.
- Lahne, M., & Gale, J. E. (2008). Damage-induced activation of ERK1/2 in cochlear supporting cells is a hair cell death-promoting signal that depends on extracellular ATP and calcium. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(19), 4918–4928. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4914-07.2008>

- Lappas, C. M., Sullivan, G. W., & Linden, J. (2005). Adenosine A<sub>2A</sub> agonists in development for the treatment of inflammation. *Expert Opin Investig Drugs*, 14(7), 797–806. <http://doi.org/10.1517/13543784.14.7.797>
- Le Prell, C. G., Yamashita, D., Minami, S. B., Yamasoba, T., & Miller, J. M. (2007). Mechanisms of noise-induced hearing loss indicate multiple methods of prevention. *Hearing Research*, 226(1-2), 22–43. <http://doi.org/10.1016/j.heares.2006.10.006>
- Liberman, M. 2016. Noise-induced hearing loss: Permanent versus Temporary threshold Shifts and the effects of hair cell versus neuronal degeneration. *Life II, Advances in Experimental Medicine and Biology*, 875.
- Linden, J. (2012). Role of adenosine in response to vascular inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(4), 843–844.
- Lukashkina, V. A., Yamashita, T., Zuo, J., Lukashkin, A. N., & Russell, I. J. (2017). Amplification mode differs along the length of the mouse cochlea as revealed by connexin 26 deletion from specific gap junctions. *Scientific reports*, 7(1), 5185. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04279-3>
- Mahanthappa, N.K. (1994) Regeneration in the auditory system: lessons from other epithelia, and persisting puzzles. *Trends Neurosci.* 17: 357-359.
- Menéndez, D. I., Castillo, I., Carrillo, B., Villamar, M., Ponce del León, M., Uriarte, A., Moreno, F. (2001). Mutaciones del gen de la conexina 26 (CJB2) en familias cubanas con Sorderas No Sindrómicas Autosómicas Recesivas, 20(3), 167–172.
- Mujica-Mota, MA; Gasbarrino, K .; Rappaport, JM; Shapiro, RS; Daniel, SJ El efecto de la cafeína en la audición en un modelo de conejillo de indias de trauma acústico. *A.m. J. Otolaryngol. Cabeza Cuello Med. Surg.* 2014 , 35 , 99-105.

- Muller G. Hall J. (1998). Audiologist desk referent, volumen II. Audilogic Management Rehabilitation and terminology. California. Singular Publishing group.
- Nae, S. Back, S. Park, H. Seo, J. Noh, H. Akil, O. Lusting, L. Won, S. 2013. Comparison of functional and morphologic characteristics of mice models of noise-induced hearing loss. *Auris Nasus Larynx*. 40, 11-17.
- Nikolic, P., Housley, G. D., Luo, L., Ryan, A. F., & Thorne, P. R. (2001). Transient expression of P2X(1) receptor subunits of ATP-gated ion channels in the developing rat cochlea. *Brain research. Developmental brain research*, 126(2), 173–182. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(00\)00149-8](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(00)00149-8).
- Nie, Z., Mei, Y., Ford, M., Rybak, L., Marcuzzi, A., Ren, H., ... Ramkumar, V. (1998). Oxidative Stress Increases A1 Adenosine Receptor Expression by Activating Nuclear Factor  $\kappa$ B. *Mol.Pharm.*, 53, 663–669.
- Nordmann, A. S., Bohne, B. A., & Harding, G. W. (2000). Histopathological differences between temporary and permanent threshold shift. *Hearing Research*, 139(1-2), 13–30. [http://doi.org/10.1016/S0378-5955\(99\)00163-X](http://doi.org/10.1016/S0378-5955(99)00163-X).
- North, R. (2002). Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiological Reviews*, 1013–1067.
- Park, S. N., Back, S. A., Park, K. H., Seo, J. H., Noh, H. Il, Akil, O., ... Yeo, S. W. (2013). Comparison of functional and morphologic characteristics of mice models of noise-induced hearing loss. *Auris Nasus Larynx*, 40(1), 11–17. <http://doi.org/10.1016/j.anl.2011.11.008>.
- Patuzzi, R. (2011). Ion Flow in Cochlear Hair Cells and the Regulation of Hearing

- Sensitivity. *Hearing research*, 280, 3-20. doi:10.1016/j.heares.2011.04.006.
- Plontke, S. K., Bauer, M., & Meisner, C. (2007). Comparison of pure-tone audiometry analysis in sudden hearing loss studies: lack of agreement for different outcome measures. *Otology & neurotology* : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology, 753-763.
- 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. *Hearing Research*, 188(1-2), 47–56. [http://doi.org/10.1016/S0378-5955\(03\)00344-7](http://doi.org/10.1016/S0378-5955(03)00344-7).
- Rivas J., Ariza H., (2007) Tratado de Otolología y Audiología: Diagnóstico y tratamiento médico quirúrgico. Segunda edición, Editorial Amolca, Bogotá, Colombia.
- Salesa, B., Perello, S., Bonavida, E. (2013). Tratado de Audiología. Barcelona: Masson.
- Sanz, L., Murillo-Cuesta, S., Cobo, P., Cediél-Algovia, R., Contreras, J., Rivera, T (2015). Swept-sine noise-induced damage as a hearing loss model for preclinical assays. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(FEB), 1–13. <http://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00007>.
- Shen, J., Harada, N., Nakazawa, H., Kaneko, T., Izumikawa, M., & Yamashita, T. (2006). Role of nitric oxide on ATP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Brain Research*, 1081(1), 101–112. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.12.129>.
- Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L. P., & Ramkumar, V. (2014). Adenosine receptors: Expression, function and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 2024–2052. <http://doi.org/10.3390/ijms15022024>.

- Schreck R, Albermann K, Baeuerle P, 1992. Nuclear factor KB: an oxidative stress responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radical Research Communications*, Vol 17, Issue 4, 1992.
- Sirko, P. G. (2019). Intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling in the adult mouse cochlea. *The Journal of Physiology*, 303–317.
- Shi, L., Liu, K., Wang, H., Zhang, Y., Hong, Z., Wang, M., ... Yang, S. (2015). Noise induced reversible changes of cochlear ribbon synapses contribute to temporary hearing loss in mice. *Acta Oto-Laryngologica*, 135(11), 1093–102. <http://doi.org/10.3109/00016489.2015.1061699>.
- Smith, A. (2003) *La cóclea, fisiología y patología*. Editorial Médica Panamericana.
- Stöver, T. y Diensthuber, M. (2011). *Biología molecular de la audición. Temas actuales de GMS en otorrinolaringología, cirugía de cabeza y cuello*, 10, Doc06. <https://doi.org/10.3205/cto000079>
- Suarez H. Velluti, R. (2001) *La cóclea Fisiología y Patología*. Ediciones Trilce. Uruguay
- Suárez C. Gil-Garcedo L. Medina J. Ortega P- Marco J. Trinidad J. (2007). *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*. Madrid: Panamericana.
- Szucs, A., Somodi, S., Batta, T. J., Tóth, A., Szigeti, G. P., Csernoch, L., Panyi, G., & Sziklai, I. (2006). Differential expression of potassium currents in Deiters cells of the guinea pig cochlea. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 452(3), 332–341. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-0038-1>

- Verselis V. K. (2019). Connexin hemichannels and cochlear function. *Neuroscience letters*, 695, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.09.020>
- Vlajkovic, S. T. (2002). Distribution of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases 1 and 2 in rat cochlea. *Hearing Research*, 127–138.
- Vlajkovic, S. M., Abi, S., Wang, C. J. H., Housley, G. D., & Thorne, P. R. (2007). Differential distribution of adenosine receptors in rat cochlea. *Cell and Tissue Research*, 328(3), 461–471. <http://doi.org/10.1007/s00441-006-0374-2>.
- Vlajkovic, S. M., Chang, H., Paek, S. Y., Chi, H. H., Sreebhavan, S., Telang, R. S., ... Thorne, P. R. (2014). Adenosine Amine Congener as a Cochlear Rescue Agent, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/841489>.
- Vlajkovic, S. M., Housley, G. D., & Thorne, P. R. (2009). Adenosine and the auditory system. *Current Neuropharmacology*, 7(3), 246–256. <http://doi.org/10.2174/157015909789152155>.
- Vlajkovic, S.M., Lee, K., Wong, A. (2010). Adenosine amine congener mitigates noise-induced cochlear injury. *Purinergic Signalling*, 273–281. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s11302-010-9188-5>.
- Vlajkovic S.M., Ambepitiya K., Barclay M., Boison D., Housley G.D., Thorne P.R. (2017). Adenosine receptors regulate susceptibility to noise-induced neural injury in the mouse cochlea and hearing loss. *Hear.* 345:43–51. doi: 10.1016/j.heares.2016.12.015.
- Wakabayashi, K., Fujioka, M., Kanzaki, S., James, H., Shibata, S., Ogawa, K., & Okano, H. (2010). Blockade of interleukin-6 signaling suppressed cochlear inflammatory response

- and improved hearing impairment in noise-damaged mice cochlea. *Neuroscience Research*, 66(4), 345–352. <http://doi.org/10.1016/j.neures.2009.12.008>.
- Wang, J., Van De Water, T. R., Bonny, C., de Ribaupierre, F., Puel, J. L., & Zine, A. (2003). A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against both aminoglycoside and acoustic trauma-induced auditory hair cell death and hearing loss. *The Journal of Neuroscience*, 23(24), 8596–8607. <http://doi.org/23/24/8596>.
- Wang, X. H., Streeter, M., Liu, Y. P., & Zhao, H. B. (2009). Identification and characterization of pannexin expression in the mammalian cochlea. *Journal of Comparative Neurology*, 512(3), 336–346. <http://doi.org/10.1002/cne.21898>.
- Wang, Y., Hirose, K., Liberman, M.C. (2002). Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, 248–268.
- Werner A. (2006). *Afecciones auditivas de origen ocupacional*. Ediciones argentinas. Argentina.
- Wong, A. C. Y., 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. *Hearing Research*, 260(1-2), 81–88. <http://doi.org/10.1016/j.heares.2009.12.004>.
- Wong, A. C. Y., & Ryan, A. F. (2015). Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(APR), 1–15. <http://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00058>.
- Zappia, K. Garrison, S. Palygin, O. Weyer, A. Barabas, M. Lawlor, M. Staruschenko, A. Stucky, C. (2016). Mechanosensory and ATP Release Deficits following Keratin14-Cre-Mediated TRPA1 Deletion Despite Absence of TRPA1 in Murine Keratinocytes.

Plos One 11(3), e0151602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151602>

- Zhao, H., Zhu, Y., Liang, C., & Chen, J. (2015). Biochemical and Biophysical Research Communications Pannexin 1 deficiency can induce hearing loss, *463*, 143–147. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.049>.
- Zhou X. X., Chen S., Xie L., Ji Y. Z., Wu X., Wang W. W., et al. . (2016). Reduced connexin26 in the mature cochlea increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 17:301. 10.3390/ijms17030301.
- Zhu, Y., & Zhao, H. B. (2010). ATP-mediated potassium recycling in the cochlear supporting cells. *Purinergic signalling*, 6(2), 221-229. doi:10.1007/s11302-010-9184-9.
- Zhu, Y., Liang, C., Chen, J., Zong, L., Chen, G. D., & Zhao, H. B. (2013). Active cochlear amplification is dependent on supporting cell gap junctions. *Nature communications*, 4, 1786. <https://doi.org/10.1038/ncomms2806>