

Instituto de Biología y Genética Molecular-CSIC



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

“Terapia celular dirigida contra la sordera: estudio de la capacidad de transdiferenciación de células madre mesenquimales humanas y de fibroblastos hacia células sensoriales del oído interno”

Memoria de tesis presentada por

Ana Feijoo Redondo

para optar al grado de doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Thomas Schimmang
M^a Beatriz Durán Alonso

Valladolid 2014

El trabajo presentado en esta tesis ha sido financiado por las Ayudas a la contratación de personal investigador de reciente titulación universitaria, cofinanciado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo (*ORDEN EDU/1933/2008*)



**Junta de
Castilla y León**
Consejería de Educación



**Europa impulsa
nuestro crecimiento**

UNIÓN EUROPEA

Fondo Social Europeo





Universidad de Valladolid

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVA)

D. Thomas Schimmang, con D.N.I. nº X1758051T

investigador científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas del Instituto de Biología y Genética Molecular

y **Dña M^a Beatriz Durán Alonso**, con D.N.I, nº 12759435R

investigadora del Instituto de Biología y Genética Molecular

como directores de la Tesis Doctoral titulada **“Terapia celular dirigida contra la sordera: estudio de la capacidad de diferenciación de células madre mesenquimales humanas y fibroblastos hacia células sensoriales del oído interno”** presentada por Dña. Ana Feijoo Redondo, alumna del programa de doctorado en Investigación Biomédica impartido por el departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología.

AUTORIZAN la presentación de la misma, considerando que el trabajo de Tesis Doctoral que se presenta constituye un trabajo de investigación original y que el doctorando ha satisfecho todos los requisitos legales y ha superado con éxito su periodo de aprendizaje y especialización en el campo de la especialización básica en Biología.

Valladolid, 19 de Mayo de 2014

Los Directores de la Tesis,

Fdo.: Dr. Thomas Schimmang

Dra. M^a Beatriz Durán Alonso

*“La sucesión de investigadores es comparable
a un solo hombre que aprende indefinidamente”*

Blaise Pascal (1623-1662)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, tengo que agradecer a Thomas y a Beatriz la dirección de esta tesis. A Thomas por aceptarme y contar conmigo durante todos estos años, por su paciencia y por su optimismo. A Beatriz, por haber sido también compañera de fatigas, un terremoto capaz de diseñar y llevar mil experimentos al mismo tiempo. Gracias por tener tantas ideas, por enseñarme y ayudarme tanto a pesar de las diferencias de horarios y de velocidad.

Como no, a todos los demás compis del labo C8, por todo lo que he aprendido y pasado con ellos:

Iris, la número dos del laboratorio, sólo un poco por debajo del jefe. He aprendido mucho de desarrollo y del oído con “tus” ratoncitos. Aunque casi no hemos compartido trabajo, estos casi 6 años han dado para mucho: cotilleos, desayunos, comidas de tupper y muuuchos cafés... Me lo he pasado genial estando en el labo contigo y ¡me has dado muchos ánimos! Seguiré apareciendo de vez en cuando para que no perdamos la costumbre y me mantengas al día de las novedades.

Magnolia, la primera en enseñarme el labo y gran compañera en la sala de cultivos. ¡Ya se me podría haber pegado algo de tu orden y tu paciencia!

Víctor, el rey de los huevos y las *in situs*. Gracias por enseñarme algunas de tus técnicas secretas y por ayudarme a desconectar comentando las noticias y chistes del día.

Azucena por estar siempre dispuesta a ayudar, dentro y fuera del labo. ¡Te deseo muchísima suerte!

También agradecer a muchos más compañeros del IBGM por su ayuda con las distintas máquinas y cacharros de laboratorio, por dejarme materiales varios justo cuando los necesitaba, por ayudarme con papeleos y gestiones... A todos los que han pasado por la sala de culti de la planta baja en estos últimos años, que habéis sido muchos... ¡he estado muy a gusto con todos vosotros!

Y más allá del IBGM, tengo que dar las gracias a muchas más personas:

Para haber llegado aquí fueron decisivos los nueve meses que pasé en el INIBIC (de aquellas, unidad de investigación del C. H. U. Juan Canalejo). Gracias a Emma, Claudia, Tamara y el resto de compis de máster y de labo por compartir mis primeros pasos en el *maravilloso mundo de la ciencia* y hacer que lo disfrutara tanto. Por engancharme al café de media mañana, vital para rendir en el trabajo. A Silvia, especialmente, por conseguir lo más difícil: ser “jefa” y gran compañera a la vez. Fuera del labo, millones de gracias a Joha, que fue el Sol que tanto eché de menos en Coruña, y a Lauriña, por ser una estupenda amiga y guía cultural.

En el PRBB, muchas gracias a todo el laboratorio de desarrollo: sois todo amabilidad y simpatía! En especial a Fernando (mil gracias por tus comentarios), Gina y Héctor. No pudo ser para la tesis pero en sólo un mes aprendí mucho de vosotros.

Los que habéis estado a la salida del trabajo os merecéis el mejor sitio en estos agradecimientos:

A mis amigos y residentes en Valladolid, a los que empezaron y sobre todo a los que están ahora. He disfrutado mucho de esta ciudad y he descubierto mil lugares y aficiones gracias a vosotros. A las PuceLanas por las meriendas antiestrés y haber despertado mi creatividad, imprescindible para superar los momentos críticos de la tesis. A las compis de piso, por ser unas buenas y hacer la convivencia tan fácil.

A las amigas que me reciben con los brazos abiertos cada vez que vuelvo a Sevilla, que me conocen y no me preguntan cuánto me queda para no fastidiar el momento... A las que compartieron el camino de la Biología, ¡ánimo! ¡Me encanta seguir contando con vosotras después de tantos años!

A Aníbal, porque se lo debía del proyecto del máster. Porque sigue creyendo que puedo con todo, y sobre todo porque es una gran persona.

A mis padres, a mi hermana y a mi abuela Carmela por recordarme que esto era sólo un trabajo, que tengo que comer bien, salir de compras y de cervecitas, hacer deporte, viajar y todo eso que hacen las personas normales. Por preguntarme sólo '¿qué tal estás?'. Porque os preocupáis de lo que realmente vale la pena. A los sobrinos, propios y "ajenos", por hacerme pensar en todo lo que queda por venir.

Y finalmente, todo un clásico en las tesis: un enooooorme agradecimiento al señor Guillermo Manrique Cerrato, para que no haya dudas, Willy para los íntimos. Gracias por no volverte loco durante estos últimos meses (o años) de estrés, agobios, lloros y lamentos. Gracias por todos los ánimos, las risas, los viajes con y sin furgo, por meterme en tu familia así de golpe y a lo loco, por estar conmigo SIEMPRE aunque estés lejos, por adaptarte a mis fines de semana y a mi caos pre-tesis. Ahora nos toca hacer muchos planes!!!

A todos los que de algún modo habéis ayudado a que esto salga adelante,
¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE

	<u>Página</u>
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	xix
ABREVIATURAS	xxiii
RESUMEN	xxv
<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. EL OÍDO INTERNO DE LOS VERTEBRADOS	3
1.1. Anatomía y función	3
1.2. Audición	6
1.3. Desarrollo	6
1.3.1. Origen y morfogénesis del oído interno	6
1.3.2. Formación y regionalización de la vesícula ótica	8
1.3.3. Formación de las neuronas sensoriales auditivas	9
1.3.4. Regionalización del ducto coclear y formación del órgano de Corti	10
1.3.5. Diferenciación de las células ciliadas en el órgano de Corti	11
2. LA PÉRDIDA DE LA AUDICIÓN	14
2.1. Tipos de discapacidad auditiva	14
2.2. Causas de la discapacidad auditiva neurosensorial	15
2.3. Los implantes cocleares	15
3. LA INVESTIGACIÓN EN TERAPIAS PARA PREVENIR O CURAR LA SORDERA NEUROSENSORIAL	16
3.1. Protección de las células sanas mediante la administración de factores de supervivencia	17
3.1.1. Factores neurotróficos	17
3.1.2. Antioxidantes	19
3.1.3. Estimulación eléctrica	19
3.2. Regeneración celular a partir de células endógenas	21
3.2.1. Capacidad de regeneración de CC en los distintos grupos de vertebrados	21

3.2.2. Inducción de la regeneración de CC en mamíferos	22
3.3. Implante de células exógenas: Terapia celular en el oído interno	23
3.3.1. Células madre embrionarias	26
3.3.2. Células madre pluripotentes inducidas	28
3.3.3. Transdiferenciación directa	29
3.3.4. Células madre adultas	30
3.3.4.1. Células madre del oído interno	31
3.3.4.2. Células madre neurales	32
3.3.4.3. Células madre mesenquimales	33
<u>OBJETIVOS</u>	37
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	41
1. CULTIVO CELULAR	43
1.1. Células empleadas	43
1.2. Mantenimiento de los cultivos celulares	44
1.3. Tratamientos para la diferenciación de las CMMh	45
1.3.1. Generación de progenitores neurales	45
1.3.1.1. Tratamientos en monocapa	45
1.3.1.2. Tratamientos en cultivos no adherentes	46
1.3.2. Inducción de la expresión de marcadores de CC	47
1.3.3. Inducción de la expresión de marcadores de NSA	48
1.4. Tratamientos para la diferenciación de fibroblastos	50
1.4.1. Inducción de genes proneurales a partir de cultivos no adherentes	50
1.4.2. Tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina	50
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CMMh	50
2.1. Citometría de flujo	50
2.2. Estudios de diferenciación celular	51
3. INMUNOCITOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA	52

4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	53
4.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc	53
4.2. PCR cuantitativa	54
5. PLÁSMIDOS, CLONAJES Y SUBCLONAJES	56
5.1. Plásmidos utilizados	56
5.2. Transformación de bacterias competentes	60
5.3. Extracción y purificación del ADN plasmídico de las bacterias	60
6. INTRODUCCIÓN DE ADN EN CÉLULAS EN CULTIVO	61
6.1. Transfección por liposomas	61
6.2. Electroporación	62
6.2.1. Electroporación convencional	62
6.2.2. <i>Nucleofection</i>	62
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63
<u>RESULTADOS</u>	65
1. ESTUDIOS DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CMMh DE MÉDULA ÓSEA HACIA CÉLULAS SENSORIALES DEL OÍDO INTERNO	67
1.1. Caracterización de las CMMh durante su expansión en cultivo	67
1.2. Efecto de la sobreexpresión de Atoh1 en la diferenciación de las CMMh	69
1.3. Inducción de la expresión de genes neurales tempranos	73
1.4. Inducción de la expresión de marcadores de CC a partir de PN derivados de CMMh	76
1.4.1. Inducción mediante factores de crecimiento	76
1.4.1.1. El ejemplo de las CME de ratón	76
1.4.1.2. Inducción de la expresión de marcadores de CC en CMMh a partir de un modelo humano	78
1.4.2. Cocultivos de PN con células estromales de utrículo de embrión de pollo	80

1.5. Inducción de la expresión de marcadores de NSA a partir de PN derivados de CMMh	82
1.5.1. Inducción mediante factores de crecimiento	82
1.5.1.1. Método NSA1	82
1.5.1.2. Método NSA2	84
1.5.1.3. Método NSA3	84
1.5.1.4. Método NSA4	87
1.5.2. Inducción mediante cocultivo con explantes cocleares: método NSA5	89
2. ESTUDIOS DE REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS HACIA CC	91
2.1. Reprogramación directa de fibroblastos mediante transfección con factores clave en la formación de las CC	91
2.1.1. Ensayos preliminares de transfección	91
2.1.2. Transfección con factores de transcripción en NIH/3T3	92
2.1.2.1. Transfección con Atoh1 y Sox2	93
2.1.2.2. Transfección con Eya1 y Six1	95
2.2. Obtención de PN mediante el cultivo de los fibroblastos en presencia de factores de crecimiento	97
2.3. Reprogramación mediante inhibidores de la metilación del ADN: 5azadC	99
<u>DISCUSIÓN</u>	105
1. APLICACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS EN LA TERAPIA CELULAR FRENTE A LA PÉRDIDA DE AUDICIÓN	107
2. CMMh DE LA MÉDULA ÓSEA	108
2.1. Las CMMh procedentes de la médula ósea pueden ser una herramienta útil en terapias regenerativas, pero tienen ciertas limitaciones	108
2.2. La transfección de Atoh1 no induce la expresión de Miosina7a en los cultivos derivados de CMMh	110
2.3. Varios protocolos basados en el cultivo con factores de crecimiento y otras moléculas de señalización logran la conversión de las CMMh en un PN que expresa los genes proneurales Sox2 y Nestina	112

2.4. Diferenciación de CMMh hacia CC: El cultivo en presencia de EGF y AR aumenta la expresión de marcadores de CC en PN, pero sólo en aquellos generados a partir de esferas en EGF/bFGF	114
2.5. Varios métodos de diferenciación a partir de PN derivados de CMMh llevan a la expresión de marcadores de NSA, todos basados en diferentes combinaciones de Shh, FGF y AR	115
2.6. El epitelio coclear de ratón neonato libera al medio factores de crecimiento o genera señales que promueven la expresión de marcadores neuronales en PN derivados de CMMh	116
2.7. La respuesta de las CMM a los tratamientos de diferenciación hacia células sensoriales del oído interno empleando factores de crecimiento es diferente dependiendo de la especie animal	117
3. REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS A CÉLULAS CILIADAS	118
3.1. Los fibroblastos son una fuente de células disponibles para la reprogramación a una gran variedad de células diferenciadas	118
3.2. Transfección de fibroblastos NIH/3T3 con factores clave para el desarrollo de las CC	119
3.2.1. Transfección con Sox2 y Atoh1	120
3.2.2. Transfección con Eya1/Six1	123
3.3. Los fibroblastos humanos y de ratón no responden a los tratamientos empleados con las CMMh para obtener PN	123
3.4. Efecto del agente desmetilante del ADN 5azadC en la expresión de genes de pluripotencia y del linaje ótico en los fibroblastos de ratón NIH/3T3	124
3.4.1. Regulación transcripcional de los genes de la línea celular NIH/3T3 mediante 5azadC	124
3.4.2. 5azadC como potenciador de la reprogramación celular	126
3.5. La elección del tipo de fibroblasto adecuado para los estudios de diferenciación. Ventajas e inconvenientes de los fibroblastos primarios humanos y las líneas celulares de ratón	127
<u>CONCLUSIONES</u>	129
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	133
ANEXOS	159

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Página

INTRODUCCIÓN

Figuras

Figura I1	Anatomía del oído humano	4
Figura I2	Anatomía de la cóclea	5
Figura I3	Desarrollo del oído de un mamífero	7
Figura I4	Inducción y regionalización de la vesícula ótica	9
Figura I5	Diferenciación de los distintos tipos celulares a partir del epitelio sensorial auditivo	13
Figura I6	Población con discapacidad auditiva en España	14
Figura I7	Estructura de un implante coclear	16

Tablas

Tabla I1	Efectos de la administración de factores neurotróficos, antioxidantes y estimulación eléctrica en modelos animales de sordera inducida por factores ambientales.	20
Tabla I2	Ventajas e inconvenientes de las distintas aproximaciones de terapia regenerativa según el tipo celular utilizado	25

MATERIALES Y MÉTODOS

Figuras

Figura MM1	Esquema resumen de los tratamientos realizados para inducir la formación de PN a partir de CMMh	46
Figura MM2	Esquema resumen de los tratamientos realizados para inducir un fenotipo de CC a partir de CMMh	48
Figura MM3	Esquema resumen de los tratamientos empleados para la diferenciación de las CMMh a células similares a NSA	49
Figura MM4	Vectores empleados para sobreexpresar Atoh1 en las CMMh	57
Figura MM5	Plásmidos transfectados en los experimentos de diferenciación de los fibroblastos humanos y murinos	59

Tablas

Tabla MM1	Anticuerpos utilizados en la caracterización fenotípica de las CMMh mediante citometría de flujo	51
Tabla MM2	Anticuerpos primarios empleados en inmunocitoquímica	53
Tabla MM3	Anticuerpos secundarios empleados en inmunocitoquímica	53
Tabla MM4	Secuencias de los cebadores empleados en la qPCR para la amplificación del ARNm humano	55
Tabla MM5	Secuencias de los cebadores empleados en la qPCR para la amplificación del ARNm de ratón	55

RESULTADOS

Figuras

Figura R1	Caracterización por citometría de flujo de un cultivo representativo de CMMh a p7	68
Figura R2	Diferenciación adipogénica y osteogénica de CMMh	69
Figura R3	Mapas de los vectores utilizados para sobreexpresar Atoh1 en las CMMh	70
Figura R4	Transfección de Atoh1 en cultivos de CMMh	72
Figura R5	Esquema de la metodología empleada para inducir la expresión de marcadores de PN en las CMMh	74
Figura R6	Inducción de la expresión de marcadores neurales en cultivos derivados de CMMh	75
Figura R7	Diferenciación de CME de ratón hacia células con características de CC	76
Figura R8	Diferenciación de CMMh hacia CC siguiendo el mismo procedimiento que para las CME	77
Figura R9	Análisis por métodos ICC de la inducción de marcadores de CC en CMMh mediante ICC	79
Figura R10	Análisis mediante qPCR de la inducción de marcadores de CC en CMMh	80
Figura R11	Cocultivo de PN derivados de CMMh con células estromales de utrículo de embrión de pollo	81
Figura R12	Método de diferenciación hacia neuronas sensoriales auditivas NSA1	83

Figura R13	Método de diferenciación hacia neuronas sensoriales auditivas NSA2	85
Figura R14	Método de diferenciación hacia neuronas sensoriales auditivas NSA3	86
Figura R15	Método de diferenciación hacia neuronas sensoriales auditivas NSA4	88
Figura R16	Expresión de la proteína β III-tubulina en cultivos de CMMh crecidas en presencia de 20% SBF	89
Figura R17	Método de diferenciación hacia neuronas sensoriales auditivas NSA5: cocultivo de PN con explantes de cócleas de ratón neonato	90
Figura R18	Transfección de las líneas celulares de fibroblastos de ratón 3T3 Swiss albino y NIH/3T3 con el plásmido pLV-IRES-eGFP utilizando <i>Lipofectamina+plus reagent</i>	92
Figura R19	Efectos de la transfección de Atoh1, Sox2 y Atoh1+Sox2 en fibroblastos de ratón NIH/3T3	94
Figura R20	Transfección de Eya1 y Six1 en fibroblastos NIH/3T3	96
Figura R21	Inducción de la expresión de genes neurales y de pluripotencia en fibroblastos humanos después del tratamiento con factores que promueven la formación de PN a partir de CMMh	98
Figura R22	5azadC a altas concentraciones causa muerte celular en la línea NIH/3T3	99
Figura R23	5azadC a bajas concentraciones induce la expresión de los genes de pluripotencia Sox2 y Oct4 en la línea NIH/3T3	101
Figura R24	Expresión de marcadores de progenitores neurales y óticos en cultivos tratados con 5azadC 0,1 μ M	102
Figura R25	Expresión a nivel de ARNm de Atoh1, Miosina7a y Brn3c en cultivos tratados con 5azadC 0,1 μ M	102

DISCUSIÓN

Figuras

Figura D1	Esquemas del modelo de regulación “incoherent feed forward loop” (ciclo de prealimentación incoherente)	121
-----------	---	-----

ABREVIATURAS

5azadC	5'aza-deoxicitidina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AR	Ácido retinoico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
βME	β-mercaptoetanol
BSA	Seroalbúmina bovina
CC	Células ciliadas
CME	Células madre embrionarias
CMM	Células madre mesenquimales
CMMh	CMM humanas
cols.	colaboradores
CS	Células de soporte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DMEM	Medio de cultivo <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

DNS	Dominio neurosensorial
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
h	Hora
IBMX	Isobutilmetilxantina
ICC	inmunocitoquímica
IGF1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
iPS	Células madre pluripotentes inducidas
IRES	Sitio interno de entrada del ribosoma
LIF	Factor inhibidor de leucemia
min	Minutos
MSS	Medio sin suero
NF200	Neurofilamento 200
NSA	Neuronas sensoriales auditivas
NT3	Neurotrofina 3
p	Pase o subcultivo de células
PBS	Tampón fosfato salino
PN	Progenitores neurales
PS	Penicilina/estreptomicina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa

RT-PCR	PCR con transcriptasa reversa
s	Segundo
SBF	Suero bovino fetal
Shh	Sonic Hedgehog
SNHL	Pérdida de audición neurosensorial
VO	Vesícula ótica
TA	Temperatura ambiente

RESUMEN

La pérdida de audición es la discapacidad sensorial más común en el ser humano. En los mamíferos, las células ciliadas (CC) del oído interno y las neuronas sensoriales auditivas (NSA) no se regeneran espontáneamente y su degeneración puede provocar una pérdida de audición permanente. En la actualidad se analizan diferentes posibilidades para evitar la pérdida de las células sensoriales del oído o conseguir una regeneración funcional del tejido mediante, por ejemplo, la terapia celular. Para la terapia celular se pueden emplear células madre diferenciadas hacia el tipo celular deseado o células somáticas reprogramadas. En este trabajo se ha estudiado el potencial de las células madre mesenquimales humanas (CMMh) y los fibroblastos para diferenciarse a células sensoriales del oído interno. Para ello se emplearon diferentes métodos: sobreexpresión de genes clave en la formación de las CC, cultivo en presencia de factores de crecimiento y moléculas de señalización que intervienen en el desarrollo del oído y agentes desmetilantes del ADN, frecuentemente utilizados en estudios de reprogramación y transdiferenciación.

La transfección de *Atoh1*, un gen clave en la diferenciación de CC, resultó en un fenotipo apoptótico de las CMMh transfectadas. La diferenciación de las CMMh hacia un estado de progenitor neural (PN) previamente a la sobreexpresión de *Atoh1* tampoco conllevó su diferenciación hacia un fenotipo similar al de CC. Por otro lado, la sobreexpresión de *Atoh1* y *Sox2* en NIH/3T3 indujo la expresión endógena de *Sox2*, *Atoh1* y *Brn3c*, pero no de *Miosina7a*. Además, se aplicaron distintas combinaciones de factores de crecimiento y moléculas de señalización para inducir la diferenciación de los cultivos celulares hacia un estado intermedio de PN. Aunque ninguno de los métodos probados resultaron en la obtención de PN a partir de fibroblastos, varios de éstos permitieron conseguir PN a partir de CMMh. Estos PN neurales mostraron distintas capacidades para expresar marcadores de CC y NSA tras diversos tratamientos: Solo PN obtenidos en cultivos no adherentes (esferas) en presencia de EGF y bFGF expresaron marcadores de CC a nivel de ARNm y proteína tras el tratamiento con EGF y ácido retinoico (AR). Además, sólo los PN generados en presencia de AR se diferenciaron a hacia fenotipos similares a NSA en presencia de bFGF, Shh y AR. El cocultivo con explantes cocleares también indujo la expresión de marcadores neuronales en los PN.

Por otro lado, se estudió el efecto de 5'aza-deoxicitidina, un compuesto demetilante del ADN, sobre las NIH/3T3 y se determinó que concentraciones bajas del compuesto pueden ser de utilidad para la reprogramación celular ya que activan la transcripción de genes de pluripotencia y del desarrollo del oído interno.

Por último, y de acuerdo con otras publicaciones, se observó que existen diferencias en las respuestas de células de ratón y humanas a los tratamientos de diferenciación.



INTRODUCCIÓN

1. EL OÍDO INTERNO DE LOS VERTEBRADOS

1.1 Anatomía y función

El oído de los vertebrados es la estructura sensorial responsable de la audición, el control del equilibrio, la detección de la aceleración y la orientación espacial. Se divide en tres compartimentos anatómicos: oído externo, medio e interno (Figura I1).

- Oído externo: incluye el pabellón de la oreja y el canal auditivo externo.
- Oído medio: Es una cavidad excavada en el hueso temporal que contiene una cadena de huesecillos (martillo, yunque y estribo). Estos huesecillos conectan la membrana timpánica con la ventana oval, que comunica con el oído interno.
- Oído interno: Se encuentra alojado en el hueso temporal, recubierto de una capa ósea (cápsula ótica) que protege los epitelios sensoriales. Dentro del compartimento epitelial del oído está la endolinfa, un fluido especializado con una composición iónica característica, alta concentración de iones K^+ y baja de iones Na^+ , fundamental en los procesos de mecano-recepción y transducción del sonido. Entre la cápsula ótica y el compartimento endolinfático hay otro fluido, la perilinfa, compuesta de una mezcla de filtrado de sangre y del líquido cefalorraquídeo (Novack y cols., 2005).

Las células sensoriales que llevan a cabo las funciones específicas del oído interno son las células ciliadas (CC). Estas células están especializadas en la detección de estímulos mecánicos y en su traducción a señales eléctricas (Raphael y Altschuler, 2003). Las CC están asociadas a otro tipo celular, las células de soporte (CS). Las CS son células no sensoriales que ejercen importantes funciones: mantenimiento de la estructura morfológica del epitelio sensorial, mantenimiento de un ambiente iónico correcto y liberación de factores que regulan el tropismo y la supervivencia de las células ciliadas (Monzack y Cunningham, 2013). Las CC asociadas a las CS conforman un total de seis parches sensoriales localizados a lo largo de todo el oído interno (Kiernan y cols., 2002):

- La zona vestibular: formada por los canales semicirculares (Figura I1), localizados dorsalmente, y las cavidades del vestíbulo (utrículo y sáculo), en la parte central, en cuyo interior se encuentran las zonas sensoriales responsables de detectar el movimiento y la posición. Los parches sensoriales del aparato vestibular se clasifican en dos tipos, crestas y máculas. Las crestas son órganos con forma de montículo que se encuentran en la base de los tres canales semicirculares, mientras que las máculas son zonas planas sensoriales localizadas en el utrículo y sáculo.

- La zona auditiva se encuentra en la parte ventral del oído interno. En los mamíferos el órgano encargado de la audición es la cóclea. Contiene el ducto coclear, que recorre la espiral, y se encuentra dividido mediante dos membranas en tres cavidades: la escala media, llena de endolinfa, la escala vestibular y la escala timpánica, llenas de perilinfa (Figura I2A). En la escala media se encuentra el epitelio sensorial del oído, llamado órgano de Corti (Figura I2B), situado sobre la membrana basilar. En el órgano de Corti las CC se organizan en una fila de CC internas y 3 de CC externas. En su parte apical, las CC tienen unas proyecciones de actina denominadas estereocilios que están en contacto con la membrana tectorial (Figura I2B), una matriz extracelular rica en colágeno (Schwander y cols., 2010).

Las CC vestibulares y cocleares están inervadas por neuronas sensoriales del nervio cocleovestibular (Figura I1 y I2), que proyectan hacia el núcleo vestibular y auditivo en el sistema nervioso central. Los somas de estas neuronas se encuentran en los ganglios vestibular y coclear o espiral, reflejando la doble función del oído.

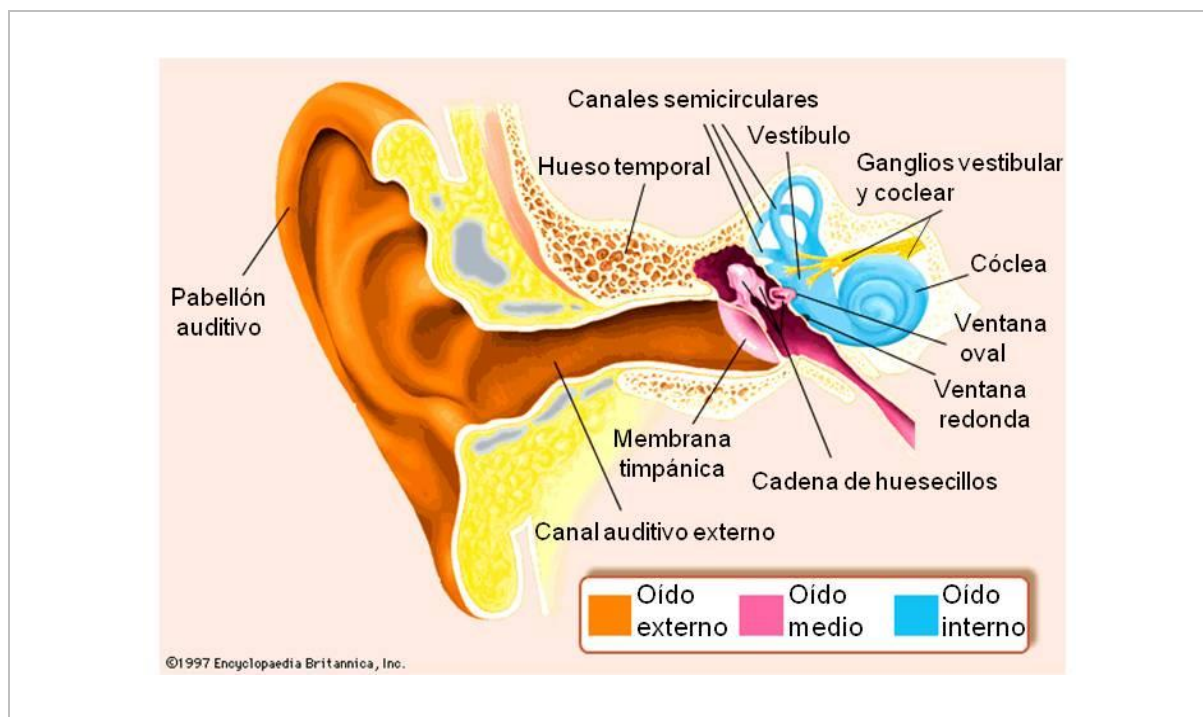


Figura I1. Anatomía del oído humano. El oído de los mamíferos se divide en tres zonas bien diferenciadas anatómica y funcionalmente: el oído externo, que recoge las ondas sonoras mediante el pabellón auditivo y las conduce al interior a través del canal auditivo externo hasta la membrana timpánica; el oído medio, que trasmite las vibraciones del tímpano por la cadena de huesecillos hasta la ventana; y el oído interno, que contiene, por un lado, el epitelio sensorial auditivo (cóclea) y, por otro lado, los epitelios sensoriales encargados del control del equilibrio, la detección de la aceleración y la orientación espacial (canales semicirculares y vestíbulo). Los epitelios sensoriales están inervados por neuronas de los ganglios cocleares y vestibulares. Imagen modificada de <http://global.britannica.com/EBchecked/topic/175622/human-ear>

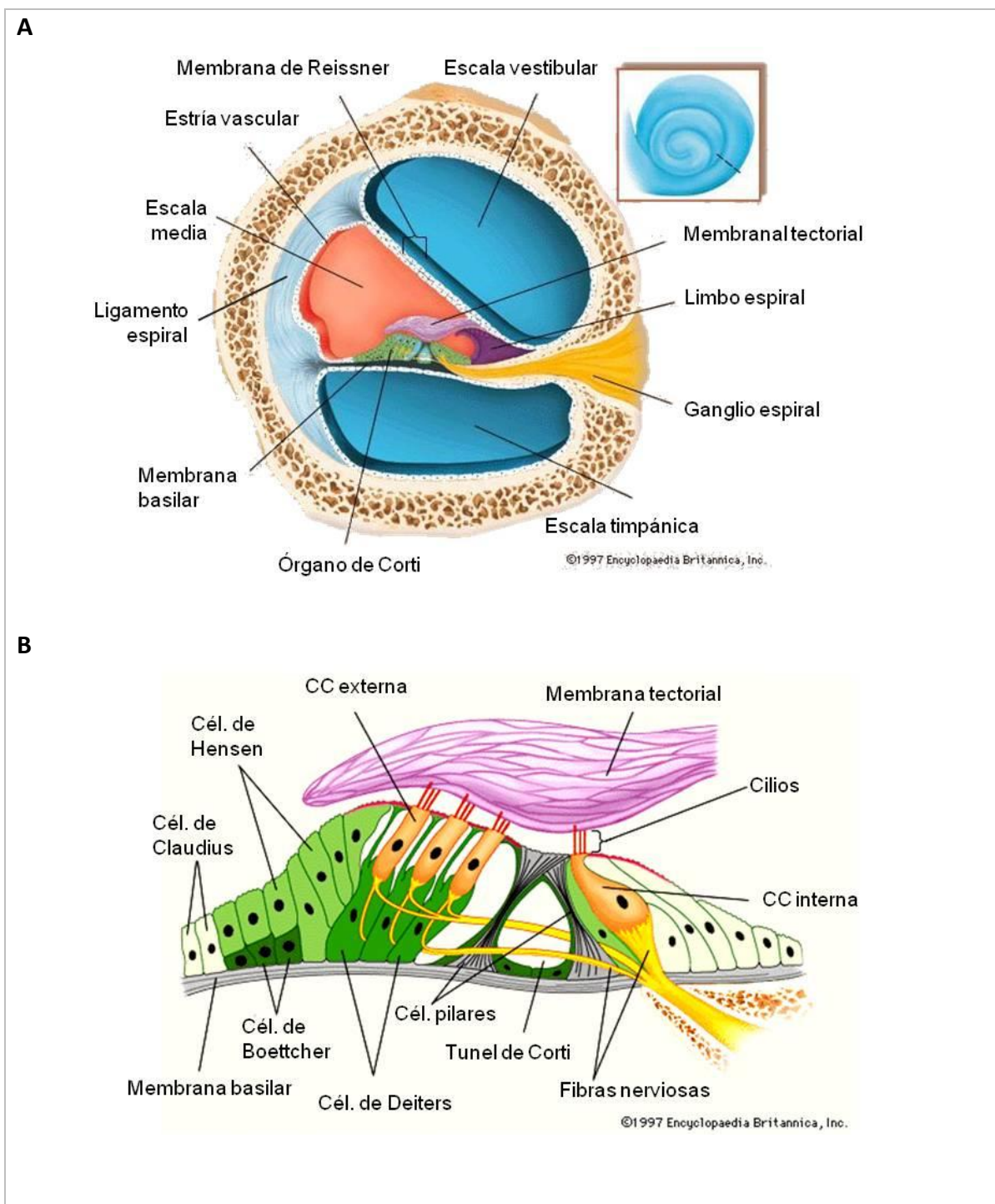


Figura 12. Anatomía de la cóclea. (A) Esquema de una sección del ducto coclear, donde se señalan los distintos elementos funcionales de la cóclea y las 3 cavidades en las que se divide. En la cavidad intermedia (escala media) se encuentra el epitelio sensorial encargado de la audición, el órgano de Corti. **(B)** Esquema del órgano de Corti. Se muestra la organización de las células que forman el órgano de Corti: las CC, ordenadas en tres filas de CC externas y una de CC internas, y las CS (indicadas en verde), que según su función y localización reciben nombres diferentes. Las CC se encuentran inervadas por neuronas que forman el ganglio espiral. Imágenes modificadas de <http://global.britannica.com/EBchecked/topic/175622/human-ear>
 CC: células ciliadas; CS: células de soporte.

1.2 Audición

En la audición, el papel principal del oído externo y medio es conducir las ondas sonoras desde el ambiente hacia el oído interno, la parte sensorial: El pabellón auditivo dirige las ondas y las conduce por el canal auditivo. Las ondas sonoras golpean la membrana timpánica y las vibraciones de ésta se transmiten a la cadena de huesecillos del oído medio. El estribo, conectado a la membrana de la ventana oval transmite estas vibraciones al oído interno y la endolinfa (Figura I1).

Cuando las vibraciones del sonido se transmiten a la endolinfa, el movimiento de los cilios de las CC contra la membrana tectorial provoca un flujo de K^+ que despolariza las CC. El potencial de receptor así generado se transmite a las neuronas sensoriales auditivas (NSA) a través de una sinápsis y así se conduce la información hacia el cerebro. La transducción sensorial depende del mantenimiento de la composición iónica de la endolinfa, de lo cual se encargan las células de la estría vascular, capa superior del ligamento espiral que forma la pared lateral de la escala media (Figura I2A) (Wangemann, 2006).

Debido a la organización del órgano de Corti, el tamaño de los cilios y el grosor de la membrana basilar, las CC en diferentes posiciones responden a diferentes frecuencias. De este modo, las células de la parte basal responden a altas frecuencias mientras que las situadas en la parte apical de la cóclea lo hacen a frecuencias bajas. A su vez, la posición de las CC a lo largo de sus ejes longitudinales está correlacionada con la posición de las neuronas sensoriales del ganglio coclear. El orden tonotópico de las NSA en el ganglio coclear se conserva en los núcleos cerebrales, de modo que el cerebro pueda distinguir las diferentes frecuencias de los sonidos (Novack y cols., 2005).

Por otro lado, existen mecanismos que amplifican el movimiento de la membrana basilar. Ante un sonido, las CC internas detectan la vibración de la membrana basilar y activan las neuronas aferentes. Sin embargo, las CC externas son capaces de aumentar la vibración de la membrana basilar de modo que amplifican la señal e incrementan la sensibilidad de las CC internas al sonido. Esta amplificación no es lineal y permite que los sonidos suaves se amplifiquen con mayor intensidad que los más fuertes (Schwander y cols., 2010).

1.3 Desarrollo del oído interno en vertebrados

1.3.1 Origen y morfogénesis del oído interno

El oído interno y el nervio vestibulococlear tienen como origen principal la placoda ótica. Las placodas craneales son engrosamientos ectodérmicos epiteliales que se forman en

distintas posiciones del embrión de vertebrados y están implicadas en la formación de los órganos de los sentidos y los ganglios sensoriales craneales (Ladher y cols., 2010).

Algunas estructuras del oído interno no derivan de la placoda ótica. Por ejemplo, la cresta neural origina la estría vascular y las células de la glía del ganglio cocleovestibular. Las células del mesodermo formarán el tejido conectivo del oído (Kiernan y cols., 2002). Recientemente también se ha sugerido que células derivadas de la cresta neural pueden invadir el epitelio ótico durante el desarrollo, formando parte de las estructuras no sensoriales del aparato vestibular y coclear del oído adulto (Freyer y cols., 2011).

La placoda ótica se sitúa en la región anterior y dorsal del embrión, lateral a la cresta neural y adyacente a la zona de la placa neural que da lugar al romboencéfalo. En el ratón, la formación de la placoda ótica ocurre entre el día 8 y 8,5 del desarrollo embrionario (E8-8,5) (Ladher y cols., 2010). En respuesta a las distintas señales de tejidos circundantes, la placoda se invagina formando una estructura denominada copa ótica. A E9,5 la invaginación es completa y se forma la vesícula ótica (VO) u otocisto. Durante la última fase de la copa ótica comienza la delaminación de neuroblastos epiteliales, que migran hacia la zona medial y forman el nervio cocleovestibular. A partir de E10,5 se observan cambios morfogénéticos en la VO: la parte más dorsal se desplaza medialmente para formar el ducto endolinfático, poco después (E12), la porción ventral de la VO se elonga en dirección ventral, iniciándose el desarrollo de la cóclea. Casi al mismo tiempo, los canales semicirculares evaginan dorsalmente. Ventralmente a la zona de los canales aparecen sucesivamente el utrículo y el sáculo. El crecimiento de las distintas zonas del oído continúa hasta después del nacimiento (Morsli y cols., 1998) (Figura I3).

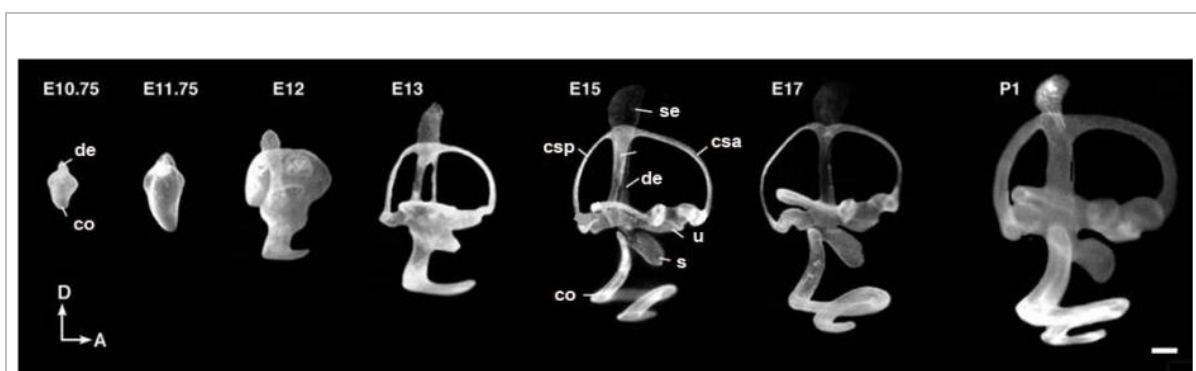


Figura I3. Desarrollo del oído de un mamífero. Vista lateral del oído interno de ratón en desarrollo donde se ha inyectado pintura de látex, de E10.75 a día postnatal 1 (P1). Barra de escala, 200µm. Modificado de Morsli y cols., 1998
 de, ducto endolinfático; co, cóclea; se, saco endolinfático; csa, canal semicircular anterior; csp, canal semicircular posterior; csl, canal semicircular lateral; u, utrículo; s, sáculo. D, dorsal; A, anterior.

1.3.2 Formación y regionalización de la vesícula ótica

La inducción de la placoda ótica está regulada por señales de los tejidos circundantes: notocorda, tubo neural, mesodermo y endodermo (Bok y cols., 2007a). Estudios realizados en aves y mamíferos sugieren que la inducción ótica depende fundamentalmente de la expresión de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y Wnts desde el mesodermo y el tubo neural (Wright y Mansour, 2003; Freter y cols., 2008; Ladher y cols., 2010) (Figura 4A). Después, el epitelio ótico continúa recibiendo señales externas que determinan la especificación de los ejes antero-posterior, dorso-ventral y lateral-medial (Figura 4B) (revisado en Wu y Kelley, 2012). El establecimiento de estos ejes es determinante para la formación de las distintas estructuras del oído.

- Eje antero-posterior: durante el estadio de la copa ótica se observa una expresión restringida de los genes *Lunatic fringe*, *Fgf10*, *Six1* y *Sox2* en la parte anterior con respecto a la posterior. Esta zona se denomina dominio neurosensorial (DNS) y da lugar a las neuronas, CC y CS, mientras que la zona posterior de la VO dará lugar principalmente a tejidos no sensoriales y a la cresta posterior (Morsli y cols., 1998; Bok y cols., 2007a; Abelló y cols., 2010). Los gradientes de síntesis y degradación del ácido retinoico (AR) son necesarios para el establecimiento de este eje, de modo que en la parte anterior las células menos expuestas al AR dan lugar a neuronas y gran parte de los órganos sensoriales mientras que las altas concentraciones de AR en la zona posterior del otocisto promueven la formación de estructuras no sensoriales (Bok y cols., 2011). Por otro lado, los FGFs parecen estar implicados en el carácter neurosensorial (anterior), mientras que BMP4 parece promover el carácter no neural (posterior) (Vazquez-Echeverría y cols., 2008; Abelló y cols., 2010) (Figura 4B).
- Eje dorso-ventral: la especificación dorso-ventral es dependiente de señales procedentes del romboencéfalo, como Wnts, secretados desde la parte dorsal, y Sonic Hedgehog (Shh), inicialmente secretado desde la notocorda y posteriormente desde la zona ventral del romboencéfalo (Riccomagno 2002 y 2005; Bok y cols., 2007b). Estas señales van a restringir el DNS a la zona ventral anterior de la VO (Figura 4B y 5A).
- Eje medial-lateral: Se conoce poco sobre el establecimiento del eje medial-lateral. Parece que las señales procedentes del romboencéfalo podrían ser importantes en este proceso, que confina la expresión de *Pax2* y *Gbx2* a la zona medial de la VO, donde se desarrollará el ducto coclear. En la zona lateral-dorsal, los genes *Hmx2*, *Hmx3* y *Dlx5* marcan el territorio donde se formarán los canales semicirculares. El establecimiento de este eje parece ser determinante para la especificación de las neuronas vestibulares y cocleares (Fekete y Wu, 2002).

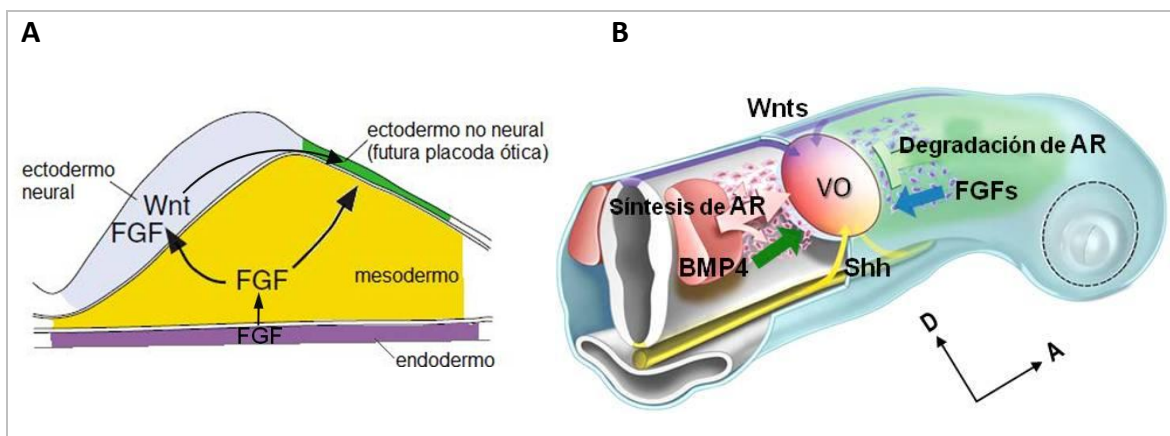


Figura 14. Inducción y regionalización de la vesícula ótica. (A) Modelo resumido de la inducción de la VO. Esquema de un corte transversal de un embrión en desarrollo a nivel de la placoda ótica. La inducción ótica comienza durante el estadio de neúrla con la secreción de FGFs desde el endodermo, que inducen la expresión de FGFs en el mesodermo. Más adelante, FGF del mesodermo ya empieza a actuar sobre el ectodermo no neural, mientras que induce en el ectodermo neural la expresión de FGF y Wnts. Finalmente, es la señalización procedente del ectodermo neural la que termina de definir la zona donde se va a formar la VO. Imagen modificada de Ladher y cols., 2010. (B) Regionalización de la VO. En el esquema se señalan las moléculas implicadas en el establecimiento de las distintas regiones. Un gradiente de síntesis y degradación de AR y la expresión de FGFs van a determinar que en la zona anterior se forme el DNS. Altas concentraciones de AR y la expresión de BMP4 promueven la inducción de las regiones no sensoriales en la zona posterior. Por otro lado, señalización procedente del romboencéfalo (Wnts desde la zona dorsal y Shh, desde la zona ventral) restringen el DNS a la zona ventral-anterior de la VO. Imagen modificada de Wu y Kelley, 2012.

A: anterior; AR: ácido retinoico; D: dorsal; DNS: dominio neurosensorial; FGF: factor de crecimiento de los fibroblastos; Shh: Sonic Hedgehog; VO: vesícula ótica.

1.3.3 Formación de las neuronas sensoriales

La formación de las neuronas sensoriales del oído comienza en la zona ventral anterior de la VO, en el DNS. Allí, una subpoblación de células comienza a expresar el gen proneural Neurogenina1 (Ngn1) (Figura 5A). Ngn1 es un factor de transcripción de tipo bHLH asociado con el linaje neurogénico en el oído interno. Su expresión está seguida de la de otro factor de transcripción, Neurod1, necesario para la delaminación de los neuroblastos del epitelio ótico, así como para su supervivencia durante el proceso de diferenciación (Ma y cols., 1998; Kim y cols., 2001). Los neuroblastos también expresan Delta1, uno de los ligandos de Notch, desencadenándose con ello la activación de la vía de Notch en células vecinas, lo que impide que éstas se diferencien también a neuroblastos. Este proceso se denomina inhibición lateral (Murata y cols., 2012)

Sox2 es necesario para el inicio de la neurogénesis en la VO (Puligilla y cols 2010), e induce las expresión de Ngn1 (Neves y cols., 2012) probablemente mediante la unión a su promotor como ocurre en otros sistemas (Cimadamore y cols., 2011; Jeon y cols., 2011). Sin embargo, también es necesario que posteriormente la expresión de Sox2 disminuya

en los neuroblastos para que se produzca la expresión de Neurod1 y la diferenciación (Evsen y cols., 2013). La señalización de los FGFs interviene en el inicio de la neurogénesis (Abelló y cols., 2010) y el factor de crecimiento de insulina tipo 1 (IGF1) es importante para la supervivencia, proliferación y diferenciación de los neuroblastos (Varela-Nieto y cols., 2004). Posteriormente, durante la diferenciación neural, las células expresan el factor de transcripción Islet1 y el marcador neural β III tubulina (Bell y cols., 2008).

Después de la delaminación y migración de los neuroblastos, estos se agrupan para formar el ganglio cocleo-vestibular, que posteriormente se separa en un ganglio dorsal (vestibular) y un ganglio ventral (auditivo). Se piensa que la especificación puede ocurrir ya en el otocisto, ya que parece que los neuroblastos “vestibulares” delaminan antes de la región anterior y lateral mientras que los “auditivos” lo hacen, un poco más tarde, de la zona medial y posterior (Bell y cols., 2008). Además, estas zonas son molecularmente distintas: la zona vestibular es positiva para Fgf3, mientras que la auditiva lo es para Gata3 y Lmx1a Lawoko-Kerali y cols., 2004; Koo y cols., 2009).

Las NSA dejan de dividirse entre E10 y E12,5, progresivamente desde la base al ápex. Estas neuronas van a proyectar sus axones hacia el núcleo auditivo en el sistema nervioso central, y neuritas hacia el órgano de Corti, para inervar las CC. En el momento de la extensión de las neuritas, el órgano de Corti no está formado, pero ya hay expresión de factores neurotróficos que atraen a las fibras nerviosas en desarrollo y que son necesarios para la supervivencia de las NSA (Yang y cols., 2011b).

1.3.4 Regionalización del ducto coclear y formación del órgano de Corti

Las células del DNS que no delaminan durante la neurogénesis forman los denominados parches prosensoriales, que son las zonas competentes para dar lugar a los órganos sensoriales (Figura 5A). La expresión de Jagged1 activa la vía Notch, que mantiene la expresión de Sox2 en el dominio prosensorial, y ello es necesario y suficiente para retener el potencial sensorial de los progenitores óticos (Pan y cols., 2010; Neves y cols., 2013). La morfogénesis del oído ocurre a la vez que la especificación de los distintos tipos celulares dentro de las diferentes regiones sensoriales y no sensoriales del oído. En esta memoria nos centraremos en el desarrollo y diferenciación del ducto coclear, formado a partir de la elongación de la zona ventral de la VO.

Ya antes de E11,5 en el ratón, empiezan a expresarse marcadores prosensoriales como Jagged1, Sox2 y Lunatic fringe en la zona ventral del ducto coclear. Durante su crecimiento, esta zona también se va regionalizando en dominios especializados que se caracterizan por la expresión de determinados marcadores dando lugar a las distintas partes de la cóclea: el dominio prosensorial, que da lugar al órgano de Corti caracterizado por la expresión de Sox2, el órgano de Kolliker o surco espiral interno (Fgf10), el surco

espiral externo (Bmp4) y la zona dorsal que da lugar a la estría vascular, a la membrana de Reissner y a otras estructuras no sensoriales (Figura I2A) (Burton y cols., 2004).

En el establecimiento de estas regiones intervienen numerosos factores externos y del propio epitelio. Por ejemplo, Shh, procedente del tubo neural y más tarde del ganglio espiral, delimita el dominio prosensorial en la cóclea durante el desarrollo (Driver y cols., 2008, Brown y Epstein, 2011; Bok y cols., 2013). Los factores de transcripción Tbx1 y Pou3F4, procedentes del mesénquima ótico, también son importantes en la elongación del ducto coclear. El efecto de estos factores parece estar mediado por el AR y Shh (Riccomagno y cols., 2002; Braunstein y cols., 2009). BMP4 establece unos gradientes de concentración que también parecen ser necesarios para el desarrollo del dominio prosensorial y el surco espiral externo, donde se concentra su expresión (Ohyama y cols., 2010). Distintos FGFs han demostrado ejercer su acción también en este momento del desarrollo (Pirvola y cols., 2000; Hayashi y cols., 2008).

1.3.5 Diferenciación de las células ciliadas en el órgano de Corti

Dentro del dominio prosensorial comienza a expresarse $p27^{kip1}$, un inhibidor del ciclo celular que promueve la mitosis terminal de las células prosensoriales que darán lugar a las CC y CS. Se establece así un gradiente de salida del ciclo celular que se inicia en el ápex de la cóclea aproximadamente a E11.5 y que llega a la base hacia E14,5-15,5. Justo después de la expresión de $p27^{kip1}$ en la base de la cóclea, comienzan los primeros signos de diferenciación sensorial caracterizada por la expresión del gen proneural Atoh1, un factor de transcripción de tipo bHLH. Este gen se comporta como un gen maestro para el desarrollo de las CC (Birmingham y cols., 1999; Chen y cols., 2002; Woods y cols., 2004). El gradiente de diferenciación sensorial ocurre en sentido opuesto al del fin de la proliferación, de la base al ápex, de modo que las CC de la base muestran los primeros signos de diferenciación inmediatamente después de la mitosis final. Finalmente, la expresión de Atoh1 se restringe a las células que van a dar lugar a las CC mediante un proceso de inhibición lateral (Chen y cols., 2002; Kiernan y cols., 2005a). Teniendo en cuenta la importancia de regular el número de células que finalmente se diferencian en CC, es probable que existan varios niveles de control que determinen qué células expresarán Atoh1.

Sox2, que se expresa en el dominio prosensorial del ducto coclear (figura 5A), es necesario para que haya expresión de Atoh1 (Kiernan y cols., 2005b). Sin embargo, también es capaz de inhibir la diferenciación a CC ya que una prolongada expresión de Sox2 en las células prosensoriales induce la expresión de inhibidores de Atoh1 y la inhibición de Sox2 lleva a un aumento en el número de CC. Por otro lado, una vez activada la expresión de Atoh1 y apagada la expresión de Sox2, la transcripción de Atoh1 se mantiene en las futuras células ciliadas mediante un mecanismo de retroalimentación

positiva, es decir, Atoh1 activa su propia transcripción (Dabdoub y cols., 2008; Neves y cols., 2013). La vía canónica de los Wnts también podría actuar induciendo la expresión de Atoh1 (Shi y cols., 2010).

La vía de señalización mejor caracterizada en el proceso de regulación de Atoh1 es vía Notch. Los receptores Notch y sus ligandos son proteínas transmembrana, por lo que la señalización tiene lugar mediante el contacto célula-célula. La expresión de los factores de transcripción de tipo bHLH (como Atoh1 o Ngn1) activa la expresión de los ligandos de Notch, que se unen a receptores Notch en células vecinas induciendo la activación de la vía. Esto provoca la liberación del dominio intracelular de Notch y la inducción de la expresión de factores Hes/Hey que son inhibidores de los genes proneurales. El resultado es que las células que expresan factores proneurales inhiben su expresión en las células vecinas, previniendo así su diferenciación. Este modelo de inhibición lateral explica la estructura reticular de los epitelios sensoriales del oído interno, formada por la alternancia de CC y CS. En el epitelio auditivo la expresión de Atoh1 activa la expresión de los ligandos de Notch, Jagged2 y Delta-like 1 y esto activa la vía Notch en las células adyacentes, lo que provoca la expresión de Hes5 y Hey1, que inhiben la expresión de Atoh1 en las CS (Doetzlhofer y cols., 2009; Neves y cols., 2011). Éstas en cambio retienen la expresión de Sox2 que contribuye a prevenir su diferenciación a CC y mantiene la competencia sensorial (Figura I5B).

Tras la determinación, las CC sufren un proceso de maduración, del cual existen varios marcadores: el factor de transcripción Brn3c, marcadores estructurales como Miosina 6 y 7a y proteínas de unión a Ca^{2+} como Calretinina y Parvalbúmina (Hackney y cols., 2005; Schwander y cols., 2010). Finalmente, las CC maduras dejan de expresar Atoh1 (Cafaro y cols., 2007).

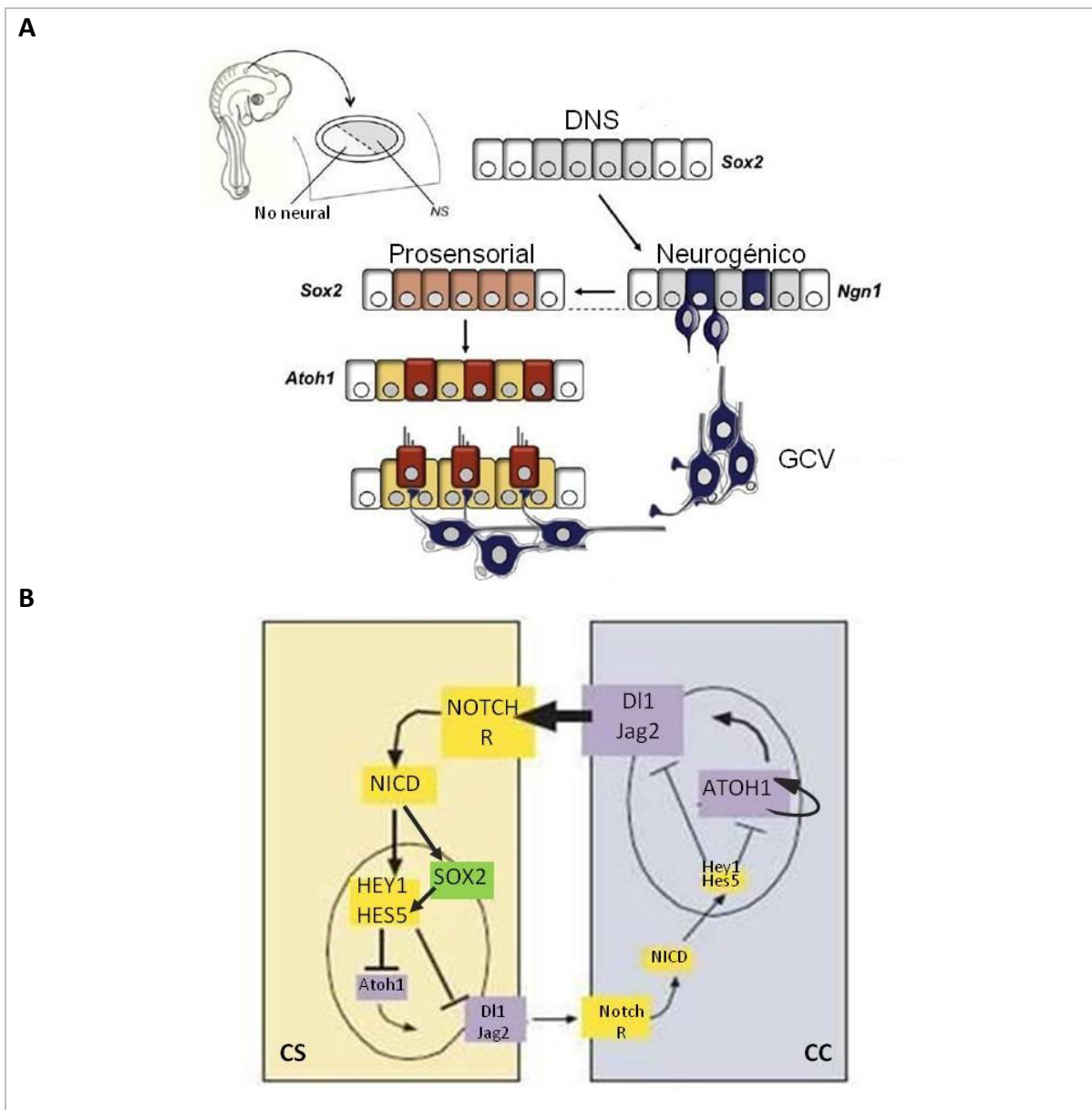
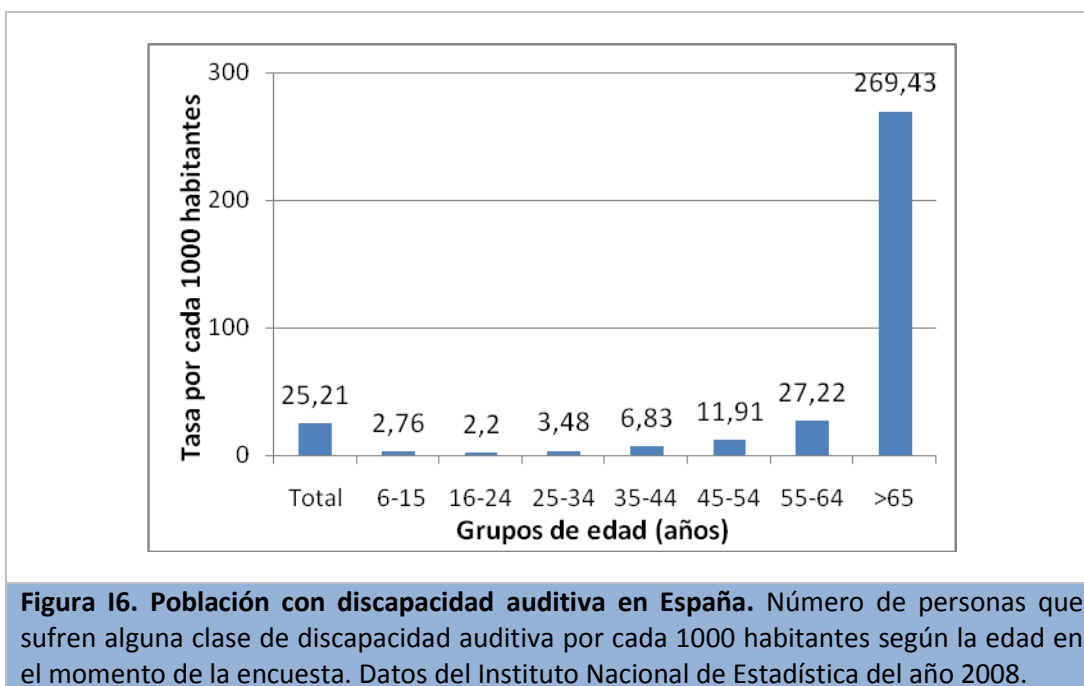


Figura 15. Diferenciación de los distintos tipos celulares a partir del epitelio sensorial auditivo. (A) Especificación celular durante el desarrollo del oído. Las CC (en rojo), las CS (en amarillo) y las neuronas sensoriales (en azul) derivan de un mismo dominio de la placoda ótica caracterizado por la expresión de Sox2 (DNS). Primero, el gen proneural Ngn1 comienza a expresarse en los neuroblastos, que delaminarán del epitelio ótico para formar las neuronas del ganglio cocleo-vestibular. Las células del DNS que permanecen en el epitelio mantienen la expresión de Sox2 y darán lugar a los órganos sensoriales. En estas zonas se expresa también Atoh1, que finalmente queda restringido a las CC. Imagen modificada de Neves y cols., 2013. **(B) Modelo de inhibición lateral para la diferenciación de las CC y CS en el epitelio sensorial.** La expresión de Atoh1 en la CC activa la expresión de Dll1 y Jag2, que se unen al receptor Notch en las células vecinas, y mantienen su propia transcripción por retroalimentación positiva. La activación de Notch en las CS lleva a la expresión de inhibidores de Atoh1 (Hey1 y Hes5), impidiendo que las células se diferencien a CC, y mantiene la expresión de Sox2, que a su vez también va a activar la expresión de los inhibidores de Atoh1. Figura modificada de Stone y Cotanche, 2007.

CC: células ciliadas; CS: células de soporte; Dll1: Delta1; DNS: dominio neurosensorial; GCV: ganglio cocleo-vestibular; Jag2: Jagged2; NICD: dominio intracelular de Notch; Ngn1: Neurogenina 1; Notch R: receptor Notch.

2. PÉRDIDA DE LA AUDICIÓN

En todo el mundo, se estima que unos 600 millones de personas (aproximadamente el 10% de la población) sufren algún tipo de discapacidad auditiva y un tercio de ellos de grado moderado a profundo. Por ello, la pérdida de audición es la discapacidad sensorial más común en los seres humanos, afectando a personas de todas las edades y niveles socioeconómicos. En España, según datos del Instituto Nacional de Estadística de 2008, un 2,5% de la población tiene alguna deficiencia auditiva, aumentando hasta el 26,9% en el caso de mayores de 65 años (Figura I6).



2.1 Tipos de discapacidad auditiva

Dependiendo de la zona del oído afectada, la sordera se puede clasificar en:

- Pérdida auditiva conductiva o de transmisión: causada por problemas en el oído externo o medio que dificultan la transmisión de las ondas sonoras. A menudo se soluciona con tratamiento médico o con el uso de ayudas auditivas, como audífonos.
- Pérdida auditiva neurosensorial o de percepción (SNHL): ocurre cuando el nervio auditivo o las CC del oído interno están dañados. Para la sordera neurosensorial no existe actualmente ningún tratamiento médico o quirúrgico realmente eficaz y los que se emplean están basados en dispositivos de amplificación del sonido (audífonos o prótesis auditivas) o en implantes cocleares (Figura I7), según el grado de pérdida de células sensoriales del oído interno. Las CC son el elemento más vulnerable de la cóclea y su pérdida es la causa más común de la SNHL. La ausencia de CC acaba

provocando la pérdida de neuronas sensoriales del ganglio espiral por falta de soporte trófico (Bodmer y cols., 2008).

2.2 Causas de la discapacidad auditiva neurosensorial

La SNHL no es una entidad única y puede deberse a múltiples factores (Zahnert, 2011).

- Factores genéticos. Se conocen muchos genes cuya mutación puede producir pérdida de audición, en algunos casos dentro de un síndrome más complejo, como el síndrome de Usher, pero que en otros casos sólo causan defectos en el oído (sordera no sindrómica). Se conocen más de 60 genes cuyas mutaciones pueden producir sordera no sindrómica por ejemplo el gen *GJB2* que codifica para una proteína de unión que permite el paso de iones K^+ , *OTOF*, que codifica para un sensor de Ca^{2+} que controla la exocitosis en las CC internas, o el gen de la Miosina7a, una proteína estructural presente en las CC. Otras mutaciones no provocan directamente sordera pero sí hacen al individuo más susceptible al daño por factores ambientales (Angeli y cols., 2012).
- Factores ambientales: exposición a sonidos elevados, infecciones bacterianas o víricas, traumatismos craneales o el uso de medicamentos con potencial ototóxico, como ciertos antibióticos, aminoglicósidos, antineoplásicos, antituberculosos, diuréticos, etc.
- La edad es otro factor en la aparición de la sordera y se denomina presbiacusia al trastorno de la capacidad auditiva neurosensorial asociado al envejecimiento. En general es mayor para los sonidos de tono alto, debido a que la degeneración de CC ocurre primero en la zona basal de la cóclea.

Otras causas de sordera incluyen las patologías específicas del oído como la otoesclerosis coclear, el schwannoma vestibular o la enfermedad de Menière.

2.3 Los implantes cocleares

Los implantes cocleares son el único tratamiento disponible en la actualidad frente a la sordera profunda provocada por la falta de CC funcionales del oído interno. Es un dispositivo electrónico capaz de transformar la vibración acústica que llega al oído en una señal eléctrica que estimula directamente las NSA, eludiendo la falta de CC. Los impulsos que envía el nervio auditivo llegan al cerebro a través de la vía auditiva normal, donde la información se analiza utilizando las mismas redes de neuronas que en el caso de la audición realizada por vía natural (Zeng y cols., 2008; Moore y Shannon, 2009) (Figura 17).

Más allá de los criterios para la implantación, el implante coclear tiene algunos límites en cuanto a la percepción de los sonidos por parte de los pacientes, que en ningún caso llega

a ser igual que en una persona sana, y se requiere un largo periodo de tiempo de rehabilitación y aprendizaje para llegar a integrar la información auditiva que se recibe. Por otro lado, aunque las neuronas del ganglio espiral pueden sobrevivir durante varios años tras la pérdida de la mayoría de las CC, existe una degeneración progresiva de las NSA (Shepherd y cols., 2004), que compromete la eficacia de los implantes cocleares.

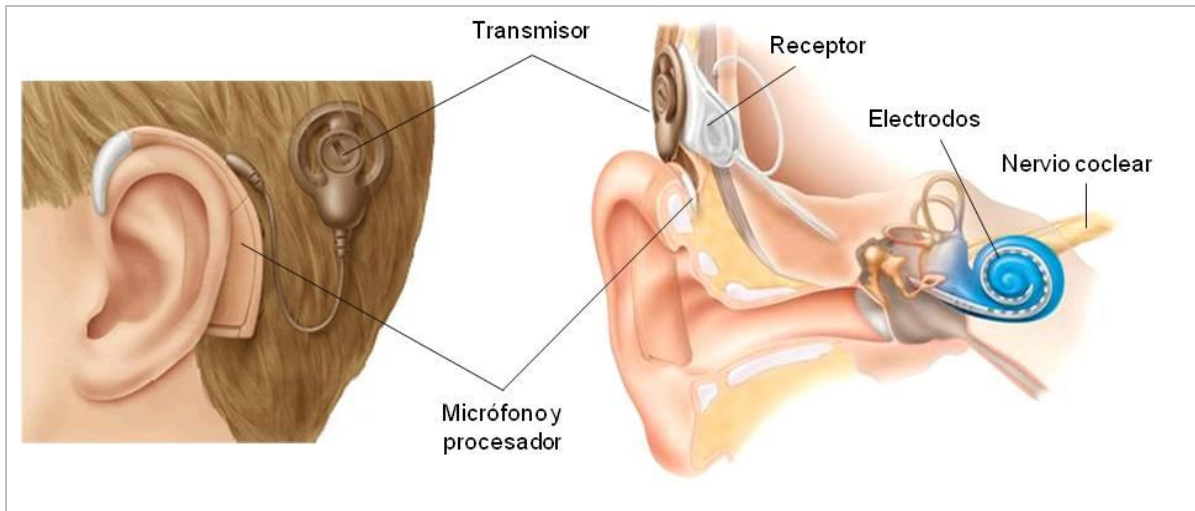


Figura 17. Estructura de un implante coclear. El **micrófono**, colocado en el pabellón auditivo, recoge los sonidos y un **procesador** los transforma en señales que envía a un **transmisor**. El **transmisor** envía las señales codificadas como ondas de radio a través de la piel al implante que está en el interior. Las señales son recogidas por un **receptor**, que decodifica la señal y genera un patrón de impulsos eléctricos que llega a los **electrodos** que se encuentran en el interior de la cóclea. Las neuronas reciben esos impulsos eléctricos y la información llega hasta el sistema nervioso central a través del **nervio coclear**. Modificado de <http://audifonos.org.es/implante-coclear>

3. LA INVESTIGACIÓN EN TERAPIAS PARA PREVENIR O CURAR LA SORDERA

Como se ha comentado anteriormente, en la actualidad los tratamientos para pacientes que sufren algún tipo de pérdida de audición se basan únicamente en ayudas auditivas para amplificar el sonido o en implantes cocleares. Al ser la degeneración de las CC y NSA en mamíferos irreversible, resulta de gran interés la investigación en terapias que promuevan la supervivencia de las células sanas y/o la regeneración de las células dañadas como posibles futuros tratamientos contra la SNHL.

Una posible estrategia para el reemplazamiento de las CC y NSA del oído sería generar nuevas células activando progenitores cocleares o diferenciando CS. En casos más severos de daño en el tejido, la terapia basada en la implantación de células exógenas podría ser una alternativa más interesante.

3.1 Protección de las células sanas mediante la administración de factores de supervivencia

El mantenimiento de una población funcional de NSA es necesario para el correcto funcionamiento de los implantes cocleares. El desarrollo y supervivencia de las NSA depende en gran parte de la presencia de factores neurotróficos y de la actividad neural, ambos relacionados con la actividad de las CC y CS. Aunque la pérdida de CC es irreversible una vez detectada, la degeneración de las NSA en el ser humano es un proceso lento (Nadol, 1990), de modo que existe una ventana terapéutica para frenar su pérdida. La administración de factores neurotróficos, estimulación eléctrica y antioxidantes son las aproximaciones más estudiadas para la protección y regeneración de las NSA en modelos animales (resumido en Tabla I1). En relación con las CC, algunos factores neurotróficos y los antioxidantes pueden tener un efecto preventivo que evite la degeneración de las CC si se administran antes de un daño, como puede ser el causado por medicamentos ototóxicos (Shoji y cols., 2000a y b; Hakuba y cols., 2003; Liu y cols., 2008). Además, una vez las CC han degenerado, ciertos factores tróficos pueden ayudar a evitar la degeneración de las NSA (Gillespie y Shepherd, 2005).

La administración de estos factores de supervivencia puede hacerse directamente mediante bombas osmóticas, vectores víricos que expresen las proteínas o a través de células exógenas que produzcan de modo natural o inducido los factores tróficos (Budenz y cols., 2012).

3.1.1 Factores neurotróficos

Los factores neurotróficos son proteínas producidas y secretadas por neuronas, células de la glía, células sensoriales y células musculares. Este grupo incluye proteínas como el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT3), neurotrofina 4, factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), FGF y factor neurotrófico ciliar (CNTF). Las funciones de los factores neurotróficos son muy variadas, incluyendo regulación de la proliferación, maduración y diferenciación celular, plasticidad neuronal, crecimiento axonal e incluso apoptosis. (Ramekers y cols., 2012).

Distintos factores neurotróficos y sus receptores han sido identificados en las NSA y CC. Por ejemplo, las NSA expresan los receptores TrkB, para BDNF, TrkC, para NT3, y el complejo receptor de GDNF en roedores neonatos y adultos (Pirvola y cols., 1992; Ylikoski y cols., 1993; Stöver y cols., 2000). A su vez, NT3 y BDNF se expresan fuertemente en el epitelio sensorial de la cóclea durante el desarrollo. NT3 también se expresa en las CS embrionarias y en CC internas adultas mientras que BDNF sólo se expresa en CC durante el periodo postnatal pero no en CS ni en CC adultas (Pirvola y cols., 1992; Ylikoski y cols., 1993). Las NSA expresan NT3 y BDNF tanto postnatalmente como en el adulto

(Schimmang y cols., 2003). GDNF actúa como un potente factor de supervivencia en el sistema nervioso central y periférico. No parece estar implicado en el desarrollo temprano del oído pero sí se expresa en las CC de la cóclea en el periodo neonatal y adulto (Stöver y cols., 2000).

Debido a su importancia en el desarrollo y función del oído interno, en estos años se ha estudiado con mucho interés el efecto de distintos factores neurotróficos (individualmente o combinaciones de varios factores) en la regeneración *in vitro* y en animales con sordera inducida por ruido o fármacos. Las NSA adultas aisladas y cultivadas *in vitro* viven durante más tiempo si se cultivan en presencia de FGF2 y GDNF. Este medio también promueve la regeneración de las neuritas y permite que se establezcan de nuevo sinapsis con otras neuronas y con CC en cultivo (Wei y cols., 2007). Además, se ha demostrado que con los factores adecuados (factor de crecimiento epidérmico (EGF) y FGF2) las NSA adultas pueden entrar de nuevo en ciclo celular y generar nuevas NSA *in vitro* (Rask-Andersen y cols., 2005; Wei y cols., 2007), sugiriendo la presencia de progenitores neurales (PN) quiescentes en el ganglio espiral de los mamíferos susceptibles de ser reactivados mediante factores neurotróficos. Varios estudios *in vivo* han observado que el tratamiento con GDNF y NT3 protege la función auditiva y disminuye la muerte de las CC después de un daño, siempre que éste no haya causado la destrucción total del órgano de Corti o que el tratamiento se inicie antes de que el daño se produzca (Shoji y cols., 2000a y b; Suzuki y cols., 2000; Hakuba y cols., 2003; Liu y cols., 2008).

Por otro lado, la expresión de los receptores de factores neurotróficos se mantiene en las NSA de animales que han quedado sordos (Gillespie y cols., 2004) y la administración de factores como el GDNF, BDNF, FGF, CNTF y NT3 (solos o en combinación) mejora la supervivencia de las NSA. En algunos casos, el efecto protector se mantiene incluso cuando ya ha pasado un tiempo tras la inducción del daño y la degeneración de las NSA ya ha comenzado (Yamagata y cols., 2004; Miller y cols., 2007). La administración intracoclear de GDNF o BDNF en animales previamente tratados con compuestos ototóxicos aumenta la supervivencia de las NSA y disminuye la pérdida de audición comparado con animales control (Gillespie y Shepherd, 2005; Fransson y cols., 2010; Sly y cols., 2012; Warnecke y cols., 2012). Un punto importante es si es suficiente el tratamiento durante un determinado periodo de tiempo o es necesaria una administración constante del factor neurotrófico para preservar los beneficios obtenidos. En este aspecto, mientras que los efectos del tratamiento con GDNF se mantienen durante al menos 4 semanas tras el cese de la administración del factor (Maruyama y cols., 2008; Fransson y cols., 2010), existe cierta controversia sobre si ocurre lo mismo con el BDNF (Gillespie y cols., 2003; Shepherd y cols., 2008; Agterberg y cols., 2009).

En cualquier caso, la administración no regulada de factores neurotróficos puede llevar a errores en la reinervación de las NSA ya que los factores neurotróficos no solo tienen un efecto sobre la supervivencia de las NSA sino que intervienen también en la orientación de los axones (Tessarollo y cols., 2004).

3.1.2 Antioxidantes

Otra aproximación terapéutica consiste en la aplicación de antioxidantes, ya que se ha observado que tras la exposición a un ruido intenso o a drogas ototóxicas, se produce un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, provocando un estrés oxidativo en las células del oído que puede producir necrosis o apoptosis (Poirrier y cols., 2010). El efecto protector de una dieta rica en antioxidantes fue demostrado en ratones por Le Prell y cols. (2011). La producción de radicales libres en el órgano de Corti puede tener lugar hasta varios días después del trauma, sugiriendo que los antioxidantes podrían ser de utilidad no sólo con efecto preventivo sino también después del daño. En experimentos llevados a cabo en ratas y cobayas se ha demostrado que el tratamiento con antioxidantes aplicado después del daño puede reducir la muerte de las CC y la pérdida de audición (Yamashita y cols., 2005; Maruyama y cols., 2007; Bas y cols., 2012; Ewert y cols., 2012), aunque la eficacia es menor que con la aplicación conjunta de neurotrofinas.

3.1.3 Estimulación eléctrica

La estimulación eléctrica puede tener efectos tróficos en numerosos tipos neuronales, incluyendo NSA (Miller, 2001). Su efecto puede ser debido a que produce un aumento del Ca^{2+} intracelular, activación de la producción de AMPc y activación de CREB (factores de transcripción que se activan como respuesta al AMPc), que aumentan la producción de neurotrofinas en las NSA y otras señales de supervivencia (Hansen y cols., 2001).

En experimentos realizados en cobayas con sordera inducida, la estimulación mediante un electrodo implantado en la cóclea consiguió aumentar la supervivencia de las NSA, pero fundamentalmente en la zona situada cerca del electrodo (Kanzaki y cols., 2002). En otros estudios, estos efectos no han sido confirmados (Agterberg y cols., 2010; Landry y cols., 2011). Por otra parte, la estimulación eléctrica sí ha tenido interesantes resultados cuando se ha estudiado su aplicación junto a factores neurotróficos, aumentando la supervivencia de las NSA (Miller y Altschuler, 2004; Shepherd y cols., 2005 y 2008). Este efecto se observa incluso cuando el tratamiento se empieza a aplicar semanas después del daño y ya hay una importante degeneración de las NSA (Yamagata y cols., 2004; Scheper y cols., 2009).

Tabla 11. Ejemplos de los efectos de la administración de factores neurotróficos, antioxidantes (AO) y estimulación eléctrica (EE) en modelos animales (roedores) de sordera inducida por factores ambientales.

TRATAMIENTO	APLICACIÓN	EFFECTOS	REFERENCIAS
GDNF	Antes del trauma	Protección de CC y NSA.	Shoji y cols., 2000a, Suzuki y cols., 2000; Hakuba y cols., 2003; Liu y cols., 2008
NT3	Antes del trauma	Protección de las CC externas.	Shoji y cols., 2000b
BDNF	Antes del trauma	No tiene efecto protector sobre las CC.	Shoji y cols., 2000b
GDNF	Después de la pérdida de CC	Reduce la muerte de las NSA. El efecto se mantiene al menos un mes tras el cese del tratamiento.	Maruyama y cols., 2008 Frasson y cols., 2010
BDNF ± CNTF, NT3, FGF	Después de la pérdida de CC	Reduce la muerte de las NSA. El efecto se mantiene al menos dos semanas tras el fin del tratamiento.	Yamagata y cols., 2004 Miller y cols., 2007; Agterberg y cols., 2009; Landry y cols., 2011; Sly y cols., 2012; Warnecke y cols., 2012
BDNF	Después de la pérdida de CC	El fin del tratamiento lleva de nuevo, con el tiempo, a la degeneración de las NSA.	Gillespie y cols., 2003
AO en la dieta	Antes del trauma	Protege las células de la estría vascular y del ligamento espiral.	Le Prell y cols., 2011
AO	Después del trauma	Reduce la muerte de CC y la pérdida de audición.	Yamashita y cols., 2005; Bas y cols., 2012; Ewert y cols., 2012
AO	Después de la pérdida de CC	Reduce la muerte de NSA.	Maruyama y cols., 2007
EE	Después del trauma	Sin efectos en la supervivencia de las NSA.	Agterberg y cols., 2010; Landry y cols., 2011
EE + GDNF EE + BDNF	Después de la pérdida de CC	Mantiene la población de las NSA de un modo más eficaz que cada tratamiento por separado, incluso cuando las NSA ya han empezado a degenerar.	Kanzaki y cols., 2002; Scheper y cols., 2009; Miller y Altschuler, 2004; Yamagata y cols., 2004; Shepherd y cols., 2008

3.2 Regeneración a partir de células endógenas

La introducción de células exógenas para la reparación del oído interno es un procedimiento complejo debido a la propia estructura y localización del oído y a la estricta organización de las CC. Por ello, la transdiferenciación de células endógenas del oído evitaría estos inconvenientes. El estudio de los mecanismos de reparación del oído interno en modelos animales puede ser de gran utilidad a la hora de encontrar un tratamiento para la SNHL en humanos a partir de la diferenciación de las propias células del oído (Ronagui y cols., 2012).

3.2.1 Capacidad de regeneración de CC en los distintos grupos de vertebrados. El ejemplo de las aves.

Los vertebrados presentan un sistema auditivo y vestibular homólogo y compuesto de los mismos tipos celulares: CC invadas por NSA y CS. Sin embargo, existe una gran diferencia en cuanto a la capacidad de regenerar las CC perdidas. Por ejemplo, en los órganos vestibulares de peces y anfibios hay un crecimiento permanente de los parches sensoriales durante toda la vida del individuo, además de una rápida regeneración tras la pérdida de CC por un daño externo (Warchol, 2011).

En las aves también hay un continuo recambio de las CC del sistema vestibular. En el órgano auditivo (denominado papila basilar en las aves), a pesar de que la actividad mitótica de las CC cesa antes del nacimiento, la exposición a un estímulo dañino como un ruido intenso o ciertos antibióticos reactiva la formación de nuevas células ciliadas (revisado en Ronaghi y cols., 2012). La regeneración inducida por un daño que tiene lugar en la papila basilar ocurre a partir de la diferenciación de CS de la zona dañada que son capaces de generar nuevas CC (Corwin y Cotanche, 1988).

La regeneración de las CC puede ocurrir mediante dos mecanismos (revisado en Stone y Cotanche, 2007). Algunas CS entran de nuevo en el ciclo celular, vuelven a expresar marcadores de células progenitoras y posteriormente se dividen asimétricamente en nuevas CS y CC. Otras CS son capaces de transdiferenciarse directamente a CC sin división celular. Los mecanismos implicados en estos procesos parecen ser los mismos que actúan durante el desarrollo embrionario: activadores e inhibidores del ciclo celular, vías de señalización como la de Notch o factores de transcripción como Atoh1 (Cotanche y Kaiser, 2010).

3.2.2 Inducción de la regeneración de CC en mamíferos

A diferencia de otros grupos de vertebrados, en los mamíferos la capacidad de regeneración del oído interno es muy limitada. En el órgano de Corti del ratón los progenitores tienen su división terminal en E14,5 y tras la pérdida de CC, las CS que quedan en el epitelio auditivo no pueden volver a dividirse ni diferenciarse. Estudios recientes han mostrado que, tras la pérdida de CC cocleares, ciertas poblaciones de CS son capaces de expresar marcadores de CC (Cox y cols., 2014; Bramhall y cols., 2014) aunque sólo en estadios postnatales tempranos (P0-P3). En el epitelio vestibular de roedores adultos sí se ha observado cierto grado de regeneración tras el daño (Rubel y cols., 1995; Kawamoto y cols., 2009) lo que no sucede en el epitelio auditivo adulto. Las CS del órgano de Corti están muy especializadas y probablemente a causa de esto han perdido la capacidad de división y transdiferenciación más allá del periodo postnatal. Una hipótesis es que esta incapacidad de proliferación se debe a la ausencia de ciertos receptores mitogénicos y rutas de señalización (White y cols., 2006; Warchol 2011).

Por tanto, los intentos de obtener nuevas CC a partir de CS en mamíferos se han enfocado en disminuir la expresión de inhibidores del ciclo celular, como $p27^{kip1}$ y Retinoblastoma (Rb), que mantienen el estado post-mitótico en el epitelio sensorial (Lee y cols., 2006; Sage y cols., 2006). Experimentos llevados a cabo en roedores han demostrado que la inactivación de estos inhibidores lleva a la entrada en el ciclo celular de algunos grupos de CS, y en varios casos esto ha significado la producción de un exceso de CS y CC. Sin embargo, la proliferación anormal de CC y CS lleva finalmente a la muerte de estas células, provocando una pérdida de la función auditiva (Sage y cols., 2006; Weber y cols., 2008; Ono y cols., 2009).

Estos resultados indican que otros factores son necesarios para regenerar CC a partir de CS. El candidato principal es *Atoh1* que, como se mencionó más arriba, es un factor de transcripción clave en la diferenciación de las CC durante el desarrollo embrionario (Birmingham y cols., 1999). La ausencia de este gen en el desarrollo del oído resulta en la pérdida de las CC y lleva a un desarrollo anormal de las CS en el epitelio sensorial (Birmingham y cols., 1999; Woods y cols., 2004). Por otro lado, la sobreexpresión de este gen en cócleas postnatales provoca la formación de CC supernumerarias, no solo a partir de las CS sino también de células no sensoriales de los surcos espirales externo e interno (Zheng y Gao, 2000; Kawamoto y cols., 2003; Gubbels y cols., 2008; Kelly y cols., 2012; Liu y cols., 2012; Liu y cols., 2014). La sobreexpresión de *Atoh1* en oídos con CC dañadas o ausentes puede reducir el nivel de sordera de los animales y regenerar algunas de las CC perdidas o dañadas (Izumikawa y cols., 2005; Yang y cols., 2012). Sin embargo, un daño excesivo en el epitelio puede hacer que las CS también desaparezcan en cuyo caso se pierde la respuesta a la sobreexpresión de *Atoh1*. Es decir, para la regeneración de las CC es necesaria la presencia de CS sanas en el epitelio auditivo (Izumikawa y cols., 2008).

La vía de señalización de Notch juega también un papel muy importante en la regulación del número de CC que hay en el órgano de Corti. La inhibición de esta vía en el oído lleva a la formación de CC supernumerarias por la transdiferenciación de CS o por la diferenciación de progenitores que se encuentran en la cóclea postnatal (Zine y cols., 2000; Kiernan y cols., 2005a; Yamamoto y cols., 2006). Este mecanismo es dependiente de Atoh1 (Jeon y cols., 2011) y su efecto disminuye con la edad, probablemente debido a que la expresión de Notch1 y Jagged1 en la cóclea adulta es muy baja (Hori y cols., 2007). Varios trabajos han observado que estos genes son reactivados si hay un daño en la cóclea (Hori y cols., 2007; Batts y cols., 2009). Más aún, la inhibición de Notch en cócleas adultas previamente dañadas es capaz de inducir o aumentar la producción de CC a partir de CS (Mizutari y cols., 2013; Bramhall y cols., 2014).

3.3 Implante de células exógenas. Terapia celular en el oído interno

La terapia celular es una estrategia basada en el empleo de células vivas con el objetivo de reparar un tejido o recuperar funciones perdidas. En terapia celular se pueden emplear células somáticas o diferenciadas y células madre o indiferenciadas (resumido en tabla I2).

El término “célula madre” se aplica a un amplio grupo de células que, independientemente de su origen, se caracterizan por tener una prolongada capacidad de división y diferenciación a distintos tipos celulares especializados. Estas células presentan una división asimétrica: por un lado se genera una célula igual a la anterior (célula madre) y por otro una célula comprometida hacia un linaje determinado. Según su capacidad de diferenciación se puede hablar de células madre totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes (Tarnowski y Sieron, 2006).

- Totipotentes: son capaces de producir cualquier tejido embrionario y extraembrionario. Un ejemplo de este tipo de células sería el cigoto y las células de la mórula.
- Pluripotentes: se pueden diferenciar a células derivadas de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo).
- Multipotentes: son aquellas que pueden dar lugar a un número limitado de tipos celulares, por ejemplo a células de la misma capa embrionaria de la que proceden.
- Unipotentes: tienen capacidad para diferenciarse en un único tipo celular. Se encuentran en los distintos tejidos del organismo y juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis, así como reemplazando las células envejecidas o dañadas.

Con respecto a la terapia celular para tratar la pérdida de audición, las células madre han demostrado tener cierto potencial para diferenciarse hacia CC, CS o NSA (Okano y Kelley, 2012). Además, en los últimos años ha habido un gran avance en métodos de reprogramación de células adultas hacia estados menos diferenciados pudiendo a partir de ahí obtener diferentes tipos celulares o directamente reprogramarlos hacia el tipo celular buscado (Chambers y Studer, 2011); esto podría hacer posible el uso de células somáticas diferenciadas, como por ejemplo los fibroblastos, para la obtención de células auditivas. Por otro lado, la introducción de las células exógenas puede tener como objetivo no el reemplazamiento de las células perdidas, sino la liberación de factores que promuevan la recuperación del tejido dañado (Prockop, 2007).

Sin embargo, el uso de células exógenas en el reemplazamiento de las CC del oído interno conlleva una serie de dificultades inevitables: el complicado acceso al epitelio auditivo humano, la exposición de las células implantadas a la endolinfa (con altas concentraciones de K^+) y sobre todo el reto de no alterar la estructura altamente organizada del órgano de Corti, imprescindible para el mantenimiento de la función auditiva. Por el contrario, reemplazar las NSA no requiere una cirugía tan invasiva ni una integración de las células exógenas tan precisa (Jongkamonwiwat y cols., 2010).

Tabla 12. Ventajas e inconvenientes de las distintas aproximaciones de la terapia regenerativa según el tipo celular utilizado

TIPO CELULAR	ORIGEN	VENTAJAS	INCONVENIENTES
CME	Células pluripotentes derivadas de la masa interna del blastocito	<ul style="list-style-type: none"> ○ Proliferación ilimitada ○ Se diferencian fácilmente a la mayoría de tipos celulares 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Formación de teratomas ○ Rechazo inmunológico ○ Problemas éticos/legales
Células iPS	Células diferenciadas de tejidos adultos	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sin problemas éticos/legales ○ Fuente de células accesible ○ Posibilidad de terapia autóloga 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Variabilidad entre clones en cuanto a la capacidad de diferenciación y formación de teratomas
Células adultas transdiferenciadas	Células diferenciadas de tejidos adultos	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sin problemas éticos/legales ○ Fuente de células accesible ○ Posibilidad de terapia autóloga y evitar rechazo inmunológico 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Limitada capacidad de diferenciación. ○ Aún hay pocos estudios
CM adultas	Tejidos del organismo postnatal: sistema nervioso, médula ósea, etc.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sin problemas éticos/legales ○ Posibilidad de terapia autóloga y evitar rechazo inmunológico ○ Algunas terapias ya disponibles en clínica 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Limitada capacidad de expansión y diferenciación

3.3.1 Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (CME) son células derivadas de la masa celular interna de los blastocistos cuando están formados por tan sólo 100-200 células (día 4-5 de gestación en humanos o día 4 en ratones). Son células pluripotentes y por tanto una herramienta muy interesante en terapia celular, ya que en teoría las CME pueden expandirse y diferenciarse a cualquier tipo celular. Además, cuando se trasplantan en un organismo, son capaces de diferenciarse *in vivo* respondiendo a señales de desarrollo o a factores inducidos por un daño en tejidos adultos. Los inconvenientes en el uso de CME incluyen la posibilidad de diferenciación a tipos celulares inapropiados, formación de teratomas y el riesgo de rechazo inmunológico (Fairchild y cols., 2007), así como aspectos éticos y legales aún en discusión.

En los experimentos de trasplante de CME en el oído interno *in vivo* se ha observado que la migración y supervivencia de las células exógenas es mayor cuando se implantan en cócleas previamente dañadas, probablemente debido al aumento de expresión de factores tróficos con respecto a los tejidos sanos (Ulfendal y cols., 2007; Zhao y cols., 2013). Además, la supervivencia también es mayor cuanto más reciente es el daño coclear (Lang y cols., 2008).

La implantación de las CME directamente sin diferenciar en la cóclea conlleva una muy baja supervivencia de las células en el tejido, aunque se ha observado que tienden a migrar hacia zonas dañadas o cercanas al ganglio espiral (Coleman y cols., 2006; Ulfendal y cols., 2007; Ahn y cols., 2008). La aplicación simultánea de factores neurotróficos mejora notablemente la supervivencia aunque la diferenciación de las CME implantadas sigue siendo baja (Altschuler y cols., 2008). Además, el cotrasplante junto a tejido nervioso embrionario, aumenta la tasa de diferenciación neuronal (Ulfendal y cols., 2007). Reyes y cols., (2008) han demostrado además que la expresión transitoria de *ngn1* en cme inyectadas en la cóclea de un modelo animal, junto con un tratamiento basado en la administración de BDNF y NT3, induce la diferenciación de estas células hacia neuronas con un fenotipo glutamatérgico. Sin embargo, ninguno de los estudios mencionados arriba ha conseguido una diferenciación hacia células similares a CC.

Alternativamente, las CME pueden prediferenciarse *in vitro* antes de la implantación. Una opción frecuente es la de diferenciar las células hacia un progenitor neuroectodermal, lo que facilitaría la integración en el tejido del oído y su posible diferenciación tanto a CC como a NSA en respuesta a los estímulos presentes en la cóclea. En cuanto a la diferenciación de estos progenitores, Corrales y cols. (2006) muestran que PN derivados de CME de ratón inyectados en gerbos tratados con ouabaina (fármaco que provoca la degeneración de las NSA), se diferencian y forman abundantes procesos neuronales en dirección a las CC del órgano de Corti. Estas neuritas parecen seguir las vías por las que

discurrían las NSA degeneradas. Por otro lado, en el trabajo de Matsumoto y cols. (2008) la “neuralización” de las CME se realiza mediante el cocultivo con células estromales y mostrando la capacidad de las neuronas derivadas de CME para formar contactos sinápticos con las CC. Okano y cols. (2005), añadiendo AR al cocultivo con las células estromales, muestran una cierta recuperación en la audición de los animales inyectados con las células derivadas de CME, además de la diferenciación neuronal y las proyecciones hacia el tronco del encéfalo.

El cocultivo de PN derivados de CME con explantes de epitelio sensorial del oído (Coleman y cols., 2007; Shi y cols., 2007) parece ser suficiente para que estos progenitores se diferencien *in vitro* en neuronas y emitan neuritas hacia el órgano de Corti. Sólo en el trabajo de Shi y cols. (2007) se sugiere la formación de sinapsis entre las neuronas y las CC del explante, aunque este resultado no pudiera corroborarse en los experimentos de implantación *in vivo*. En el mismo trabajo se demuestra que, en ausencia del explante coclear, la adición de BMP4 a los progenitores es necesaria para conseguir la diferenciación *in vitro* hacia NSA que expresen Periferina, GATA3, Ngn1, Brn3a, TrkB y TrkC. Más recientemente, CME humanas cultivadas con una combinación de FGFs han generado progenitores óticos, caracterizados por la expresión de los marcadores Nestina, Sox2, Pax2, Pax8 y Gata3. Estos progenitores, inyectados en un modelo animal de degeneración de NSA, son capaces de integrarse en el tejido, formar un ganglio espiral ectópico y, lo más importante, consiguen mejorar significativamente la audición de los animales (Chen y cols., 2012).

En cuanto a la diferenciación *in vitro* de las CME a CC, destacan en la literatura los protocolos de diferenciación “paso a paso”. A partir de agregados de CME de ratón o humanas generados en presencia de IGF y EGF se obtienen progenitores óticos que posteriormente se diferencian *in vitro* en presencia de factores como IGF, EGF y bFGF, a células que expresan marcadores típicos de CC (Atoh1, Miosina7a, Brn3c) (Li y cols., 2003b; Rivolta y cols., 2006). Estos progenitores óticos se integran bien en el epitelio ótico embrionario de pollo *in vivo*, diferenciándose a CC y detectándose marcadores típicos de los cilios (Li y cols., 2003b).

En Oshima y cols., (2010), la formación de cuerpos embrionarios se realiza en presencia de Dkk1 y SIS3, que inhiben la diferenciación a mesodermo y endodermo, y también de IGF1, que induce la respuesta a un tratamiento posterior con bFGF, lo cual resulta en un aumento en la expresión de Pax2. La retirada de bFGF de los cultivos establecidos con dichos cuerpos embrionarios promueve la expresión de Atoh1 y Miosina7a en un pequeño porcentaje de células. El cocultivo con células estromales embrionarias de utrículo de pollo hace que estas células además formen sus cilios característicos y sean capaces de responder a estímulos mecánicos de un modo similar a CC inmaduras. Con una aproximación similar, en el trabajo de Koehler y cols. (2013) se induce la expresión de

marcadores de regiones preplacodiales en agregados de CME a través de BMP4 e inhibidores de la formación de mesodermo y endodermo. La posterior inhibición del BMP4 y la adición de FGFs evitan la diferenciación epidérmica y lleva a la formación de epitelios engrosados que expresan marcadores óticos. Finalmente en estas zonas se forman pequeñas vesículas donde se diferencian células con características de CC vestibulares inmaduras, CS y neuronas.

En resumen, las CME pueden diferenciarse en los distintos tipos celulares sensoriales del oído interno como CC o NSA. Además, son capaces de integrarse en el epitelio sensorial y el ganglio coclear. Las neuronas generadas a partir de CME pueden restaurar en parte la función perdida por la degeneración neuronal en modelos animales.

3.3.2 Células madre pluripotentes inducidas

Las células madre pluripotentes inducidas (iPS, del inglés *induced pluripotent stem*) son células pluripotentes derivadas de células ya diferenciadas (adultas o embrionarias) mediante la expresión artificial de un conjunto de genes exógenos, en general Oct4, Sox2, cMyc y Klf4 (abreviado como OSMK). Las células así obtenidas presentan características similares a las CME (Takahashi y Yamanaka, 2006) por lo que en principio tendrían las mismas aplicaciones en terapia regenerativa pero sin los problemas éticos que conlleva el uso de las CME. Sin embargo, las células iPS derivadas de tejidos adultos presentan una considerable variabilidad entre clones en cuanto a la capacidad de diferenciación y de formación de tumores, siendo este un asunto crítico para su aplicación clínica (Miura y cols., 2009, Nishimura y cols., 2012). Además, aunque en un principio se pensaba que también evitarían el rechazo inmunológico al poderse producir a partir de células del propio paciente, estudios recientes indican que las modificaciones genéticas sufridas por las células podrían activar la respuesta inmune del receptor (Zhao y cols., 2011; Pearl y cols., 2012).

Se han utilizado muchos tipos celulares diferentes para la reprogramación (fibroblastos embrionarios y adultos, queratinocitos, células epiteliales del estómago, células del epitelio intestinal...). Esto significa, por ejemplo, que a partir de una pequeña biopsia de piel se puede obtener una gran cantidad de fibroblastos que, una vez reprogramados y amplificados, supondrían una fuente de células para un autotransplante, así como un modelo *in vitro* para el estudio de distintas enfermedades y fármacos. Existen distintas técnicas para llevar a cabo la reprogramación con OSMK: integración de retrovirus y lentivirus en el genoma del hospedador, proteínas recombinantes, ARNm o moléculas que alteran la maquinaria celular (Cox y Rizzino, 2010).

Inyectados en la cóclea de ratones, diferentes PN derivados de distintos clones de células iPS tienen una tasa de supervivencia, diferenciación y proliferación similar (Nishimura y

cols., 2009; Nishimura y cols., 2012). Se han observado proyecciones de las neuritas de las nuevas neuronas generadas a partir de células iPS hacia las CC y la expresión de marcadores como β III-tubulina y de transportadores de glutamato, indicando que las células iPS pueden utilizarse como fuente de trasplantes para la regeneración de NSA (Nishimura y cols., 2009). En cuanto a la diferenciación hacia CC *in vitro*, las células iPS también se comportan de manera similar a las CME de modo que la formación de cuerpos embrionarios y su posterior tratamiento con factores de crecimiento induce *in vitro* la expresión de Atoh1 y Miosina7a, y su cocultivo con células estromales completa la diferenciación hacia un estado de CC inmadura (Oshima y cols., 2010).

Muy recientemente se ha publicado un nuevo tipo de reprogramación celular denominado STAP (*Stimulus-triggered Acquisition Pluripotency*), que consiste en aplicar un estímulo subletal transitorio, como una bajada de pH, a células somáticas diferenciadas (Obokata y cols., 2014). Mediante esta metodología, que actualmente ha suscitado una gran controversia, las células STAP expresan marcadores de pluripotencia y son capaces de diferenciarse a células de las distintas capas germinativas, además de formar teratomas cuando son inyectadas en ratones inmunodeprimidos. Aunque en principio son células poco proliferativas, modificando el medio de cultivo se han obtenido líneas estables de células STAP (Obokata y cols., 2014). Se van a necesitar muchos más estudios antes de considerar la posible aplicación de esta técnica para la regeneración de tejidos.

3.3.3 Transdiferenciación directa de los fibroblastos

Los fibroblastos son células de origen mesodérmico que forman parte del tejido conectivo o estroma de los diferentes órganos y tejidos de los animales. Su principal función es el mantenimiento de la estructura y homeostasis del tejido mediante la síntesis de los componentes de la matriz extracelular. Como se ha mencionado anteriormente, en 2006 Takahashi y Yamanaka demostraron que cuatro factores de transcripción (Oct4, Klf4, Sox2 y cMyc) son suficientes para reprogramar fibroblastos adultos a un estado similar a CME (células iPS), potencialmente capaces de diferenciarse después a una gran variedad de tipos celulares. Sin embargo, si el objetivo final es la reparación o sustitución de tejidos concretos, resulta también interesante el concepto de “reprogramación directa”; es decir, obtener una célula madura especializada a partir de un fibroblasto sin necesidad de pasar por un estado de célula iPS (Chambers y Studer, 2011; Kelaini y cols., 2014).

Ya en 1989 se publicó un estudio que identificaba un único factor de transcripción, MyoD, como un factor necesario y suficiente para obtener células de musculo esquelético a partir de fibroblastos (Weintraub y cols., 1989). Más recientemente, distintas combinaciones de factores de transcripción se han utilizado para reprogramar fibroblastos humanos y murinos hacia distintos linajes, por ejemplo células madre

neurales (Han y cols., 2012; Zhou y Tripathi, 2012; Ruggieri y cols., 2014), neuronas diferenciadas (Vierbuchen y cols., 2010; Sendtner 2011; Kim y cols., 2014), hepatocitos (Huang y cols., 2011; Yu y cols., 2013) o cardiomiocitos (Ieda y cols., 2010; Wada y cols., 2013), entre otros. La exposición a condiciones de cultivo favorables (presencia de factores de crecimiento, citoquinas o metabolitos) es necesaria para la reprogramación e incluso en ocasiones suficiente para llevarla a cabo, evitando el uso de transgenes (Page y cols., 2009; Wang y cols., 2011). Una estructura tridimensional de los cultivos también puede influir en la capacidad de diferenciación de células maduras como los fibroblastos (Han y cols., 2013).

Por otro lado, al menos ciertas poblaciones de fibroblastos de tejidos adultos tienen características similares a las células madre mesenquimales (CMM) (ver apartado 3.4.3.3), tanto en la expresión de antígenos de superficie (positivos para CD90, CD105, CD166 y CD 44 entre otros, y negativos para marcadores de líneas hematopoyéticas) como en su potencial de diferenciación hacia condrocitos, adipocitos y osteocitos (Lorenz y cols., 2008; Brohem y cols., 2013).

Como resumen, podemos afirmar que los fibroblastos, ya sean adultos o embrionarios, son células “flexibles” en cuanto a su capacidad de diferenciación hacia otros tipos celulares. La reprogramación directa puede suponer un método óptimo para la obtención de células susceptibles de ser utilizadas en modelos de enfermedades genéticas, pruebas de selección de fármacos, estudios de toxicidad y finalmente para trasplantes en terapias regenerativas o de sustitución de tejidos. En este último caso, frente a las CME y las células iPS, los fibroblastos tienen limitaciones en cuanto a la capacidad de expansión y diferenciación: al ser células primarias es necesario transdiferenciar las células cada vez que se necesiten y los protocolos de diferenciación no están aún bien establecidos. Sin embargo, presentan algunas ventajas al no presentar impedimentos éticos y no generar tumores (Miura y cols., 2009; Ring y cols., 2012).

3.3.4 Células madre adultas

Las CM adultas residen en los distintos tejidos de un organismo postnatal. Normalmente son consideradas como multipotentes ya que pueden dar lugar a todos los tipos celulares presentes en el propio tejido al que pertenecen (Tarnowski y Sieron, 2006). Se cree que estas células generan los llamados precursores o progenitores, que pueden expandirse fácilmente *in vivo* aunque su potencial se limita a unos pocos tipos de células maduras y especializadas. En relación a su uso terapéutico las células madre adultas presentan algunas ventajas frente a las embrionarias: a pesar de tener una capacidad de auto-renovación y diferenciación más limitada que las CME, lo que dificulta la obtención de una gran cantidad de células, las células madre adultas se aíslan fácilmente de distintos tejidos, su uso no presenta problemas éticos, no generan tumores y poseen baja

inmunoreactividad (Korbling y cols., 2003). El hecho de que se empleen en clínica en la actualidad es un ejemplo de su seguridad para la medicina regenerativa.

Dentro de las CM adultas, las CMM han sido ampliamente estudiadas y empleadas en muy diversos experimentos *in vivo* e *in vitro*, como se detalla en el apartado 3.3.4.3. En los últimos años se han estudiado otras numerosas fuentes de CM adultas susceptibles de ser utilizadas en la regeneración del oído interno.

3.3.4.1 Células madre del oído interno

Como se ha comentado en el apartado 3.2.2, algunas poblaciones de CS pueden actuar como progenitores de CC *in vivo*. En el oído interno postnatal de mamíferos se han aislado éstas y otras células que retienen cierto potencial proliferativo a partir de ensayos de formación de esferas, típicamente utilizado para CM neurales, tanto en la zona vestibular (Li y cols., 2003a), como en el epitelio coclear (Malgrange y cols., 2002; Zhai y cols., 2005; Savary y cols., 2007; Oiticica y cols., 2010; Shi y cols., 2012) y el ganglio espiral (Rask-Andersen y cols., 2005; Oshima y cols., 2007).

Li y cols., (2003a) mostraron que esferas derivadas del utrículo de ratón adulto pueden diferenciarse a células de las tres capas germinativas, considerándose células pluripotentes, además de formar NSA y células con características similares a CC inmaduras. Por otro lado, Oshima y cols., (2007) han señalado las posibles diferencias que existen entre las CM aisladas de los distintos tejidos del oído. Así, las células derivadas del ganglio espiral se diferenciarían más fácilmente en NSA, mientras que las del órgano de Corti y vestíbulo darían lugar más frecuentemente a CC. Algunos de los progenitores derivados del epitelio coclear podrían ser células del surco espiral externo, que en cocultivo con mesénquima utricular pueden diferenciarse hacia CC y CS (Zhai y cols., 2005). Otras poblaciones de CS, identificadas por la expresión del marcador de célula madre adulta *Lgr5* (Shi y cols., 2012) se diferencian a CC *in vitro* en presencia de factores de crecimiento. Recientemente (Taniguchi y cols., 2012; Jan y cols., 2013) han identificado una población de células progenitoras bajo la membrana basilar del órgano de Corti de ratones neonatos. Estas células retienen una gran capacidad proliferativa y son capaces de diferenciarse a CC y CS *in vivo* e *in vitro*. Tanto en estas células como en las CS positivas para *Lgr5*, la activación de la vía de Wnt es imprescindible para el proceso de proliferación y diferenciación (Shi y cols., 2012 y 2013; Jan y cols., 2013).

Aunque no propiamente adultas, se ha identificado también una interesante población de progenitores auditivos en cócleas fetales humanas (Chen y cols., 2007; Chen y cols., 2009) que, a diferencia de otro tipo de progenitores auditivos, son capaces de expandirse en cultivo durante un largo periodo de tiempo. En experimentos de diferenciación *in vitro* pueden generar células que además de expresar genes típicos de CC y NSA, presentan

propiedades funcionales y electrofisiológicas similares a las de estas células durante el desarrollo *in vivo*.

La presencia de células madre en la cóclea postnatal parece contradictoria con la falta de capacidad regenerativa del epitelio sensorial maduro tras de la pérdida de CC o NSA. Sin embargo, debe tenerse presente que la capacidad proliferativa *in vivo* de estos progenitores desaparece en las primeras semanas de vida, con lo que la capacidad regenerativa desaparece también a las pocas semanas del nacimiento (White y cols., 2006; Oshima y cols. 2007; Taniguchi y cols., 2012; Bramhall y cols., 2014; Cox y cols., 2014).

3.3.4.2 Células madre neurales

En los tejidos nerviosos adultos también es posible encontrar células madre neurales. El aislamiento y caracterización de CM multipotentes en el cerebro adulto muestra la habilidad del sistema nervioso para responder ante un daño. Las CM neurales adultas tienen la capacidad de autorrenovarse, migrar ante una lesión hacia la zona afectada y diferenciarse hacia la mayoría de tipos de células nerviosas (De Filippis y Binda, 2012). Se encuentran en zonas como el hipocampo, la pared lateral del ventrículo lateral, el bulbo olfativo o el cuerpo caloso. Estas células se han estudiado en profundidad en animales para el tratamiento de diversos desórdenes del sistema nervioso central (enfermedad de Alzheimer, Parkinson, lesiones medulares) y también hay numerosos estudios en relación a su uso en la regeneración de CC y NSA en modelos animales.

Como ejemplo de la multipotencialidad de las CM neurales adultas en el oído, Ito y cols. (2001) han demostrado que esferas derivadas de células del hipocampo son capaces de, además de diferenciarse a astrocitos y oligodendrocitos, sobrevivir varias semanas en el oído. También pueden integrarse en el órgano de Corti y adoptar una morfología similar a la de las CC (Ito y cols., 2001). Las células madre neurales de la pared lateral del ventrículo lateral son capaces de proliferar y sobrevivir durante más tiempo que las CME y migrar hacia el órgano de Corti cuando son implantadas en el oído de roedores (Regala y cols., 2005). El cultivo previo con factores de crecimiento y transducción con Neurogenina2 ayuda a promover la diferenciación a neuronas maduras (Hu y cols., 2005). Wei y cols. (2008) han aislado de la capa de células endimarias de la pared lateral del ventrículo lateral, células con capacidad proliferativa que muestran características similares a las CC del oído interno: cilios de parecida estructura y composición que los de las CC, y expresión de las proteínas Miosina6 y Miosina7a. Estas células son sensibles a estímulos mecánicos y tienen capacidad para establecer sinapsis *in vitro* con NSA. Además, se integran correctamente en el epitelio sensorial de explantes de cóclea a los que previamente se les ha eliminado las CC, por lo que podrían ser una fuente interesante de células para reemplazar CC dañadas.

Por otro lado, en el epitelio neurosensorial olfatorio existen células madre que regeneran periódicamente los receptores del epitelio. La principal ventaja de las células madre del epitelio olfatorio es que se extraen y aíslan fácilmente de pacientes y pueden diferenciarse *in vitro* a distintos tipos celulares (Doyle y cols., 2007; Pandit y cols., 2011). Cuando son cocultivadas con epitelios cocleares expresan proteínas características de CC (Doyle y cols., 2007). Sin embargo, en estudios *in vivo*, estas células no son capaces de integrarse en el tejido coclear (Pandit y cols., 2011), aunque su presencia resulta beneficiosa para la recuperación de la audición de los animales tratados. Un análisis exhaustivo muestra que las células madre del epitelio olfativo comparten muchas características con las CMM (Delorme y cols., 2010). Esta observación explicaría la mejora en la audición por la presencia de algún tipo de señalización paracrina, efecto también observado tras el trasplante de células madre hematopoyéticas en cócleas dañadas (Yoshida y cols., 2007).

3.4.3.3 Células madre mesenquimales

Las CMM derivan de tejido conjuntivo o mesoderma embrionario y pueden aislarse de numerosos tejidos del organismo adulto (Phinney y Prockop, 2007): la médula ósea (donde también se encuentran las células madre hematopoyéticas), el tejido adiposo, la membrana sinovial, el cordón umbilical, el músculo esquelético y la membrana amniótica, entre otros.

Se define como CMM a la célula que cumple los siguientes criterios: a) capacidad de adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar; b) expresión de antígenos de superficie específicos; y c) capacidad de diferenciación celular multipotente. En cuanto a la expresión de antígenos de superficie, se ha visto que, independientemente de su origen, las CMM expresan unas moléculas de superficie y carecen de otras: el 95% de la población de CMM debe expresar al menos CD105, CD73 y CD90, así como carecer de la expresión de los antígenos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 y HLA de clase II (Dominici y cols., 2006). Por último, las CMM tienen una gran capacidad de expansión *ex vivo*, conservando los marcadores de superficie, y se pueden diferenciar a condrocitos, adipocitos y osteoblastos en función de las condiciones de cultivo. Además, recientemente se ha demostrado que, estimuladas adecuadamente, pueden mostrar pluripotencialidad al diferenciarse a células de las tres capas embrionarias (Hwang y cols., 2009; Kuroda y cols., 2010). Sin embargo, estudios clonales han mostrado que las células adherentes de la médula ósea son un grupo heterogéneo de células progenitoras con diferentes capacidades de diferenciación (Muraglia y cols., 2000) por lo que solo un pequeño porcentaje de las células serían consideradas “pluripotentes” (Kuroda y cols., 2010).

En los últimos años y debido a su capacidad de diferenciación y auto-renovación, las CMM se están utilizando no solo en ensayos *in vivo* e *in vitro* sino también en clínica como estrategia terapéutica frente a enfermedades musculoesqueléticas, cardíacas, del sistema nervioso o tumorales, entre otras (Steinert y cols., 2012; Nery y cols., 2013; <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=MSC>).

Es importante resaltar que las CMM no solo se diferencian en células de distintos tejidos, sino que son capaces de promover la reparación tisular mediante la secreción de factores que potencian la regeneración de las células dañadas, estimulan la proliferación y diferenciación de células progenitoras endógenas y disminuyen la respuesta inflamatoria (Haniffa y cols., 2007; Prockop 2007). De forma abreviada se podría decir que la capacidad de estas células de alterar el entorno contribuye más a la reparación de daños tisulares que su capacidad de diferenciación (Prockop, 2007). Estas células representan, por tanto, una herramienta de gran utilidad para la medicina regenerativa.

Además de diferenciarse a células del linaje mesenquimal se ha estudiado mucho la capacidad de diferenciación de las CMM hacia neuronas, debido al enorme potencial que podrían tener estas células en la terapia de enfermedades del sistema nervioso. En relación a la diferenciación neuronal de las CMM existe cierta controversia ya que en muchos protocolos lo que parece ser un proceso de diferenciación no es más que el resultado del efecto tóxico del tratamiento (Krabbe y cols., 2005). Por otro lado, las CMM también han demostrado tener un efecto neuroprotector cuando se transplantan en animales con daños en el sistema nervioso (Edalatmanesh y cols. 2011; Yang y cols., 2011a; Díaz y cols., 2012).

En relación al uso de las CMM en la regeneración del oído interno, hay varios estudios que demostraron la capacidad de supervivencia y migración de las CMM cuando son inyectadas en cócleas sanas o tratadas con ouabaína (Naito y cols., 2004; Matsuoka y cols., 2007). Al igual que se observó con las CME, se observó una mayor supervivencia de las células implantadas en los oídos dañados frente a los sanos. Además, no se observó ninguna señal que indicase reacción inmunológica. Por otro lado, las CMM no son capaces de transdiferenciarse en ningún tipo celular sensorial (CC o NSA) sin ningún tratamiento adicional (Lang y cols., 2006; Tan y cols., 2008). Sin embargo, el trasplante de CMM sí ayuda a la recuperación de la función auditiva cuando se tratan animales afectados por sordera causada por un daño en los fibrocitos que forman el ligamento espiral. Este tipo de sordera puede aparecer de un modo agudo, producida por fármacos ototóxicos y ruido, o alguna anomalía genética (Minowa y cols., 1999). Aunque el daño agudo es reparable por sí solo, el trasplante con CMM acelera el proceso de recuperación (Kamiya y cols., 2007) debido a que, por un lado, las CMM se transdiferencian en fibrocitos y, por otro, las CMM estimulan la proliferación y regeneración de los fibrocitos afectados (Sun y cols., 2012).

En la literatura científica se pueden encontrar diferentes métodos de cultivo celular y combinaciones de factores de crecimiento que han sido utilizados para tratar las CMM bien antes de implantarlas en modelos animales con sordera inducida o bien para diferenciarlas *in vitro* a células similares a CC y NSA (Kondo y cols., 2005; Jeon y cols., 2007; Boddy y cols., 2012, entre otros). Sin embargo, en la actualidad no hay descrito ningún protocolo que consiga que CMM humanas adopten un fenotipo ótico *in vitro* siguiendo un tratamiento con una combinación definida de factores de crecimiento.



OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido la evaluación de CMMh y de varios tipos de fibroblastos como posibles fuentes de células exógenas para la terapia celular en SNHL, buscando establecer protocolos de diferenciación que puedan apoyar tal aplicación. Los objetivos específicos se desglosan a continuación:

- Estudio del efecto de sobreexpresar Atoh1, un factor clave en la formación de las CC del oído interno, sobre la diferenciación de las células bajo estudio. En el caso de fibroblastos murinos, también se ha analizado el resultado de sobreexpresar este gen junto con otros factores transcripcionales implicados en la formación de CC.
- Establecimiento de protocolos que permitan obtener PN a partir de cultivos de CMMh y de fibroblastos, como paso intermedio hacia la obtención de células similares a las células sensoriales óticas.
- Establecimiento de las condiciones de cultivo necesarias para dirigir los PN obtenidos de CMMh hacia células similares a CC.
- Establecimiento de las condiciones de cultivo necesarias para dirigir los PN obtenidos de CMMh hacia células similares a NSA.
- Dado que no se obtuvieron PN a partir de cultivos de fibroblastos, se definió otro objetivo específico para estas células: estudiar el efecto de la desmetilación del ADN sobre la expresión de genes de pluripotencia y del desarrollo del oído, como una posible herramienta de reprogramación de fibroblastos.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVO CELULAR

1.1 Células empleadas

En este trabajo se han utilizado distintos tipos celulares:

- **Células madre mesenquimales humanas (CMMh)** de médula ósea (Lonza, lotes 7F3675, 7F3914, 6F4085 y 1F3422). Estas células están ya caracterizadas por citometría de flujo, siendo positivas para los marcadores CD105, CD166, CD29 y CD44, y negativas para CD14, CD34 y CD45. Además, son capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos cuando son cultivadas en las condiciones adecuadas. De este modo, cumplen con los criterios de caracterización de las CMM, definidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici y col., 2006).

Las CMM fueron cultivadas en medio *DMEM* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) de baja glucosa (Sigma-Aldrich), 20% suero fetal bovino (SBF; Lonza), 1% piruvato de sodio (Sigma-Aldrich), 2mM L-glutamina (Invitrogen), 1% penicilina-estreptomicina (PS; Invitrogen) y 1% aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich). Cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 90-95% se realizó un subcultivo o pase a razón de 6000 células/cm². Las células se expandieron hasta los pases (p) 5-9 antes de comenzar los experimentos de diferenciación.

- **Células madre embrionarias (CME) de ratón.** Se utilizó la línea E14.2. Para la expansión de las CME de ratón y evitar su diferenciación se cultivaron sobre una monocapa de fibroblastos embrionarios de ratón, en medio *DMEM* de alta glucosa (Invitrogen) con 15% de SBF, 100mM de aminoácidos no esenciales, 0,055 mM β -mercaptoetanol (β ME; Sigma-Aldrich), 2mM L-glutamina y 1% PS suplementado con 20ng/ml de Factor Inhibidor de Leucemia (LIF, ImmunoTools).
- **Células estromales del utrículo de embrión de pollo.** Se obtuvieron a partir de embriones de pollo a día 10 de desarrollo. Para ello, huevos fecundados de pollo (Granja Santa Isabel, Córdoba) se incubaron durante 10 días en un incubador a 40°C, con ventilación y atmósfera húmeda. Posteriormente, los huevos se abrieron y se extrajo el oído a los embriones de pollo, separando el utrículo con ayuda de unas pinzas de disección. El epitelio sensorial se eliminó utilizando una aguja hipodérmica de calibre 30G (Microlance™ 3, Becton-Dickinson) mientras que el tejido estromal se pasó a medio *DMEM* frío, se lavó con tampón HBSS (Invitrogen) durante 2 min y se incubó con 0.5 mg/ml de Termolisina (Sigma-Aldrich) durante 25 min a 37°C. Tras la disociación, el tejido fue centrifugado 2 min a 800 r.p.m., resuspendido en *DMEM*/F12 (Invitrogen) suplementado con 5% SBF, disociado ligeramente con una pipeta y sembrado en placas de cultivo pretratadas con poli-D-lisina (100 μ g/ml; Sigma-

Aldrich). Una vez adheridas a la placa, las células se cultivaron en *DMEM* de alta glucosa (Invitrogen), 10% SBF y 1% PS. Al alcanzar la confluencia, las células se pasaron a 7000 células/cm².

Las células de cultivos en p4-p6 fueron inactivadas para ser utilizadas como soporte en cocultivos. Para esto, las células estromales se trataron en la placa de cultivo con 10 µg/ml mitomicina C (Sigma-Aldrich) durante 3 h a 37°C. Después, las células se lavaron varias veces con PBS, se tripsinizaron y sembraron a razón de 40000 células/cm² en placas de cultivo pretratadas con gelatina 0,1% (Sigma-Aldrich). Al día siguiente estaban listas para establecer los cocultivos con CMM previamente diferenciadas.

- **Fibroblastos dérmicos humanos adultos:** cedidos por el Dr. Miguel Ángel de la Fuente García (Unidad de Genética Molecular de la Enfermedad, Instituto de Biología y Genética Molecular, Valladolid, España). Los fibroblastos humanos se cultivaron en medio *DMEM* de alta glucosa, 10% SBF, 1% piruvato de sodio, 2mM glutamina, 1% PS y 0,055 mM βME. Al llegar al 90% de confluencia, las células se diluyeron 1:5 (superficie inicial: superficie final) para su expansión. Para los experimentos de diferenciación se utilizaron células de los pases 6-15.
- **Fibroblastos embrionarios de ratón:** Se utilizaron 2 líneas celulares, NIH/3T3 (número ATCC: CRL-1658), cedida por Andrés Alonso García (Unidad de Inmunidad innata e inflamación, Instituto de Biología y Genética Molecular, Valladolid, España) y 3T3 Swiss albino (número ATCC: CCL-92), cedida por M^a Teresa Alonso Alonso (Unidad de Fisiología celular y molecular, Instituto de Biología y Genética Molecular, Valladolid, España). Los fibroblastos de ratón se cultivaron en medio *DMEM* de alta glucosa, 10% SBF, 1% piruvato de sodio, 2mM glutamina, y 1% PS. Cada 2-3 días las células se pasaron 1:3 o 1:5.

1.2 Mantenimiento de los cultivos celulares

Todos los tipos celulares se cultivaron en frascos y placas de cultivo (Nunc, Thermo Scientific) y se mantuvieron en una estufa de cultivo a 37°C, 5% de CO₂ y con una atmósfera húmeda. El medio de los cultivos se cambió cada 2-3 días y una vez confluentes, se realizaron los subcultivos siguiendo esta metodología:

- Retirar el medio de cultivo.
- Lavar con tampón fosfato salino 1x (PBS; Invitrogen) para eliminar por completo el SBF y así evitar la inactivación de la tripsina.
- Añadir tripsina-EDTA 0,05% (Invitrogen) cubriendo por completo la superficie del frasco de cultivo y dejar en la estufa a 37°C 2-3 min.

- Comprobar en un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100) que las células se encuentran en suspensión, inactivar la enzima con medio 10% SBF.
- Recoger la suspensión celular en un tubo y centrifugar a 1000 r.p.m durante 5 min. Eliminar el sobrenadante.
- Resembrar las células en la superficie adecuada.

Para conservar las células durante largo tiempo, algunos pases se congelaron. Para la congelación, las células se tripsinizaron, centrifugaron y resuspendieron en un medio de criopreservación: 45% DMEM, 45% SBF y 10% de agente crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma). La suspensión se distribuyó en viales especiales para criopreservación. Estos viales se congelaron en un tanque con isopropanol (Mr. Frosty, Fisher Scientific) que permite la disminución progresiva de la temperatura, y se mantuvieron en un congelador de -80°C durante una noche. Finalmente se almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido.

La descongelación de las células se realizó de forma rápida en un baño a 37°C. Una vez descongelado el contenido del vial, la suspensión celular se pasó a un tubo con medio fresco y se centrifugó durante 5 minutos a 1000 r.p.m. El sobrenadante se desechó y el *pellet* de células se resuspendió y se sembraron en el medio correspondiente para cada tipo celular. Al día siguiente se cambió el medio para eliminar células muertas y restos de DMSO que pudieran quedar.

1.3 Medios de cultivo empleados para la diferenciación de las CMMh

1.3.1 Inducción de la expresión de marcadores neurales

Para determinar la capacidad de las CMMh para inducir la expresión de genes neurales, previamente a la inducción de genes específicos del oído interno, se probaron varias condiciones experimentales. En algunos casos, se partió de cultivos en monocapa mientras que en otros se basó en la formación de esferas no adherentes. Los cultivos obtenidos tras estos tratamientos se denominaron “progenitores neurales” (PN). (Figura MM1).

1.3.1.1 Tratamientos en cultivos en monocapa

Las CMMh se cultivaron en medio de crecimiento hasta la preconfluencia (70-80% de superficie cubierta por células) y posteriormente se siguieron 2 tratamientos diferentes:

- “Monocapa SBF”: DMEM de alta glucosa, 10% SBF, 1% PS, 2mM L-glutamina y 1μM βME durante 24 horas. Después, las células se cultivaron durante 72h en el mismo

medio pero sustituyendo el β ME por 35ng/ml de AR (Sigma-Aldrich) (Caddick y cols., 2006).

- “Monocapa MSS”: Otro método consistió en cultivar las células en medio sin SBF (medio sin suero, MSS): DMEM/F12 (Invitrogen), 1% PS y 1% N2 (Invitrogen). Durante 5 días el medio fue suplementado con 2% B27 (Invitrogen), 30ng/ml de NT3 (R&D systems) y 10ng/ml de bFGF (R&D systems). Durante los siguientes 7-10 días, el bFGF se sustituyó por 10ng/ml de BDNF (R&D systems) (Jeon y cols. 2007).

1.3.1.2 Tratamientos en cultivos no adherentes

Las células se sembraron en placas de cultivo de 100mm de diámetro con una capa de agarosa al 1%, de modo que las células no se pudieron adherir a la superficie y crecieron como agregados flotantes en forma de esferas. Se utilizaron dos protocolos basados en la formación de esferas:

- “Esferas MSS”: Un primer tipo de esferas se obtuvo cultivando 650000 células/placa de 100mm en MSS con 2% B27, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (R&D systems) y 20 ng/ml de bFGF. Se dejó durante 3 días para que se formaran las esferas.
- “Esferas SBF”: Otro tipo de esferas se obtuvo sembrando 500000 células/placa en medio *DMEM* de alta glucosa, 10% SBF, 1% PS, 2mM L-glutamina y 1 μ M AR. El cultivo se mantuvo durante 5 días antes de recoger las esferas, cambiando una vez el medio.

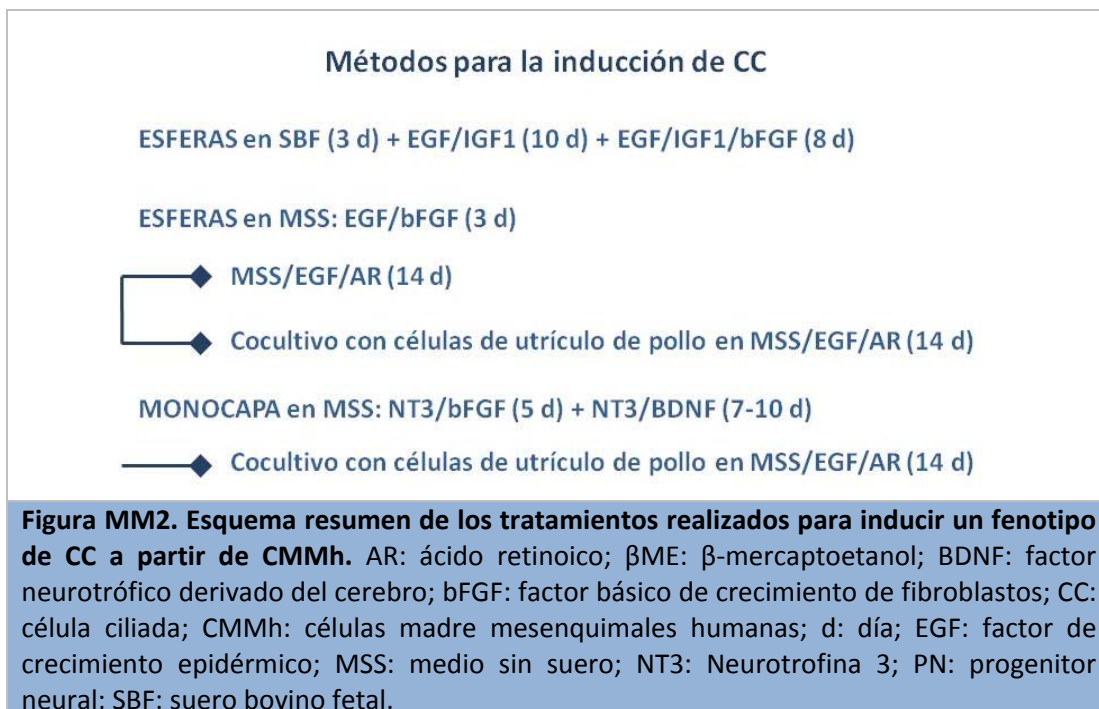


Figura MM1. Esquema resumen de los tratamientos realizados para inducir la formación de PN a partir de CMMh. Para inducir la expresión de genes proneurales, las CMMh se cultivaron como cultivos adherentes en monocapa o no adherentes (esferas) en presencia o ausencia de SFB y de factores de crecimiento y otras moléculas de señalización. AR: ácido retinoico; β ME: β -mercaptoetanol; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; CMMh: células madre mesenquimales humanas; d: día; EGF: factor de crecimiento epidérmico; MSS: medio sin suero; NT3: Neurotrofina 3; PN: progenitor neural; SBF: suero bovino fetal.

1.3.2 Inducción de la expresión de marcadores de CC

Para inducir la expresión de marcadores típicos de CC se llevaron a cabo distintos protocolos de diferenciación, partiendo de CMMh (Figura MM2) o de CME de ratón como control positivo del método.

- CME de ratón (Li y cols., 2003b): Se formaron cuerpos embrionarios a partir de “*hanging drops*” de 500 células/30 μ l en tapas de placas de petri durante 3 días en el medio de cultivo habitual sin LIF. Una vez formados, los cuerpos embrionarios se recogieron y se cultivaron durante 24h en una placa de petri cubierta con agarosa al 1% para que siguieran flotando, en el mismo medio. Al día siguiente se sembraron, también en medio completo sin LIF, en placas de cultivo de 6cm de diámetro tratadas con fibronectina (10 μ g/ml; Sigma-Aldrich) hasta su adhesión (toda la noche). Posteriormente se trataron durante 10 días en MSS con 20 ng/ml de EGF y 50 ng/ml de IGF1 (R&D systems) y después se añadió al medio 20 ng/ml de bFGF durante 8 días. Finalmente se dejó el cultivo 10-14 días en MSS sin añadir ningún factor de crecimiento para completar la diferenciación. Las CMMh se trataron del mismo modo para comprobar la eficacia del método.
- CMMh: Las esferas obtenidas en MSS con B27, EGF y bFGF (“esferas MSS”) fueron recogidas tras una breve centrifugación y sembradas en placas de cultivo de 60mm tratados con fibronectina (10 μ g/ml) para promover la adherencia de las esferas. Las esferas se cultivaron durante 2 semanas más en MSS suplementado con 2% B27, 20 ng/ml EGF y 1 μ M AR, siguiendo el método descrito en Chen y cols., 2009.
- Cocultivos: PN obtenidos a partir de CMMh tratadas con NT3, bFGF y BDNF (método “monocapa en MSS”) o esferas formadas en MSS se cultivaron sobre una monocapa de células estromales de pollo inactivadas el día anterior (Oshima y cols., 2010). Estos co-cultivos se mantuvieron durante 1-2 semanas en MSS suplementado (o no) con 20ng/ml EGF y 1 μ M AR.



1.3.3 Inducción de la expresión de marcadores de NSA

Para inducir la expresión de marcadores típicos de NSA se llevaron a cabo distintos protocolos de diferenciación, directamente a partir de las CMMh o de CMMh previamente diferenciadas hacia PN (Figura MM3). Para distinguirlos, se denominaron “tratamientos NSA” y se numeraron del 1 al 5 (NSA1-NSA5).

- NSA1: Según lo publicado por Kondo y cols., 2005:
 - DMEM, 20% SBF, 2% B27, 50 μ M forskolina (Fsk, Sigma-Aldrich), 250 μ M isobutilmetilxantina (IBMX, Sigma-Aldrich), 10 ng/ml bFGF; 1 día.
 - MSS, 2% B27, 5 μ M Fsk, 125 μ M IBMX, 400 ng/ml Shh (PeproTech Inc.), 0,5 μ M AR, 10 ng/ml bFGF y 50 ng/ml BDNF; 7 días.
- NSA2: CMM tratadas con β ME y AR (“monocapa en SBF”) se cultivaron seguidamente en MSS suplementado con una combinación de factores de crecimiento basados en el método de Kondo y cols. (2005)
 - 2% B27, 5 μ M Fsk, 125 μ M IBMX, 400 ng/ml SHH, 0,5 μ M AR, 10 ng/ml bFGF y 50 ng/ml BDNF; 3 días.
 - 2% B27, 20 ng/ml bFGF, 10ng/ml NT3 y 10ng/ml BDNF durante 7-10 días más.
- NSA3: Un método similar al anterior consistió en los mismos PN (“monocapa en SBF”) durante 3 semanas en MSS suplementado con factores:

- 400 ng/ml de Shh (PeproTech Inc.), 0.5 μ M AR, 10ng/ml NT3 y 10ng/ml BDNF la primera semana.
 - 2% B27 y 25 ng/ml bFGF la segunda semana.
 - 2% B27, 20 ng/ml bFGF, 10ng/ml NT3 y 10ng/ml BDNF la tercera semana.
- NSA4: Esferas generadas en medio con SBF y AR (“esferas en SBF”) se dejaron adherir a placas con fibronectina (10 μ g/ml) y se cultivaron en MSS + 2% B27 en presencia de factores de crecimiento siguiendo un protocolo similar a Chen y cols, 2009:
 - 25 ng/ml bFGF; 3 días.
 - 20 ng/ml bFGF y 500 ng/ml Shh; 3 días.
 - 20 ng/ml bFGF, 500 ng/ml Shh, 10 ng/ml NT3 y 10 ng/ml BDNF; 2 días
 - Finalmente, 20 ng/ml bFGF, 10 ng/ml NT3 y 10 ng/ml BDNF durante 10-14 días más.
 - NSA5: Siguiendo un método similar a Coleman y cols., 2007 y Martínez-Monedero y cols. (2008), se realizaron co-cultivos de PN (“esferas en MSS”) con explantes de epitelio coclear de ratones neonatos (día 1 a 10 después del nacimiento) sembrados previamente sobre cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina (20 μ g/ml) y fibronectina (10 μ g/ml). Los cultivos estuvieron durante una semana en MSS suplementado con 2% B27, 1 μ M AR, 10 ng/ml NT3 y 10 ng/ml BDNF.

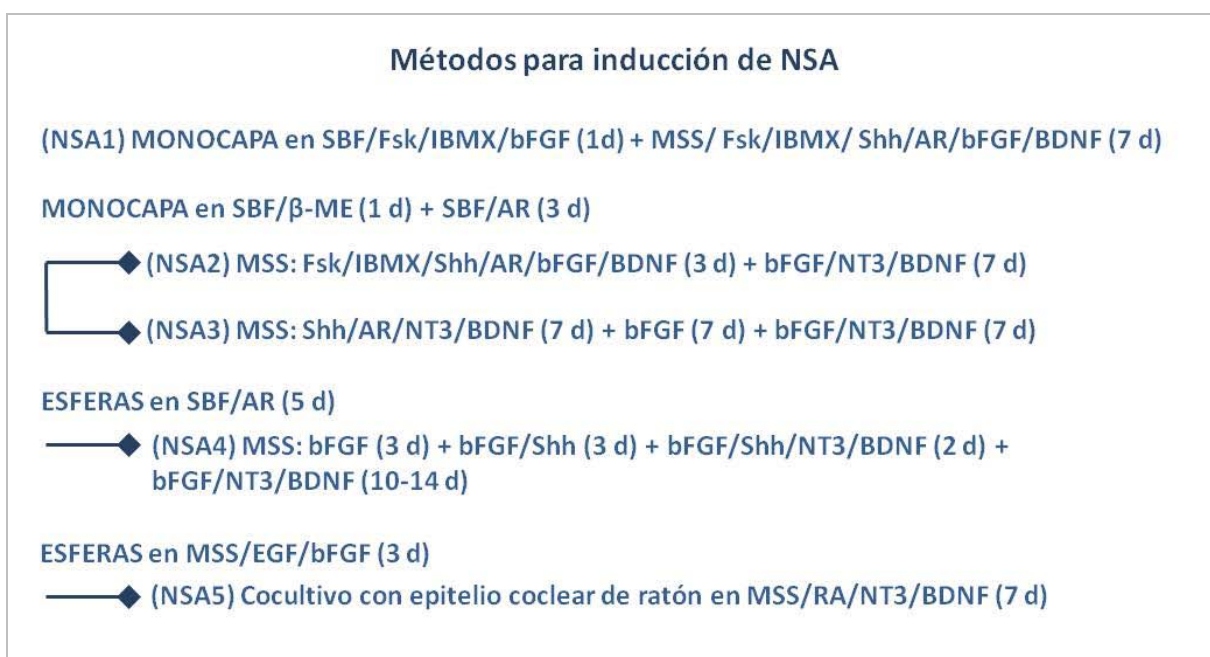


Figura MM3. Esquema resumen de los tratamientos empleados para la diferenciación de las CMMh a células similares a NSA. Para denominar de un modo abreviado los tratamientos, se numeraron del 1 al 5, anteponiendo las siglas NSA.

AR: ácido retinoico; β ME: β -mercaptoetanol; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; CMMh: células madre mesenquimales humanas; d: día; EGF: factor de crecimiento epidérmico; Fsk: forskolina; IBMX: isobutilmetilxantina; MSS: medio sin suero; NT3: Neurotrofina 3; NSA: neuronas sensoriales auditivas; PN: progenitor neural; SBF: suero bovino fetal; Shh: Sonic Hedgehog.

1.4 Medios de cultivo empleados para la diferenciación de los fibroblastos

1.4.1 Inducción de genes proneurales a partir de cultivos no adherentes

Al igual que con las CMMh, los tres tipos de fibroblastos se trataron según dos protocolos basados en la formación de esferas para la inducción de genes proneurales:

- 500000 células/placa de 100mm en MSS con 2% B27, 20 ng/ml de EGF y 20 ng/ml de FGF, durante 5-6 días.
- 500000 células/placa en medio DMEM de alta glucosa, 10% SBF, 1% PS, 2mM L-glutamina y 1μM de AR durante 5 días.

1.4.2 Tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina

Los fibroblastos murinos de la línea NIH/3T3 fueron tratados con el agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina (5azadC) para inducir la expresión de genes de pluripotencia.

Las células se sembraron en placas de cultivo de 35mm o 60mm de diámetro a una densidad baja (3500-4000 células por cm²). A las 24 horas, se cambió el medio normal de crecimiento por un medio compuesto por DMEM, 15% SBF, 1% PS, 1% piruvato de sodio, 2mM glutamina, 1% aminoácidos no esenciales y 20ng/ml LIF. Este medio fue suplementado con 5-aza-dC a distintas concentraciones entre 0-10 μM. El medio fue cambiado diariamente durante 4 días.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CMMh

2.1 Citometría de flujo

Para caracterizar las CMMh por citometría de flujo, las células se tripsinizaron y resuspendieron en PBS. Luego se transfirieron a tubos de citometría en un número de 150000 células en 100μl por tubo y se añadieron los diferentes anticuerpos conjugados con ficoeritrina (*phycoerythrin*, PE), isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*, FITC) o ficocianato (*phycoyanate*, PCy5) específicos para marcadores humanos asociados con linajes hematopoyéticos y mesenquimales a las concentraciones adecuadas (Tabla MM1). Tras incubar 30 minutos a 4°C en oscuridad, se realizaron 2 lavados con PBS y se resuspendieron las células ya marcadas en 400 μl de PBS. Como control se usaron isotipos IgG inespecíficos de ratón marcados con los fluorocromos apropiados.

Un mínimo de 30000 eventos por ensayo fueron adquiridos en un citómetro de flujo *Gallios* (Beckman Coulter). Los datos se analizaron utilizando el programa informático Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter).

Tabla MM1. Anticuerpos utilizados en la caracterización fenotípica de las CMMh mediante citometría de flujo			
ANTICUERPO	CLON	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
FITC-CD45	2D1	1:10	BD Pharmigen
FITC-CD105	2H6F11	1:10	Immunostep
R-PE-CD73	AD2	1:10	BD Pharmigen
R-PE-CD166	3A6	1:10	BD Pharmigen
PCy5-CD34	QEnd10	1:10	Beckman Coulter
PCy5-CD90	5E10	1:50	BD Pharmigen
ISOTIPO FITC	MOPC-21	1:50	BD Pharmigen
ISOTIPO PE	MOPC-21	1:50	BD Pharmigen
ISOTIPO PCy5	MOPC-21	1:50	BD Pharmigen

2.2 Estudios de diferenciación celular

Se realizaron estudios de diferenciación celular para comprobar la capacidad de diferenciación de las CMMh en células de origen mesodérmico (Pittenger y cols., 1999), como son los adipocitos y osteocitos.

- **Adipogénesis:** las CMMh se cultivaron durante 3 semanas en DMEM, 1%PS, 1% ácido acético (Sigma-Aldrich), 10% SBF, 0,5 mM IBMX, 1 μ M dexametasona (Sigma-Aldrich), 10 μ M insulina (Sigma-Aldrich) y 100 μ M indometacina.

La detección de vacuolas lipídicas se hizo mediante la tinción Oil red-O:

- Fijar las células con paraformaldehído (PFA, Merck) frío al 4% en PBS durante 10 min.
 - Lavar suavemente con isopropanol (Panreac Química S.A.) al 60%.
 - Añadir la solución Oil Red O (Sigma-Aldrich) y dejar durante 20 min a TA.
 - Lavar suavemente con isopropanol.
 - Lavar con agua destilada.
 - Contrateñir con hematoxilina modificada según Mayer (Merck) durante 5 min a TA.
 - Lavar con agua destilada durante 10 minutos.
 - Dejar secar y montar con Entellán (Merck).
- **Osteogénesis:** las CMMh se cultivaron durante 3 semanas en DMEM, 1%PS, 1% ácido acético, 10% SBF, 0,1 μ M dexametasona, 50 μ M ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) y 10mM β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich).

La presencia de depósitos cálcicos se valoró mediante la tinción de Von Kossa:

- Fijar las células con paraformaldehído (PFA, Merck) frío al 4% en PBS durante 10 min.
- Lavar con PBS.
- Incubar con nitrato de plata (Fisher Chemical) al 3 % durante 5 min.
- Lavar varias veces con agua destilada.
- Incubar con tiosulfato sódico (Fisher Chemical) al 5% durante 5 min.
- Lavar con agua destilada.
- Dejar secar y montar con Entellán.

3. INMUNOCITOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA

El análisis inmunocitoquímico de los cultivos en monocapa se realizó en células cultivadas sobre cubreobjetos de cristal tratados con poli-L-lisina (20 µg/ml; Sigma Aldrich) y fibronectina (10 µg/ml) o placas de cultivo de 35mm de diámetro tratados con fibronectina. En el caso de las esferas, una vez formadas se recogieron con una micropipeta y se dejaron adherir (unas 12-24 horas) en un cubreobjetos de cristal tratado con SBF, en el mismo medio de cultivo. Para la inmunocitoquímica de todos los anticuerpos, excepto para Sox2 de cabra, se siguió el método descrito en Rivolta y cols, 2006. Todos los pasos fueron realizados a temperatura ambiente (TA). Los anticuerpos primarios y secundarios empleados se han detallado en las tablas MM2 y MM3.

- Fijar las células con paraformaldehído (PFA, Merck) frío al 4% en PBS durante 10 min.
- Lavar varias veces con 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) en PBS (PBT).
- Permeabilizar y bloquear las uniones no específicas utilizando una solución de 1% seroalbúmina bovina (BSA; Sigma-Aldrich) y 5% SBF en PBT durante 15 min.
- Incubar con el anticuerpo primario diluido en la misma solución durante 1 h.
- Lavar varias veces con PBS.
- Incubar con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en 0.1% BSA en PBT durante 45 min.
- Lavar varias veces con PBT.
- Incubar con 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI; Sigma-Aldrich) 0,02 µg/ml en PBT durante 10 min.
- Lavar varias veces con PBS y finalmente con agua destilada.
- Montar con *Vectashield* (Vector Laboratories) y sellar.

Para el anticuerpo anti-Sox2 de cabra, la incubación con el anticuerpo primario y el secundario se realizó sin bloquear previamente y diluyendo los anticuerpos en PBT.

Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon eclipse 90i y fueron fotografiadas con una cámara acoplada Nikon DS-Ri1 y soporte informático Nis elements BR de Nikon. Para algunas imágenes se empleó el Microscopio confocal Leica TCS SP5.

Tabla MM2. Anticuerpos primarios empleados en inmunocitoquímica		
ANTICUERPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Nestina (monoclonal de ratón)	1:250	R&D Systems
Miosina 7a (policlonal de conejo)	1:500	Proteus
Atoh1 (policlonal de conejo)	1:1000	Affinity Bioreagents
Calretinina (policlonal de conejo)	1:2000	Swant
Neurofilamento200 (policlonal de conejo)	1:2000	Sigma-Aldrich
Sox2 (policlonal de conejo)	1:100	Millipore
Sox2 (policlonal de cabra)	1:50	Santa Cruz Biotechnology
HuNu (monoclonal de ratón)	1:1000	Chemicon
β -III-Tubulina	1:1000	Chemicon

Tabla MM3. Anticuerpos secundarios empleados en inmunocitoquímica		
ESPECIFICIDAD	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Alexa Fluor 488 anti-ratón	1:400	Molecular Probes
Alexa Fluor 568 anti-conejo	1:1000	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 anti-cabra	1:400	Molecular Probes

4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

4.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Para realizar el análisis de la expresión génica de las muestras mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), primero se llevó a cabo el aislamiento de ARN total con TRIzol® (Invitrogen).

Se añadió 1 ml de TRIzol® directamente en cada placa de cultivo de 60mm de diámetro para romper las células y extraer así el ARN total. En el caso de las esferas, éstas se recogieron en un tubo de 15 ml, se centrifugó y se eliminó el medio de cultivo dejando el *pellet* de esferas. Entonces se añadió 1ml de TRIzol® y se transfirió la solución a un tubo de 1'5 ml.

El protocolo utilizado es el recomendado por el fabricante con algunas modificaciones:

- Homogeneizar bien la solución de TRIzol® y células mediante Vortex. Dejar reposar 5 minutos a TA.
- Añadir 200 μ l de cloroformo (Panreac Química S.A.) por tubo y agitar la solución. Dejar reposar 3 min a TA.
- Centrifugar a 13000 r.p.m. durante 20 min y a 4°C.
- Recuperar la fase acuosa (superior) e introducir en un tubo de 1,5 ml. Añadir 500 μ l de isopropanol (Panreac Química S.A.) y 1 μ l de glucógeno a 20 μ g/ μ l

(Invitrogen) para favorecer la precipitación del ARN. Mezclar bien con la pipeta y dejar toda la noche a -20°C.

- Centrifugar a 13000 r.p.m. durante 20 min y a 4°C.
- Decantar el tubo y lavar el precipitado con 1ml de etanol al 70%.
- Centrifugar a 13000 x g durante 20 min y a 4°C.
- Decantar y dejar secar el precipitado. Resuspender el *pellet* obtenido en 20 µl de agua destilada libre de ARNasas.

El ARN se valoró cuantificándolo a 260 nm utilizando el *Spectrophotometer ND-1000* (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). Para comprobar la calidad y pureza del mismo se calculó el cociente de las absorbancias a las longitudes de onda (λ) 260 y 280 (A260/A280).

Tras la extracción del ARN se realizó la transcripción reversa (RT-PCR) para la síntesis de ADNc o se almacenó a -80°C hasta su uso. La RT-PCR se hizo a partir de 2 µg de ARN total utilizando el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Las muestras de ADNc se almacenaron a -20°C hasta que el ADNc fue amplificado.

4.2 PCR cuantitativa

El análisis mediante PCR cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo empleando los cebadores específicos para los genes que se muestran en las tablas MM4 y 5, y el kit de amplificación *SYBR Green PCR MasterMix* (Applied Biosystems). Las muestras se amplificaron y analizaron en el termociclador para qPCR *LightCycler® 480 Instrument* (Roche).

La síntesis de los cebadores fue solicitada a la casa comercial *Isogen Life Science*, Badalona (España).

Los ADNc molde se amplificaron siguiendo este programa: activación inicial a 95°C durante 10 min seguida de una fase de amplificación de 40 ciclos compuestos por 95°C 30 s y una determinada temperatura de hibridación (60-62°C, dependiendo de la secuencia de los cebadores) durante 1 min.

Para el análisis de las curvas de fusión (o curvas de *melting*), se añadió un ciclo de 5 s a 95°C, un segundo ciclo de 15 s a 60°C, y un tercer ciclo en el que tiene lugar un incremento paulatino de temperatura desde 60 a 95°C, a razón de 0,06°C/s. Este incremento de temperatura permite que se modifique la unión del fluorocromo al DNA de doble cadena, de modo que se obtiene un valor de temperatura de disociación (T_m , temperatura a la cual la mitad de las moléculas de DNA están disociadas) característico de la secuencia amplificada.

La cuantificación relativa de la expresión génica se llevó a cabo siguiendo el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Los niveles de ARNm fueron normalizados utilizando el gen GAPDH como referencia (o *housekeeping*) y comparados con su expresión en células no tratadas.

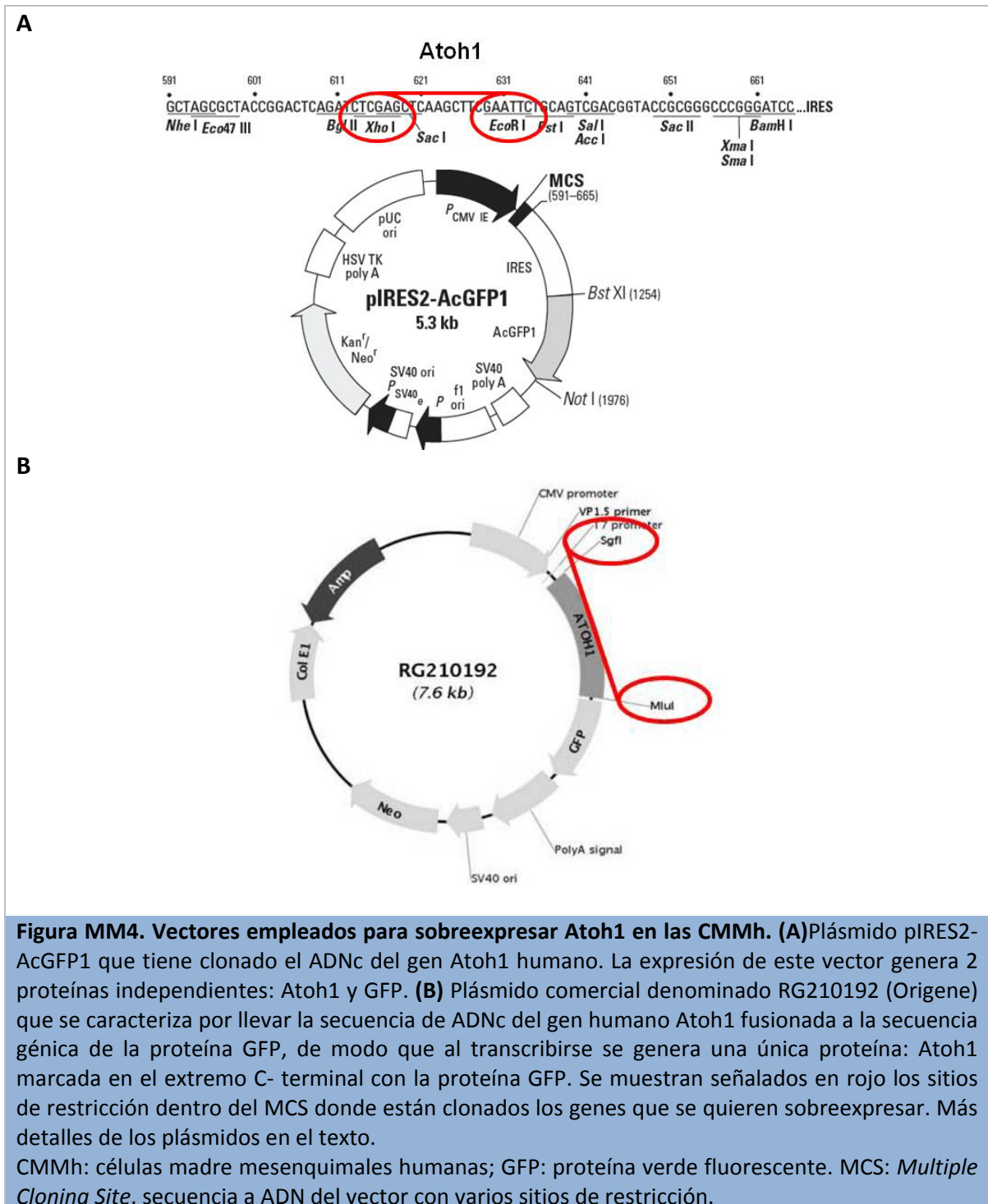
Tabla MM4. Secuencias de los cebadores empleados en la qPCR para la amplificación del ARNm humano		
GEN	SENTIDO	ANTISENTIDO
<i>GAPDH</i>	ACACCCACTCCTCCACCTTTG	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA
<i>SOX2</i>	GCAAGATGGCCCAGGAGAA	CGCTTAGCCTCGTCGATGA
<i>NESTINA</i>	AAGAAGAGGATCTAACAGGAAGGAA	CCCAGAGACTTCAGGGTTTCTTT
<i>OCT4</i>	GATGTGGTCCGAGTGTGGTTCT	TGTGCATAGTCGCTGCTTGAT
<i>MSII</i>	CTCCAAAACAATTGACCCTAAGGT	CTTCGTTGAGTCACCATCTTG
<i>ATOH1</i>	GCAATGTTATCCCGTCGTTCA	CTCGGACAAGGCGTTGATGT
<i>MIOSINA7A</i>	CCCATTCTGGAAGCATTGG	ACTTTCCGAAACGGCTTGAG
<i>CALRETININA</i>	CCTGCTGAAGAAGGCGAACCG	GGACAGGCAGGAGTCGGGACA
<i>BRN3C</i>	TTCTCCAGTCTGCACTCTGG	TGCTCATGGTATGGTTAGGTGG
<i>ISLET-1</i>	GCTGGCGACCCGCTCAGTC	GCGGGTGGTCTTCTCCGGC
<i>NGN1</i>	TTTCTCCTCCCAAGCCTGC	ATCTATTGCCTGCTGACTAGG
<i>GATA3</i>	CAGAAGGCAGGGAGTGTGTGA	TCTGTCCGTTCATTTTGTGATAGAG

Tabla MM5. Secuencias de los cebadores empleados en la qPCR para la amplificación del ARNm de ratón		
GEN	SENTIDO	ANTISENTIDO
<i>Gapdh</i>	TCCTGCACCACCAACTGCTT	GTGGCAGTGATGGCATGGAC
<i>Sox2</i>	AAAGAGATAACAAGGGAATTGGG	TTTCCGAGCTGTCGTTTCG
<i>Nestin</i>	AAAGTTCCAGCTGGCTGTGG	AGCCACTTCCAGACTAAGGG
<i>Atoh1</i>	AACCACGCCTTCGACCAGC	CTCCGACATTGGGAGTCTGC
<i>Miosina7a</i>	TCAACGGAACCTCGACACAG	CCCTGGCTGTAGTTGCTGAA
<i>Brn3c</i>	TTTGATGAGAGCCTGCTGGC	TGCTCATGGTATGGTTAGGTGG
<i>Oct4</i>	CTGAAGCAGAAGAGGATCACC	TTAAGGCTGAGCTGCAAGGC
<i>Nanog</i>	CAGCAGATGCAAGAACTCTCC	GACCATTGCTAGTCTTCAACC
<i>Klf4</i>	CACATTAATGAGGCAGCCACC	GGACGCAGTGTCTTCTCCC
<i>Pax2</i>	TGTTTCCAGCGCCTCTAACG	TCGCGTTTCTCTTCTCACC
<i>Gata3</i>	AGGCAAGATGAGAAAGAGTGC	AGGGTGGTCATGCTGCCTCG
<i>Pax8</i>	TCGACTCACCAGACCTACCC	TAAAGAGGAAGGGGTGGAGC

5. PLÁSMIDOS, CLONAJES Y SUBCLONAJES

5.1 Plásmidos utilizados

- Para transfectar el ADNc del gen Atoh1 en las CMMh se emplearon los siguientes plásmidos (Figura MM4):
 - pIRES2-Atoh1-AcGFP1: En el vector pIRES2-AcGFP1 (Clontech) se clonó la secuencia de ADNc del gen Atoh1 humano (NM_005172.1) en los sitios de restricción XhoI y EcoRI, bajo el promotor del citomegalovirus (CMV). Además, el vector contiene el gen para la proteína verde fluorescente (GFP) unida a Atoh1 por una secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma o *internal ribosomal entry site*). Al llevar una secuencia IRES, en la célula se va a transcribir como un ARNm policistrónico, dando lugar a 2 proteínas independientes. Este plásmido contiene un gen de resistencia a kanamicina para seleccionar las bacterias que han incorporado el plásmido y un gen de resistencia a neomicina para seleccionar las células eucariotas que reciben el plásmido tras la transfección (Figura MM4A).
 - RG210192: es un vector pCMV6-AC-GFP que lleva clonada la secuencia del marco abierto de lectura (ORF, *open reading frame*) del gen Atoh1 humano (NM_005172.1) marcado en el extremo C-terminal con GFP (producido comercialmente por OriGene). El fragmento está ligado en los sitios de restricción SgfI/MluI, bajo el promotor del CMV. Este vector se caracteriza por transcribirse como un único RNA de modo que se genera la proteína Atoh1 marcada con GFP. Este plásmido contiene un gen de resistencia a Ampicilina para seleccionar las bacterias y un gen de resistencia a neomicina para seleccionar las células eucariotas (Figura MM4B).



- Los fibroblastos humanos y murinos se transfectaron con los siguientes plásmidos:
 - pYFP-Eya1: El plásmido fue cedido por el Prof. Pascal Maire (*Département de Développement, Génétique et Physiopathologie musculaires, Institut Cochin, Paris, Francia*) (Grifone y cols., 2004). El ADNc completo del gen Eya1 de ratón fue clonado en el sitio de restricción EcoRI/ApaI del vector pEYFP-C1 (Clontech) y genera la proteína Eya1 fusionada al extremo C-terminal de la proteína amarilla fluorescente (YFP). Se expresa bajo el promotor del CMV y lleva un gen de resistencia a kanamicina para bacterias y el gen de resistencia a neomicina para selección en eucariotas (Figura MM5A).
 - pSix1: Este plásmido fue cedido por la Dra. Heide L. Ford (*University of Colorado Anschutz Medical Campus, Aurora, Colorado, Estados Unidos*) (Ford y cols., 1998). El ADNc completo del gen Six1 humano (NM_005982.3) fue clonado en los sitios de restricción BamHI/XbaI del vector pcDNA3.1(+) (Invitrogen). El ADN se expresa bajo el promotor del CMV, lleva un gen de resistencia a ampicilina para bacterias y el gen de resistencia a neomicina para selección en eucariotas (Figura MM5B).
 - pSox2: Este plásmido fue cedido por el Dr. Fernando Giráldez (*Dept. Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, Barcelona, España*). Es un vector pcDNA3 que lleva clonado en los sitios de restricción EcoRI y XbaI la secuencia de codificación (CDS o *Coding Sequence*) del gen Sox2 de ratón (AB108673.1). Se expresa bajo el promotor del CMV y lleva un gen de resistencia a ampicilina para procarionas y el gen de resistencia a neomicina para selección en eucariotas (Figura MM5C).
 - pLV-Atoh1-IRES-eGFP: la secuencia de ADNc del gen Atoh1 humano (NM_005172.1) se clonó en el vector pLV-IRES-GFP (cedido por el Dr. Carlos Vicario, departamento de Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo, Instituto Cajal, Madrid, España) en los sitios de restricción XhoI y BamHI bajo el promotor del CMV. El vector contiene el gen para la GFP unido a Atoh1 por una secuencia IRES. Este plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina para seleccionar las bacterias que han incorporado el constructo (Figura MM5D). El plásmido vacío (pLV-IRES-eGFP) se utilizó como control y para establecer la capacidad de transfección de los distintos tipos de fibroblastos empleados.

5.2 Transformación de bacterias competentes

Para obtener las cantidades necesarias de los plásmidos de ADN utilizados en este trabajo, se ha realizado un proceso de amplificación de los mismos mediante la transformación (introducción de ADN) de bacterias competentes.

Protocolo:

- Descongelar un tubo con 100 µl de bacterias competentes *E. coli XL2blue* en hielo.
- En condiciones de esterilidad, añadir 0,5-1 µg del plásmido de interés y mezclar con suavidad. Incubar 30 min en hielo.
- Choque térmico: incubar en un baño a 42°C durante 45 segundos y seguidamente 2 min en hielo.
- Añadir 900µl de medio LB estéril (Luria-Bertani; Sigma Aldrich) y dejar el tubo durante 45 min en un baño a 37°C.
- Sembrar 100 µl del cultivo bacteriano sobre una placa de LB Agar (Sigma Aldrich) con el antibiótico adecuado y extender con el asa de siembra. Incubar toda la noche en una estufa a 37°C.
- Al día siguiente, inocular con colonias aisladas 1ml de medio LB con antibiótico adecuado para cada plásmido: ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml). Dejar en agitación y a 37°C durante 5-6 horas.
- Pasado este tiempo, poner 150 µl del cultivo en 150 ml de medio LB con antibiótico e incubar en un agitador a 37°C durante toda la noche, para obtener un cultivo denso de bacterias transformadas.

5.3 Extracción del ADN plasmídico de las bacterias

Una vez se tiene un cultivo de bacterias transformadas, se procede a la extracción del plásmido utilizando el kit Jetstar 2.0 (Genycell Biotech), siguiendo el protocolo recomendado:

- Centrifugar el cultivo de bacterias a 6000 r.p.m durante 15 min a 4°C (centrífuga Avanti J-20 XP, Beckman-Coulter). Desechar el sobrenadante y resuspender el *pellet* de células en 10 ml de la solución E1 hasta obtener una suspensión homogénea.
- Equilibrar las columnas del kit con 30 ml de solución E4.
- Lisar las células añadiendo 10 ml de solución E2, mezclar bien e incubar 5 min a TA.
- Neutralizar la reacción con 10 ml de solución E3, mezclar bien y centrifugar a 12000 r.p.m durante 10 min a TA.
- Añadir el sobrenadante a la columna y dejar eluir. Desechar el líquido.
- Lavar la columna con 60 ml de solución E5 y dejar eluir. Desechar el líquido.

- Eluir el plásmido de la columna añadiendo 15 ml de solución E6.
- En el tubo de elución del plásmido, añadir 10'5 ml de isopropanol y dejar precipitar toda la noche a -20°C.
- Centrifugar a 12000 r.p.m durante 30 min a 4°C. Desechar el sobrenadante
- Lavar el *pellet* (plásmido) con etanol al 70% y centrifugar de nuevo a 12000 r.p.m durante 30 min a 4°C. Desechar el sobrenadante y dejar secar el *pellet* unos minutos. Resuspender el plásmido en 200 µl de agua destilada. Medir la concentración del ADN en el espectrofotómetro.

6. INTRODUCCIÓN DE ADN EN CÉLULAS EN CULTIVO

6.1 Transfección lipídica

EL proceso de transfección lipídica se basa en el uso de liposomas catiónicos que interaccionan con las cargas negativas del ADN formando complejos, que posteriormente se fusionan con la membrana plasmática de la célula liberando el ADN en el interior de las células.

Existen una gran variedad de productos para realizar este tipo de transfecciones. Se eligió el kit *Lipofectamine LTX and Plus Reagent* (Invitrogen) por ser el más efectivo y menos dañino con las células y se siguió una modificación del protocolo recomendado por la casa comercial:

- El día anterior a la transfección, las células se siembran en cubreobjetos de cristal tratados con poli-L-lisina o en placas de 35mm de diámetro en medio normal.
- El día de la transfección se cambia el medio de los cultivos por *DMEM* de alta glucosa, 10% SBF, sin antibiótico.
- Para cada transfección en placas de 35mm o en dos cubreobjetos, se preparan dos soluciones:
 - o Solución A: 5 µl de *Lipofectamine LTX* + 100µl de medio *OptiMEM* (Invitrogen). Mezclar bien e incubar durante 15 min a TA.
 - o Solución B: 2-3 µg de ADN + 3.5 µl de *Plus Reagent* + 100 µl de *OptiMEM*. Mezclar bien e incubar también durante 15 min a TA.
- Mezclar soluciones A y B pipeteando suavemente e incubar otros 15 min a TA para permitir la formación de los complejos lipídicos.
- Añadir 100 µl de la mezcla sobre cada cubre o 200 µl sobre cada placa de 35mm y mover para mezclar bien los medios.
- Incubar entre 3.5 horas a 37°C en la estufa de cultivos.
- Después, cambiar el medio de transfección por medio normal (con antibiótico).

La expresión de los genes se comprobó a las 24-48 horas mediante ICC o qPCR.

6.2 Electroporación

La electroporación es una técnica utilizada para transfectar células y que consiste en la aplicación de una corriente eléctrica que produce transitoriamente cambios en la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular, permitiendo la entrada molecular, en este caso ADN exógeno.

6.2.1 Electroporación convencional

Se realizó utilizando un electroporador *Gene Pulser Xcell* (Biorad), en el que se establecen manualmente las condiciones del campo eléctrico que vamos a aplicar a las células.

Para ello, las CMM se levantaron cuando se encontraban en un 50-70% de confluencia (unas 48 horas después de sembradas) y se resuspendieron a razón de 5×10^5 células en 400 μ l de *OptiMEM* por cubeta de electroporación (*Gene Pulser cuvette* 0,4mm, Biorad). Después se añadió el plásmido correspondiente (20 μ g de ADN) y se mezcló suavemente, evitando la formación de burbujas. Las cubetas se introdujeron en el electroporador y se aplicó un impulso de 350 V, 950 μ F y 200 Ω (Helledie y cols., 2008). Tras el estímulo eléctrico, el contenido de cada cubeta se sembró en una placa de 60mm de diámetro, previamente tratada con poli-L-lisina para facilitar la adherencia, en medio completo. El medio fue cambiado a las 24 h de la transfección para eliminar las células muertas.

En el caso de los fibroblastos humanos, las condiciones óptimas cambiaron ligeramente. Las células se resuspendieron a razón de 1×10^6 células en 500 μ l de *OptiMEM* por cubeta de electroporación. La cantidad de plásmido empleado por cubeta fue 30 μ g de ADN y el impulso aplicado fue de 320 V y 500 μ F, sin establecer la resistencia (Tamura y cols., 1998).

6.2.2 Nucleofection

Se utilizó la tecnología *Nucleofector™* (todos los reactivos, cubetas y electroporador son de Amaxa Biosystem), que consiste en unas soluciones comerciales para electroporación formuladas específicamente para células con baja eficiencia de transfección (Gresch y cols., 2004; Aluigi y cols., 2006). El electroporador no es el convencional, sino que viene programado de fábrica con condiciones de electroporación diseñadas por la casa comercial.

El proceso fue similar a la electroporación convencional. Las CMM se levantaron al 80-90% de confluencia y se resuspendieron a razón de $4-5 \times 10^5$ células en 100 μ l de una mezcla de *Nucleofector Solution™* por cubeta de electroporación. Después se añadió el plásmido correspondiente y se mezcló suavemente, evitando la formación de burbujas.

Las cubetas se introdujeron en el electroporador y se aplicó el programa U-23, recomendado para las CMMh. Inmediatamente después, el contenido de cada cubeta se sembró en una placa de 60mm de diámetro, previamente tratada con poli-L-lisina, en medio completo. El medio fue cambiado a las 24 h de la transfección para eliminar las células muertas.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias de expresión del ARNm detectadas por qPCR fueron analizadas estadísticamente mediante el test de T de Student. Las diferencias entre el control y el tratamiento fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Para los cálculos estadísticos se utilizó el programa *Microsoft Office Excel 2007*.



RESULTADOS

1. ESTUDIOS DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CMMh DE MÉDULA ÓSEA HACIA CÉLULAS SENSORIALES DEL OÍDO INTERNO

1.1 Análisis fenotípico de las CMMh

Las CMMh son un tipo de células madre adultas que se encuentran en numerosos tejidos, entre ellos la médula ósea. Se caracterizan por ser células proliferativas, presentar una determinada combinación de marcadores celulares, y, tradicionalmente, por su capacidad para diferenciarse en células del linaje mesodérmico (Dominici y cols., 2006).

En este trabajo se utilizaron varios lotes comerciales de CMMh de médula ósea (Lonza). Estas células se suministran ya caracterizadas en cuanto a su capacidad de diferenciación a células del linaje mesodérmico y también por citometría de flujo. Antes de comenzar los experimentos de diferenciación hacia un fenotipo ótico, se quiso comprobar que las CMMh estaban en óptimas condiciones y que no habían perdido sus características típicas durante los subcultivos. Las CMMh se emplearon en los experimentos de diferenciación hasta los pases 8-9, ya que en los siguientes pases se empezó a detectar una disminución en su capacidad proliferativa. Las CMMh de los cultivos utilizados presentaron una morfología homogénea.

En primer lugar, se llevó a cabo una caracterización fenotípica de las CMMh mediante citometría de flujo. Al no haber un marcador específico de CMM, esta caracterización se basa en el uso de una serie de anticuerpos contra marcadores cuya expresión se conoce en las CMM. Los anticuerpos utilizados en nuestros estudios fueron contra los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45, así como otros indicados en la bibliografía como adecuados para caracterizar CMM: CD73, CD90, CD105 y CD166 (Dominici y cols, 2006). Las CMMh analizadas a p7 resultaron ser negativas para los antígenos hematopoyéticos CD34 y CD45, y positivas para CD73 ($99,80 \pm 0,78\%$), CD105 ($98,81 \pm 2,81\%$), CD166 ($99,49 \pm 0,96\%$) y CD90 ($99,90 \pm 0,79\%$) (Figura R1).

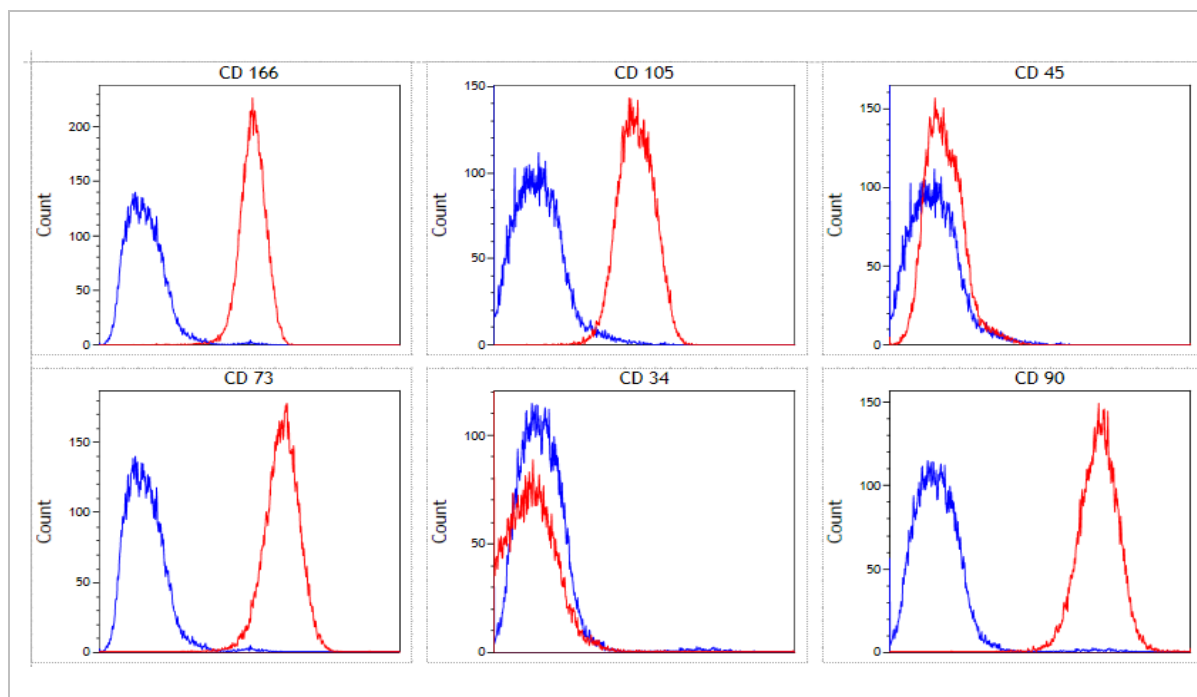


Figura R1. Caracterización por citometría de flujo de un cultivo representativo de CMMh a p7. Tras varios pases, las CMMh siguen expresando los marcadores CD166, CD105, CD73 y CD90, mientras que no expresan marcadores hematopoyéticos como CD34 y CD45. La línea azul representa el control negativo (isotipo) y la roja la expresión del marcador en el cultivo. CMMh: células madre mesenquimales humanas; p: pase..

Se confirmó la capacidad de diferenciación de las CMMh hacia los linajes adipogénico y osteogénico, al someter CMMh en pases 7-8 a las condiciones específicas pertinentes. La diferenciación adipogénica se indujo tratando los cultivos con IBMX, dexametasona, insulina e indometacina durante 3 semanas (Pittenger y cols., 1999). Tras este tiempo, la mayor parte de las células desarrollaron vacuolas lipídicas, un indicador de diferenciación adipogénica, visualizadas mediante la tinción de oil red-O (Figura R2A y B). La diferenciación osteogénica se hizo mediante el cultivo de las CMMh en presencia de dexametasona, ácido ascórbico y β -glicerolfosfato durante 3 semanas (Pittenger y cols., 1999). La tinción de von Kossa se utilizó para determinar la presencia de depósitos de calcio en las células (Figura R2C y D).

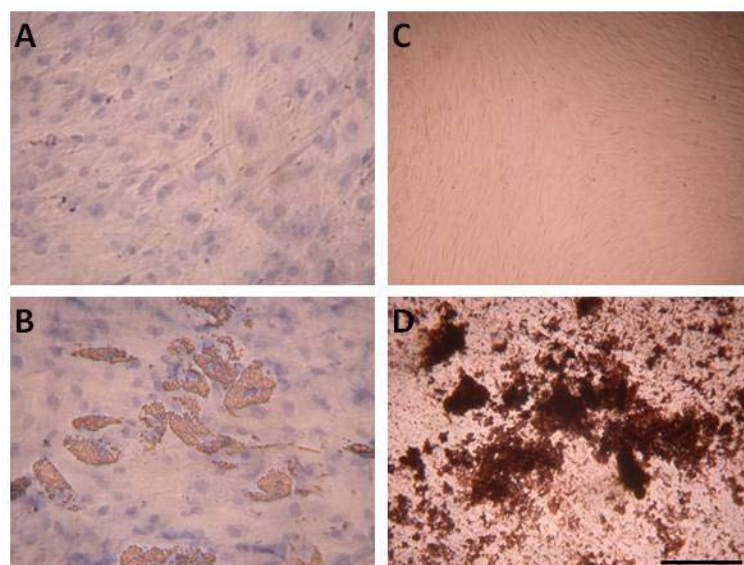


Figura R2. Diferenciación adipogénica y osteogénica de CMMh. La tinción con oil red-O detecta la acumulación de vacuolas lipídicas en las células tras la diferenciación adipogénica (**B**) frente a los cultivos control de CMMh (**A**). La diferenciación osteogénica de las CMMh se demostró mediante la tinción de von Kossa, que detecta la acumulación de depósitos de calcio (**D**), frente a un control sin diferenciar (**C**). Los cultivos fueron contrateñidos con hematoxilina de Mayer. Barra de escala: 200 μ m.

CMMh: células madre mesenquimales humanas.

1.2 Efecto de la sobreexpresión de Atoh1 en la diferenciación de las CMMh

El factor de transcripción Atoh1 es considerado como un gen clave para la especificación de las CC (Birmingham y cols., 1999; Woods y cols., 2004). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de este gen en CMM de ratón cultivadas en presencia de factores de crecimiento como IGF1, EGF y bFGF resulta en la expresión de marcadores característicos de CC como Brn3c y Miosina7a (Jeon y cols., 2007). El primer objetivo fue, por tanto, determinar si la sobreexpresión de Atoh1 en CMMh tendría un efecto similar, facilitando su diferenciación hacia células similares a las CC.

Se realizaron experimentos preliminares para determinar el método de transfección más eficiente para las CMMh, de los disponibles en el laboratorio: transfección a través de liposomas (utilizando *Lipofectamine LTX + PLUS reagent*), electroporación convencional y electroporación con *Nucleofector™*. Se utilizó el plásmido pIRES2-AcGFP1, en el que se clonó el ADNc correspondiente al gen humano Atoh1 (Figura R3A) y que lleva como reportero el gen GFP.

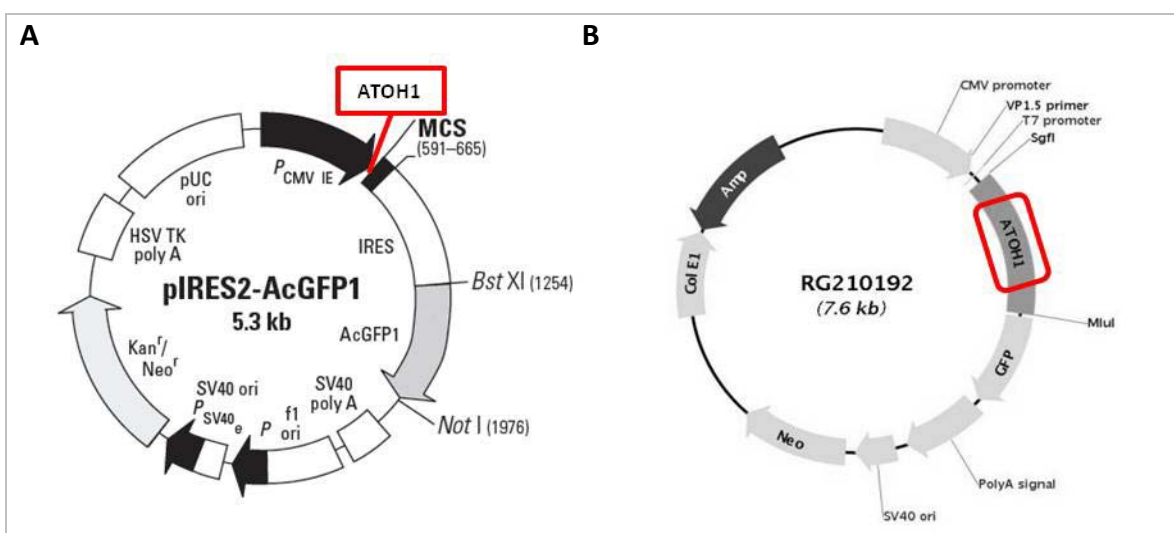


Figura R3. Mapas de los vectores utilizados para sobreexpresar Atoh1 en las CMMh. (A) Plásmido pIRES2-AcGFP1, en el que se ha insertado el ADNc del gen humano Atoh1. Al llevar una secuencia IRES en la célula se va a transcribir como un ARNm policistrónico, dando lugar a dos proteínas independientes. **(B)** Plásmido comercial denominado RG210192 (Origene) que se caracteriza por transcribirse como un único ARN de modo que se genera la proteína Atoh1 humana fusionada en su extremo C-terminal a la proteína GFP. Se ha marcado en rojo el lugar del inserto. Más detalles en Materiales y Métodos, sección 5.1, Figura MM4. CMMh: células madre mesenquimales humanas; GFP: proteína verde fluorescente.

Los resultados a las 24h de la transfección fueron diferentes según la metodología empleada (Figura R4Ai): la transfección a través de liposomas resultó ser un método poco eficiente para las CMMh, ya que apenas un $4,61 \pm 1,39\%$ de las células fueron GFP positivas. Mediante electroporación convencional y con *Nucleofector* se obtuvo un porcentaje más alto de transfección ($23,14 \pm 4,40\%$ y $30,26 \pm 1,82\%$ respectivamente); utilizando la tecnología *Nucleofector* se observó una menor mortalidad celular. Cinco días después de la transfección, el número de células GFP+ en los cultivos se mantuvo, de modo que la electroporación no produjo mayor mortalidad pasadas 24 horas (figura R4Aii). Sin embargo, se observó que solo algunas de las células GFP-positivas expresaban también Atoh1 24 h después de la transfección ($7,62 \pm 1,74\%$ frente al $23,14 \pm 4,40\%$ en electroporación convencional y $19,08 \pm 1,98\%$ frente al $30,26 \pm 1,82\%$ con *Nucleofector*, Figura R4Ai). Además, a diferencia de las células positivas para GFP, el número de células Atoh1 positivas disminuyó en el tiempo, siendo 5 días después de la transfección un $1,20 \pm 0,79\%$ en la electroporación convencional y $1,68 \pm 0,61\%$ en la *Nucleofección* (Figura R4Aii). Esto último puede deberse a que en el plásmido utilizado las secuencias para Atoh1 y GFP se traducen de un modo independiente, por lo que aunque ambos ADNc se encuentren en todas las células transfectadas la expresión de una proteína no implica la presencia de la otra.

Para determinar qué sucedía con la expresión de Atoh1 tras la transfección de las CMMh se utilizó un plásmido en el que la secuencia de Atoh1 se encuentra fusionada con la de la GFP de modo que la GFP sólo se expresa si hay expresión de Atoh1 (Figura R3B). El nuevo

plásmido se electroporó bajo las mismas condiciones que el anterior. Tres días después de la electroporación el número de células GFP(+) fue muy bajo, coincidiendo siempre con células positivas para la expresión de Atoh1. Además, la mayoría de estas células presentaron un núcleo de aspecto apoptótico (condensación de la cromatina, visualizado a través de la tinción con DAPI, figura R3C). Por lo tanto, la sobreexpresión de Atoh1 en CMMh probablemente provocó la muerte de las células, no siendo ésta una buena aproximación para la diferenciación a CC. El cultivo de las células en presencia de IGF, EGF y bFGF antes o después de la transfección (siguiendo a Jeon y cols., 2007) no produjo ninguna diferencia en los resultados: la expresión de Atoh1 desapareció a los 2-3 días de la transfección y no se detectó un aumento en la expresión de Miosina7a a nivel de proteína mediante ICC.

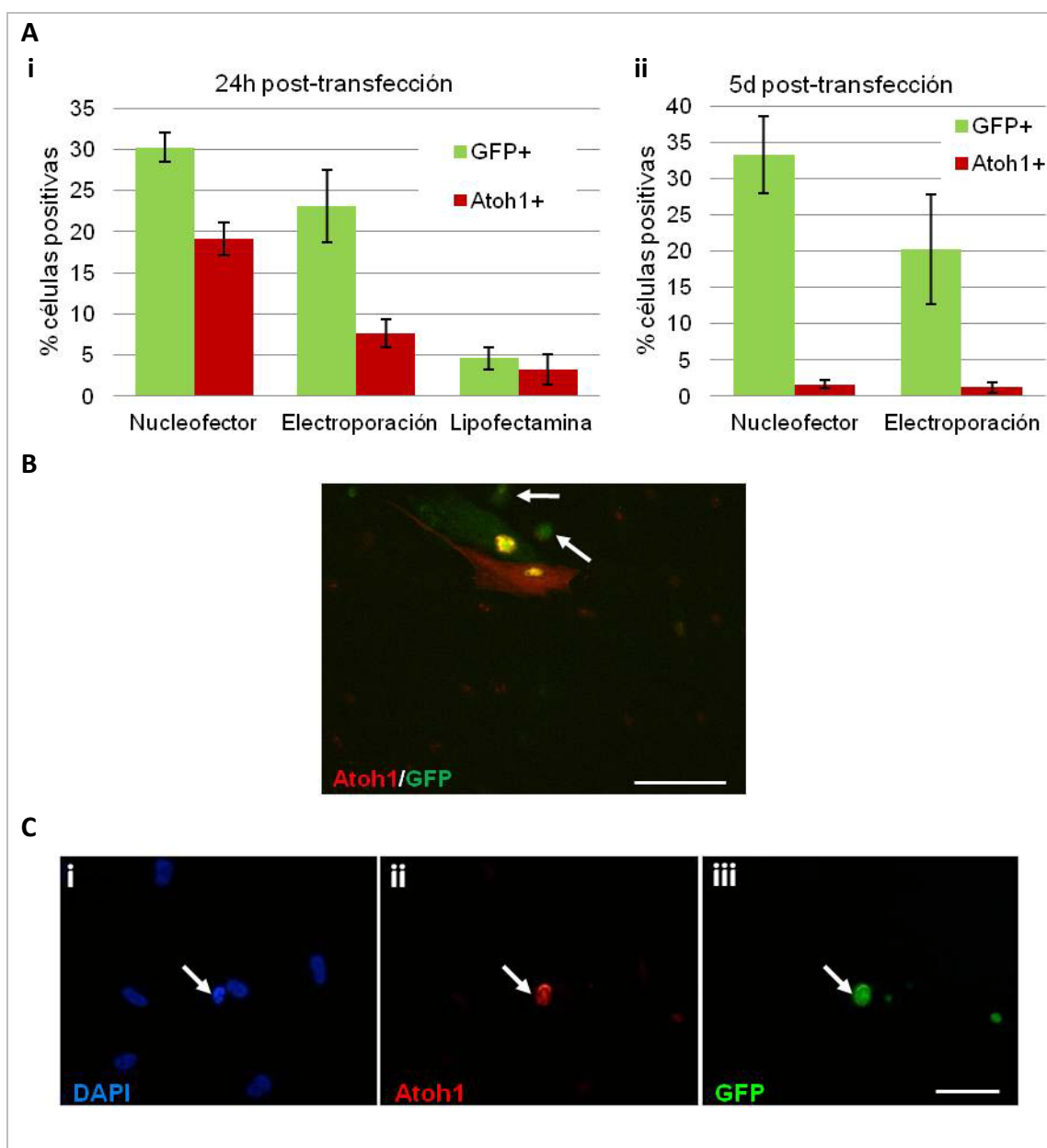


Figura R4. Transfección de Atoh1 en cultivos de CMMh. (A) Comparación del porcentaje de células transfectadas según la metodología empleada: Lipofectamina, Electroporación o Nucleofector. Se empleó el plásmido pAtoh1-IRES2-AcGFP1 y la eficiencia se determinó atendiendo a la expresión de GFP y de Atoh1 a través de ICC, a 24h (Ai) y 5 días (Aii) después de la transfección. Se representan las medias y las barras con el error típico de la media (n=4). (B) Cultivo de CMMh 24h después de electroporar el plásmido pAtoh1-IRES2-AcGFP1. En verde se observa la proteína GFP, mientras que en rojo se detecta la proteína Atoh1 mediante ICC. El nivel de transfección de las células es variable por lo que algunas expresaban Atoh1 también en el citoplasma. En amarillo se ven la coexpresión de ambas proteínas. Las flechas señalan núcleos celulares que expresan GFP pero no Atoh1. (C) Cultivo de CMMh a los 4 días de ser transfectado con el plásmido RG210192. En Ci la flecha señala un núcleo celular con la cromatina condensada, de apariencia apoptótica, que se corresponde con una célula transfectada que expresa Atoh1 y GFP (Cii y Ciii, respectivamente). Barras de escala: 100 μ m.

CMMh: células madre mesenquimales humanas; DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; ICC: inmunocitoquímica.

1.3 Inducción de la expresión de genes neurales tempranos en CMMh

Ya que la sobreexpresión de *Atoh1* en las CMMh en estado proliferativo no pareció ser un buen método para la inducción de un fenotipo de CC, se pensó que podría ser necesaria una diferenciación gradual, siguiendo un proceso lo más parecido posible al que ocurre *in vivo* en el oído de los mamíferos. Las CC y NSA del oído interno derivan de un progenitor neural (PN) común que, según las señales que recibe del medio que le rodea, se diferenciará en un tipo celular u otro (Ma y cols., 2000; Satoh y Fekete, 2005). Así, el objetivo inicial fue inducir la expresión de genes característicos de un PN en las CMMh y a partir de ahí iniciar distintos procesos de diferenciación hacia CC y NSA.

Las CMMh se cultivaron siguiendo distintos métodos para conseguir la inducción de genes neurales, como se resume en la figura R5. Estos métodos están basados en publicaciones que buscan conseguir PN a partir de diversos tipos celulares para luego continuar hasta una diferenciación completa hacia células sensoriales y neuronas (Fraichard y cols., 1995; Hermann y cols., 2004; Caddick y cols., 2006 y Edge y cols., 2007; entre otros). En uno de los protocolos, las células se trataron con β -mercaptoetanol (β ME) y AR en presencia de suero bovino fetal (SBF). Este método ha sido empleado por Caddick y cols. (2006) para diferenciar CMM de rata a células de Schwann pasando por una etapa de PN. Las CMMh también se cultivaron en monocapa en medio sin suero (MSS) en presencia de NT3, bFGF y BDNF, como hicieron Jeon y cols. (2007) para diferenciar CMM de ratón a PN. En otro grupo de experimentos, las CMMh se cultivaron en condiciones no adherentes (resultando en la formación de esferas) en presencia de SBF y AR, o en MSS con EGF y bFGF. La formación de esferas es un método que se ha empleado frecuentemente para la obtención de PN a partir de CMM o CME (Fraichard y cols., 1995; Hermann y cols., 2004; Ogita y cols., 2010; Boddy y cols., 2012).

El efecto de cada tratamiento se evaluó observando los cambios en la expresión de dos marcadores neurales, Nestina y Sox-2, a nivel de proteína mediante inmunocitoquímica (ICC) de fluorescencia y a nivel de ARNm por PCR cuantitativa (qPCR) (Figura R6A). Nestina es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto y se expresa durante el desarrollo embrionario, fundamentalmente en el sistema nervioso. Es característica de células madre neurales y progenitores neurales (Lendahl y cols., 1990; Mignone y cols., 2004), y se ha relacionado con la diferenciación de CMM hacia linajes neurales (Hermann y cols., 2006; Wislet-Gendebien y cols., 2012). Sox2, por su parte, es una proteína perteneciente a una familia de factores de transcripción implicados en el mantenimiento de la autorenovación y la competencia neural (Lefebvre y cols., 2007). Sox2 se expresa en el sistema nervioso en desarrollo, en células madre neurales y en progenitores óticos (Pevny y Nicolis, 2010; Neves y cols., 2013).

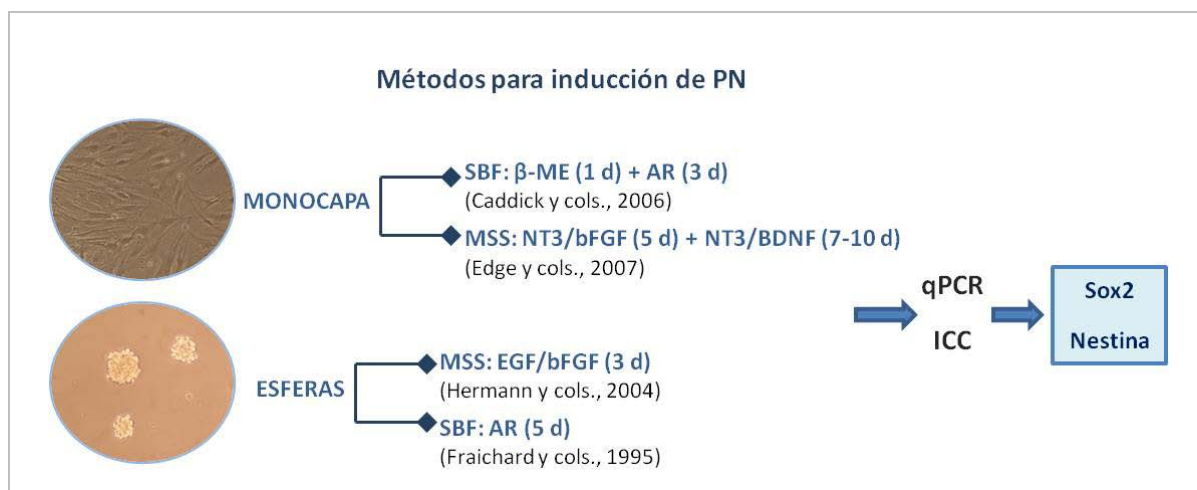


Figura R5. Esquema de la metodología empleada para inducir la expresión de marcadores de progenitores neurales en las CMMh. Las CMMh se trataron siguiendo distintos protocolos de diferenciación basados en diferentes publicaciones, como cultivos en monocapa o no adherentes (esferas). Para evaluar los efectos de los tratamientos se estudió la expresión de Sox2 y Nestina a nivel de proteína, mediante ICC y a nivel de ARNm, a través de qPCR.

AR: ácido retinoico; βME: β-mercaptoetanol; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; CMMh: células madre mesenquimales humanas; d: día; EGF: factor de crecimiento epidérmico; Fsk: forskolina; ICC: inmunocitoquímica; IBMX: isobutimetilxantina; MSS: medio sin suero; NT3: Neurotrofina 3; PN: progenitor neural; qPCR: PCR cuantitativa; SBF: suero bovino fetal.

El análisis de expresión génica por qPCR demostró un aumento significativo (test de Student, $p < 0,05$) de los niveles de ARNm de Nestina y Sox2 en los cultivos tratados con cualquiera de los cuatro métodos descritos anteriormente (Figura R6A). Además, análisis por ICC revelaron que también se había producido un aumento en la expresión de ambas proteínas (Figura R6B). En los cultivos en monocapa tratados en presencia o ausencia de suero, las células positivas para Nestina fueron el $38,6 \pm 7,06\%$ y $59,0 \pm 10,95\%$ respectivamente, mientras que para Sox2 lo fueron el $61,56 \pm 4,84\%$ y el $33,06 \pm 2,1\%$. El $25,03 \pm 4,80\%$ de las células crecidas en SBF y el $24,34 \pm 0,99\%$ de las tratadas en MSS expresaron ambas proteínas (Figura R6C). En el caso de las esferas, el porcentaje de células positivas no pudo ser determinado al tratarse de una estructura tridimensional. Además de la expresión de Sox2 y Nestina, en las esferas crecidas en MSS también se analizó la expresión de Oct-4 (marcador de pluripotencia, Pesce y cols., 2000) y Musashi-1 (marcador de célula madre neural, Kaneko y cols., 2000). Al igual que en PN derivados de CMM de ratón (Jeon y cols., 2007), ambos marcadores aumentaron su expresión en estos cultivos de PN (Figura R6D). Sin embargo, en los cultivos en monocapa tratados con MSS, bFGF, NT3 y BDNF se observó que había una disminución en la expresión de Atoh1 a nivel de ARNm (Figura R6E), a diferencia de lo publicado en cultivos derivados de CMM de ratón (Jeon y cols., 2007).

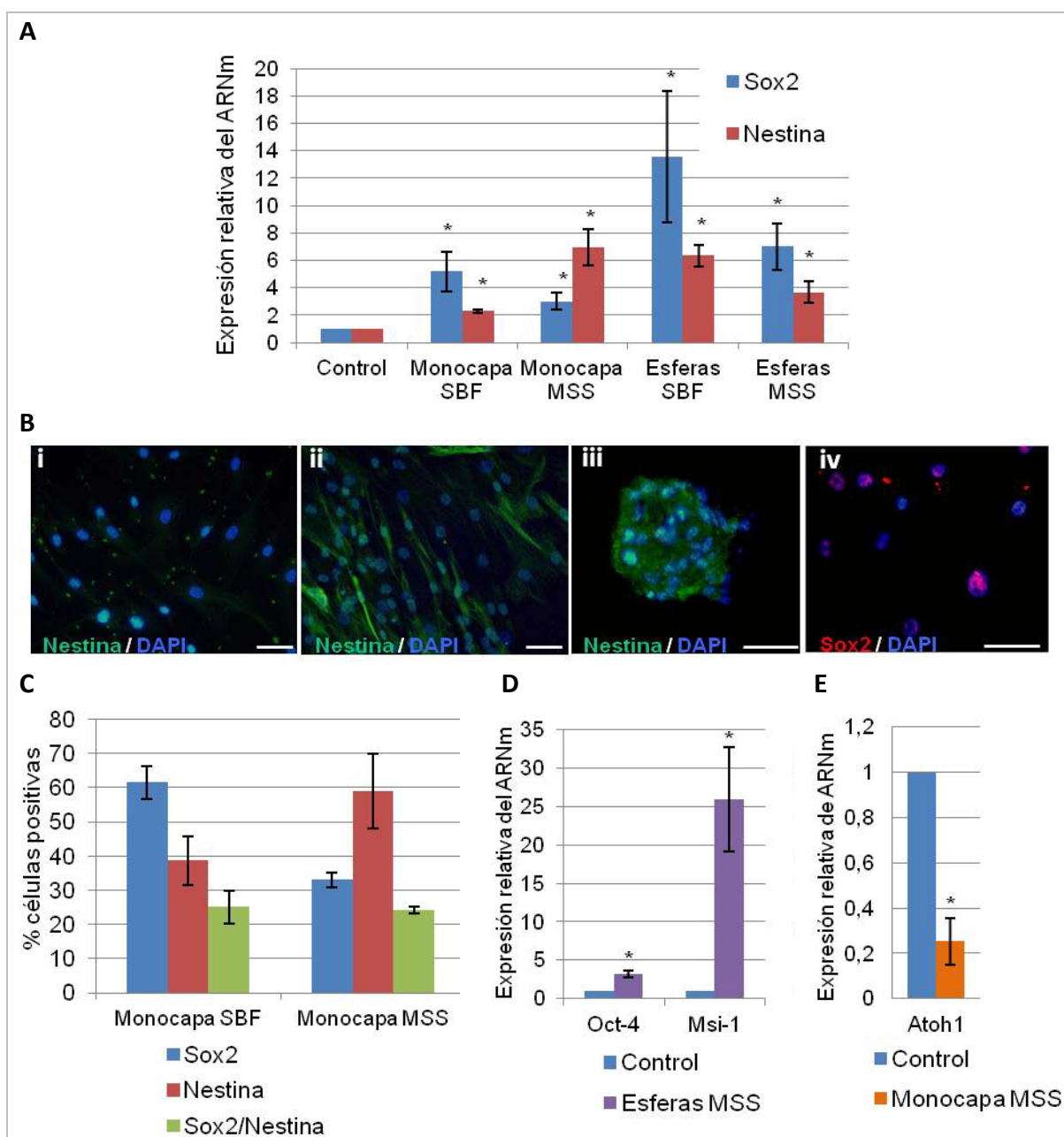


Figura R6. Inducción de la expresión de marcadores neurales en cultivos derivados de CMMh.

(A) Expresión relativa, mediante qPCR, de los genes Nestina y Sox2 en los distintos tratamientos con respecto a un control de CMMh cultivadas en 20%SBF. Los datos muestran un aumento significativo de la expresión de ambos genes en los cultivos tratados. **(B)** Expresión de las proteínas Nestina y Sox2 detectadas mediante ICC en cultivos de CMMh: **(i)** cultivos control de CMMh **(ii)** cultivos crecidos en monocapa tratados con MSS **(iii)** Esferas derivadas de CMMh cultivadas en MSS y **(iv)** monocapa en SBF. Núcleos, en azul, teñidos con DAPI. Barra de escala: 50 μ m. **(C)** Porcentaje de células positivas con respecto al total de células del cultivo para Nestina, Sox2 y para ambos marcadores en los tratamientos realizados sobre cultivos en monocapa. **(D)** Expresión relativa de los genes Oct4 y Musashi1 en las esferas cultivadas en MSS. **(E)** Expresión relativa de Atoh1 en los cultivos en monocapa en MSS. En **(A)**, **(D)** y **(E)** se representan las medias y las barras de error con el error típico de la media. Test T de Student *: $p < 0,05$.

CMMh: células madre mesenquimales humanas; DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; ICC: inmunocitoquímica; MSS: medio sin suero; SBF: suero bovino fetal.

En resumen, a partir de CMMh tratadas siguiendo los protocolos descritos anteriormente se pueden obtener cultivos con una proporción aceptable de células con características de PN.

1.4 Inducción de la expresión de marcadores de CC a partir de PN derivados de CMMh

1.4.1 Inducción mediante factores de crecimiento

1.4.1.1 El ejemplo de las CME de ratón

El factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1), EGF y bFGF, son factores de gran importancia en el desarrollo del oído (Doetzlhofer y cols. 2004; Schimmang, 2007; Murillo-Cuesta y cols. 2011). Según la literatura, combinaciones de estos factores de crecimiento promueven la diferenciación de CME, CM del oído interno y CMM de roedores hacia un fenotipo de CC (Li y cols., 2003a y 2003b; Jeon y cols., 2007; Qin y cols., 2011). En el laboratorio comprobamos que esta combinación de factores (protocolo esquematizado en figura R7A) indujo la expresión de Miosina7a en cuerpos embrionarios formados a partir de CME de ratón (Figura R7B). Miosina7a es una proteína motora que se expresa en CC maduras y está implicada en el crecimiento y el mantenimiento de la estructura de los estereocilios (Schwander y cols., 2010).

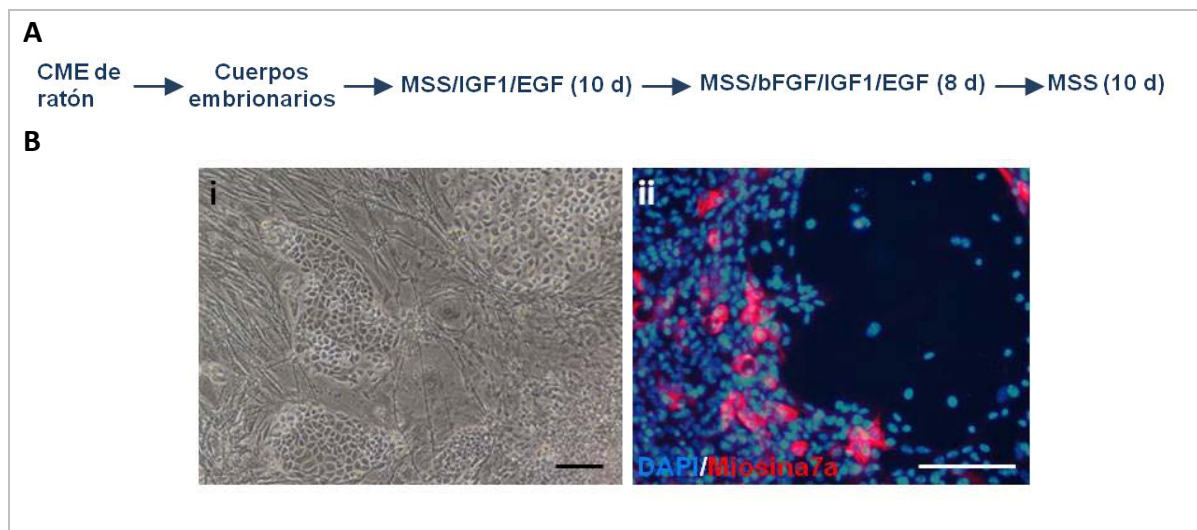


Figura R7. Diferenciación de CME de ratón hacia células con características de CC. (A) Esquema del protocolo de cultivo seguido para la diferenciación de CME de ratón (siguiendo Li y cols., 2003b). **(B) i.** Fotografía del cultivo de CME de ratón tras el tratamiento de diferenciación. Se observa que hay células con distintas morfologías. **ii.** Expresión de la proteína Miosina7a, detectada por técnicas ICC en los cultivos derivados de las CME de ratón tratados con el protocolo indicado en **A**. Núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala: 100 μ m.

bFGF : factor básico de crecimiento de fibroblastos; CC: células ciliadas; CME: células madre embrionarias; d: día; DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; EGF: factor de crecimiento epidérmico; ICC: inmunocitoquímica; IGF1: factor de crecimiento insulínico tipo 1; MSS: medio sin suero.

En experimentos preliminares se comprobó que el tratamiento directo de las CMMh en monocapa con esta combinación de factores no tenía ningún efecto sobre la expresión de Miosina7a. Formando cuerpos embrionarios previamente al tratamiento con IGF1/EGF/bFGF, del mismo modo que en las CME de ratón, tampoco indujo la expresión de Miosina7a en los cultivos derivados de CMMh (Figura 8A y B). Asimismo, como ya se comentó en el apartado anterior, la sobreexpresión de Atoh1 antes o después del tratamiento con factores (siguiendo el método empleado por Jeon y cols., 2007) tampoco tuvo ningún efecto sobre la inducción de Miosina7a. Esto podría deberse simplemente a que las CME tienen una mayor capacidad de diferenciación con respecto a las CMM. Sin embargo protocolos similares han demostrado ser capaces de inducir la expresión de Miosina7a en CMM de rata (Qin y cols., 2011), de modo que este resultado podría deberse a que especies diferentes pueden requerir estímulos específicos diferentes durante los proceso de diferenciación.

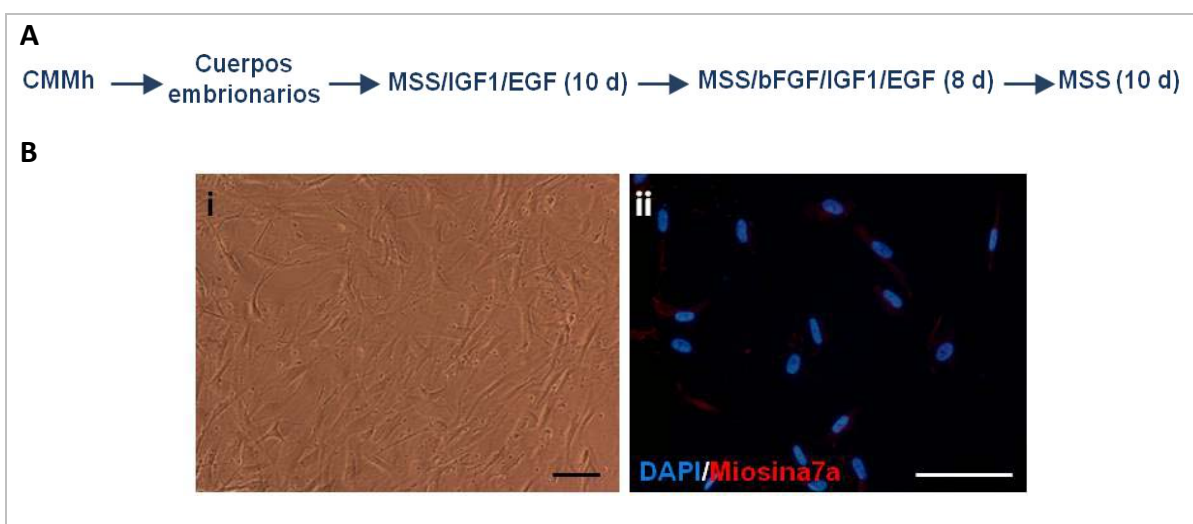


Figura R8. Diferenciación de CMMh hacia CC siguiendo el mismo procedimiento que para las CME. (A) Esquema del protocolo de cultivo seguido para la diferenciación de CMMh (modificado de Li y cols., 2003b). **(B) i.** Fotografía del cultivo *in vivo* que muestra que las células siguen presentando una morfología similar a un fibroblasto **ii.** A diferencia de las CME de ratón, las CMMh no expresan la proteína Miosina7a tras el tratamiento con IGF1, EGF y bFGF. Núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala: 100 μ m.

bFGF : factor básico de crecimiento de fibroblastos; CMMh: células madre mesenquimales humanas; d: día; DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; EGF: factor de crecimiento epidérmico; IGF1: factor de crecimiento insulínico tipo 1; MSS: medio sin suero; PN: progenitor neural.

1.4.1.2 Inducción de la expresión de marcadores de CC en CMMh a partir de un modelo humano.

Ya que los factores que parecen inducir una diferenciación ótica en CME de ratón no tuvieron el mismo efecto en las CMMh, se cambió a un modelo de diferenciación de células humanas: la diferenciación de los progenitores óticos derivados de cócleas fetales humanas hacia células similares a CC (Chen y cols., 2007, 2009). En nuestro laboratorio el punto de partida fueron cultivos que ya expresaban Sox2 y Nestina, los PN descritos en el apartado anterior. Los PN derivados de CMMh se cultivaron en MSS suplementado con EGF y AR durante dos semanas y se analizó la expresión de los marcadores de CC Miosina7a, Atoh1 y Calretinina a nivel de proteína mediante ICC y Miosina7a, Atoh1, Calretinina y Brn3c a nivel de ARNm mediante qPCR. Atoh1 es un factor de transcripción que se expresa inicialmente en la región prosensorial del futuro órgano de Corti para luego quedar restringido a las CC (Bryant y cols., 2002). Brn3c es otro factor de transcripción que se expresa en CC, implicado en la supervivencia de las CC (Xiang y cols., 1998) y que se induce justo después de Atoh1 pero antes que Miosina7a y Calretinina (Jeon y cols., 2007; Hu y cols., 2010). Calretinina es una proteína transportadora de calcio que se expresa en las CC aunque también en algunas CS y NSA (Dechesne y cols., 1994).

Empleando este medio de cultivo se indujo la expresión de marcadores de CC, aunque sólo cuando se utilizaron esferas obtenidas en MSS con EGF y bFGF como PN (Figura R9A). La expresión de la proteína Atoh1 se observó en el $17,51 \pm 1,71$ % de las células, Miosina7a en el $1,88 \pm 0,61$ % y Calretinina en el $4,18 \pm 0,97$ % (Figuras R9B, C y D).

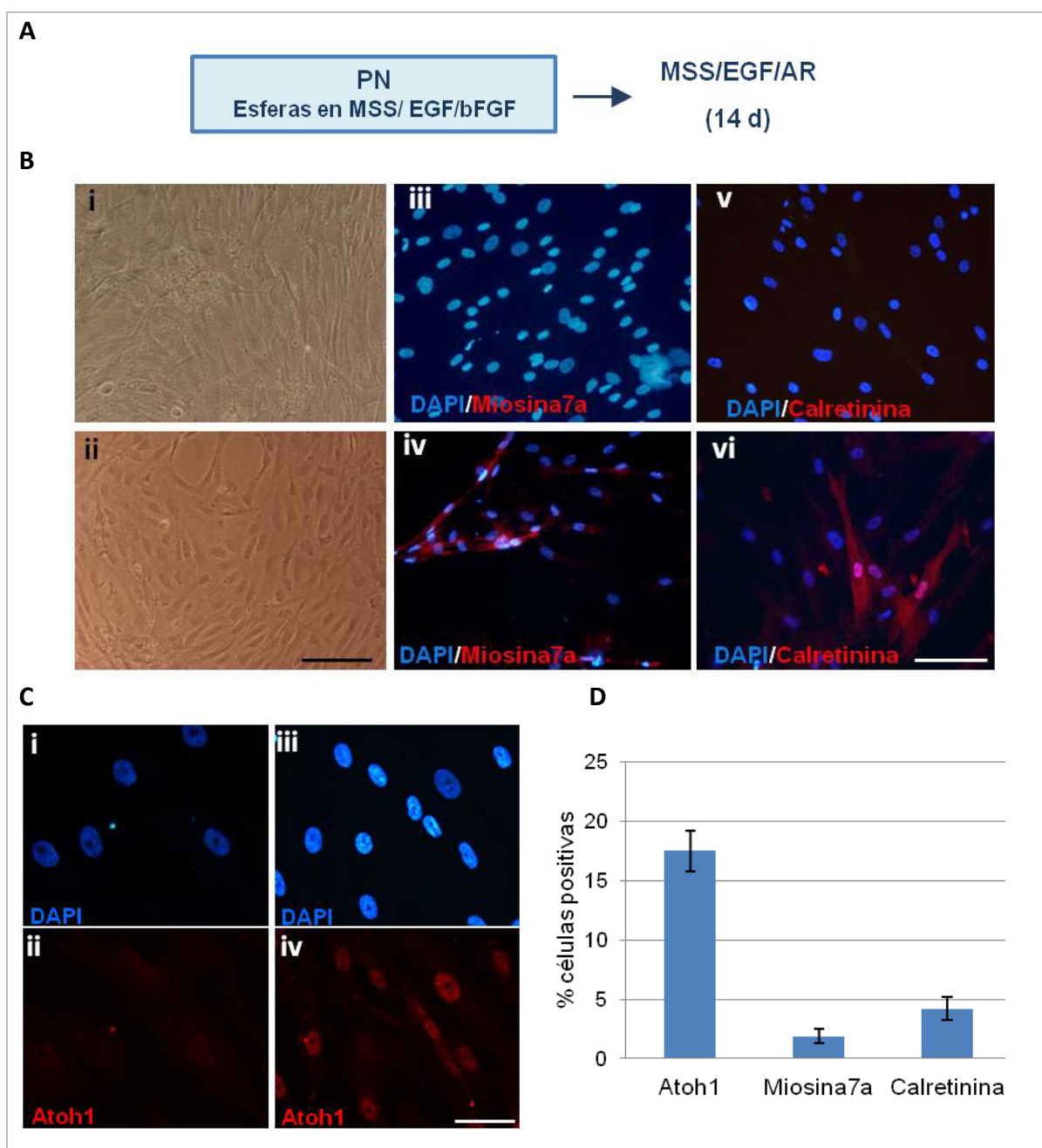


Figura R9. Análisis por métodos ICC de la inducción de marcadores de CC en CMMh mediante ICC. (A) Esquema del protocolo de cultivo seguido para inducir la expresión de genes y proteínas características de células ciliadas. Está basado en el empleado por Chen y cols., 2009 para diferenciar células fetales auditivas humanas. **(B)** Fotografía de cultivos control (i) y tratados (ii). Expresión de las proteínas Miosina7a y Calretinina en los cultivos tratados (iv y vi) frente a la ausencia de estas proteínas en los cultivos control (iii y v). Barra de escala 100 μ m. **(C)** Expresión de la proteína Atoh1 en cultivos tratados (iv) y control (ii). Barra de escala 50 μ m. En (B) y (C), núcleos teñidos con DAPI. **(D)** Cuantificación de la proporción de células que expresan las proteínas Atoh1, Mio7a y Calretinina en los cultivos de CMMh tratados según se describe en (A). AR: ácido retinoico; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; CC: células ciliadas; CMMh: células madre mesenquimales humanas; d: día; DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; EGF: factor de crecimiento epidérmico; MSS: medio sin suero; PN: progenitor neural.

El aumento de la expresión de estos marcadores fue confirmado a nivel de ARNm mediante qPCR, lo que también mostró un aumento de la expresión de Brn3c (Figura R10).

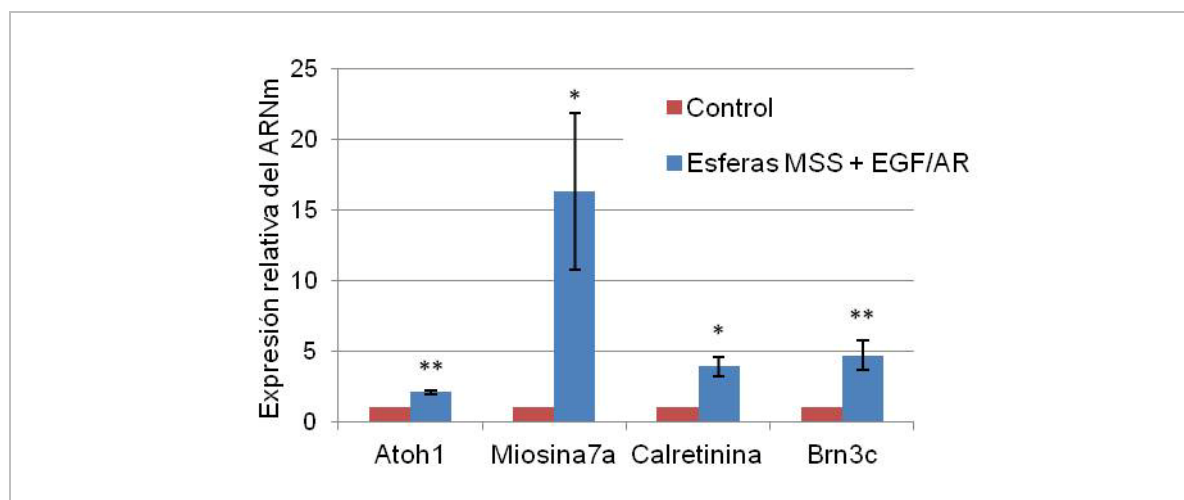


Figura R10. Análisis mediante qPCR de la inducción de marcadores de CC en CMMh. El análisis mediante qPCR muestra el aumento de la expresión de ARNm de los genes Atoh1, Miosina7a, Calretinina y Brn3c en los cultivos tratados con MSS/EGF/AR, comparado con los controles no tratados. Se representan las medias y las barras de error con el error típico de la media. Test T de Student *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$. N=5.

AR: ácido retinoico; CC: células ciliadas; CMMh: células madre mesenquimales humanas; EGF: factor de crecimiento epidérmico; MSS: medio sin suero; qPCR: PCR cuantitativa.

Estos experimentos muestran que PN derivados de CMMh pueden expresar marcadores de CC si se cultivan en determinadas condiciones.

1.4.2 Cocultivos de PN con células estromales de utrículo de embrión de pollo

En otra serie de experimentos, se siguieron las indicaciones publicadas por el grupo de Heller y cols., (Oshima y cols., 2010), consistentes en que el cocultivo de PN derivados de CME o de células iPS con células estromales de utrículo de embrión de pollo promueve la diferenciación hacia CC maduras. Tras cocultivar dos tipos de PN, generados por métodos diferentes, con las células estromales de pollo durante dos semanas (esquema del tratamiento en figura R11A) no se observó ninguna célula humana que expresara Miosina7a. Se observaron algunas células positivas para Miosina7a pero en todos los casos fueron negativas para HuNu, es decir, eran células de pollo (Figura R11B).

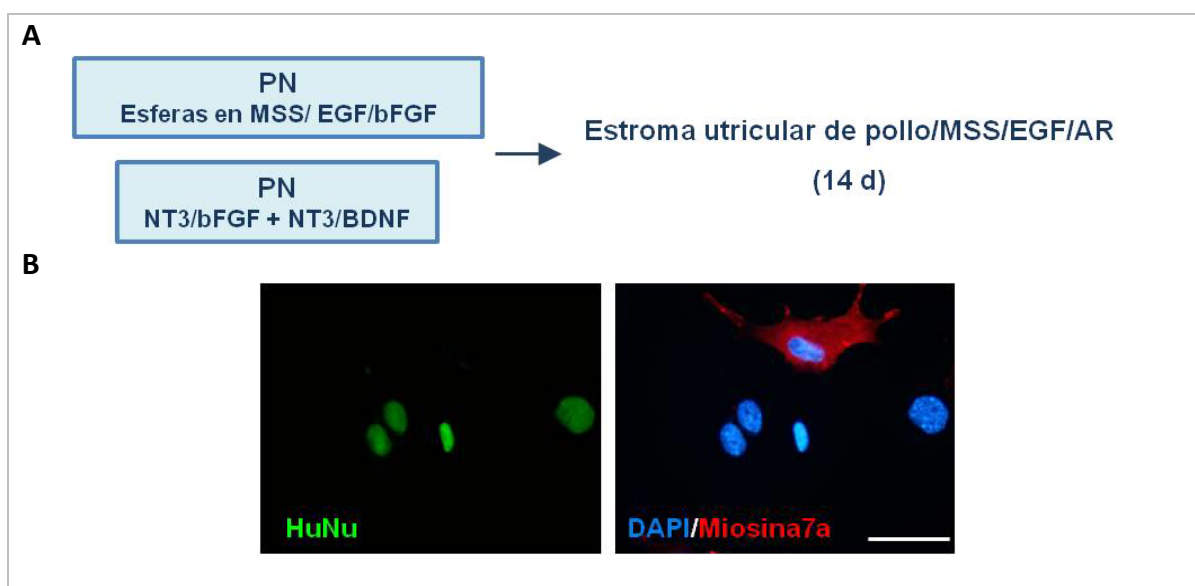


Figura R11. Cocultivo de PN derivados de CMMh con células estromales de utrículo de embrión de pollo. (A) Esquema del protocolo empleado. CMMh previamente diferenciadas hacia PN se cocultivaron con células estromales en presencia de factores de crecimiento. **(B)** No se observa la expresión de Miosina7a en células derivadas de CMMh (identificadas por el anticuerpo Hu-Nu) cocultivadas con células estromales de pollo. Algunas células de pollo expresaron la proteína Miosina7a. Nucleos teñidos con DAPI. Barra de escala: 50 μ m.

AR: ácido retinoico; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; CMMh: células madre mesenquimales humanas; d: día; DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; EGF: factor de crecimiento epidérmico; MSS: medio sin suero; NT3: Neurotrofina 3; PN: progenitor neural; qPCR: PCR cuantitativa; SBF: suero bovino fetal.

Por lo tanto, el cocultivo de PN derivados de CMMh con células estromales de utrículo de pollo no promueve la diferenciación a un fenotipo de CC.

1.5 Inducción de la expresión de marcadores de NSA a partir de PN derivados de CMMh

1.5.1 Inducción mediante factores de crecimiento

1.5.1.1 Método NSA1

Conocida la capacidad de las CMMh para diferenciarse hacia neuronas (Sanchez-Ramos y cols., 2000, Bae y cols., 2011), también se exploró la posibilidad de obtener NSA a partir de las CMMh. En un primer momento se realizaron experimentos siguiendo el protocolo publicado por Kondo y cols., 2005 (Figura R12A), donde muestran que un pretratamiento que aumenta la producción de AMPc (IBMX y forskolina) y la posterior combinación de AR y Shh en un medio con bFGF y BDNF es suficiente para diferenciar CMM de ratón hacia NSA (Figura R11B y C) en contraposición con otros tratamientos que generan neuronas no sensoriales. El AR es esencial en el desarrollo del sistema nervioso en general y del oído en particular (Romand y cols., 2006; Frenz y cols., 2010), mientras que Shh es muy importante en el inicio de la neurogénesis sensorial (Ota e Ito, 2003). Sin embargo, en el caso de las CMMh este tratamiento (aquí denominado NSA1) fue claramente tóxico, formándose numerosas vacuolas en las células, con algunas células incluso levantándose del plato de cultivo (Figura R12D). Además, los estudios de expresión génica no detectaron el aumento de expresión de Sox2, Islet1, Gata3 ni Ngn1 (Figura R12E). Estos genes se expresan en distintas etapas del desarrollo de las NSA: Sox2 se expresa en el dominio neurosensorial de la VO; Ngn1 en las células que van a migrar y formar el ganglio coclear (Ma y cols., 2000), Islet1 aparece en el dominio neurosensorial pero luego su expresión queda restringida al linaje neural y finalmente al ganglio cocleo-vestibular (Radde-Gallwitz y cols., 2004). Gata3 es un factor de transcripción que se expresa en las NSA y no en las neuronas vestibulares (Lawoko-Kerali y cols., 2004).

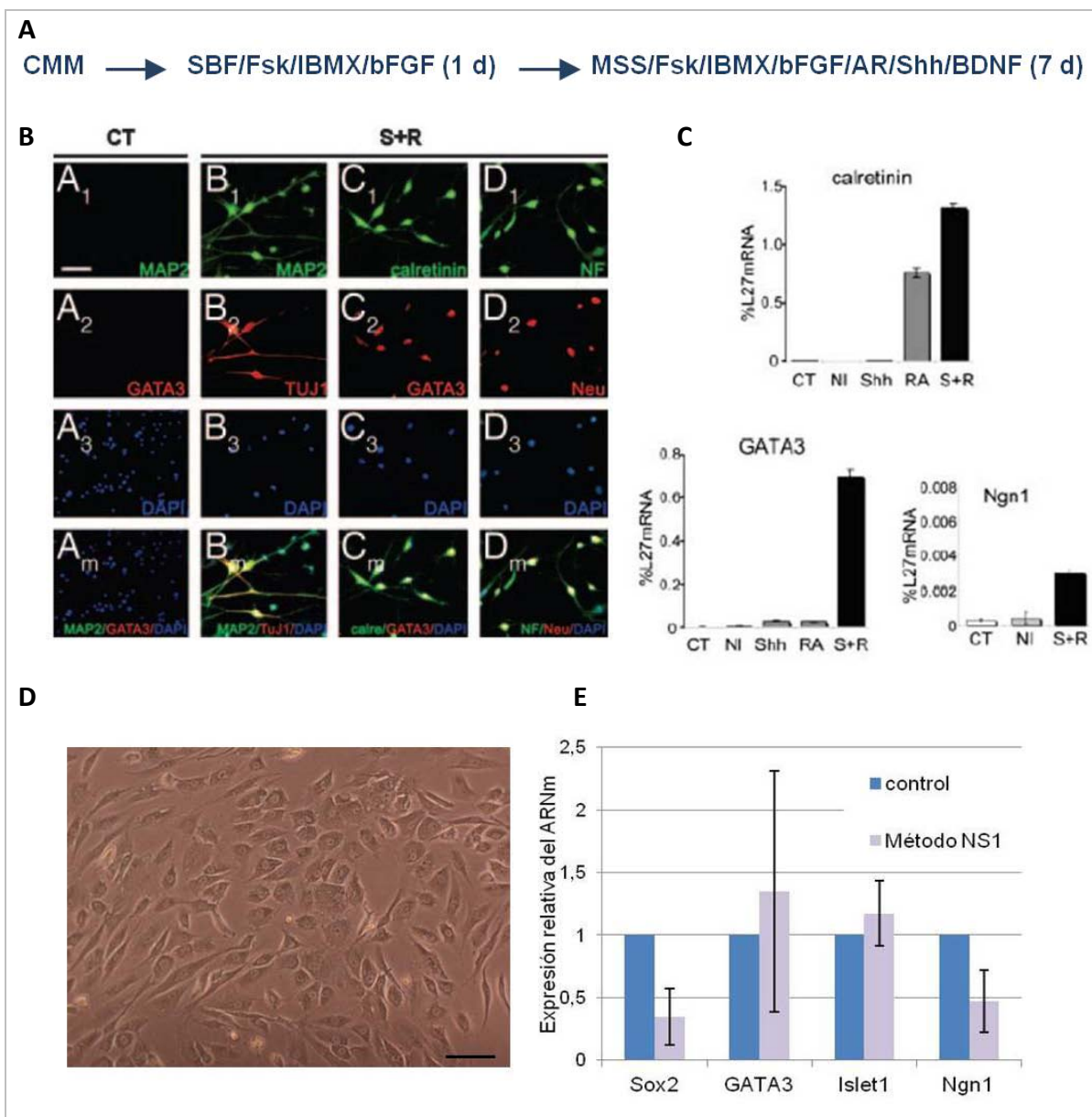


Figura R12. Método de diferenciación hacia neuronas sensoriales auditivas NSA1. (A) Esquema del método de diferenciación NSA1, descrito en Kondo y cols., 2005. (B-C) Imágenes tomadas de Kondo y cols., 2005, donde CT corresponde a cultivos control de CMM de ratón, mientras que S+R son cultivos tratados según el método descrito en (A). (B) Detección mediante ICC de la expresión de marcadores de neuronas y neuronas sensoriales en CMM de ratón tras el protocolo indicado en (A). (C) Análisis mediante qPCR de la expresión relativa de genes típicos de neuronas sensoriales en CMM de ratón tratadas según se indica en (A). (D) Foto de un cultivo de CMMh tratado con el método NSA1, en la que se observa cómo las células se han llenado de vacuolas y evidencian una posible toxicidad del medio de cultivo para las CMMh. (E) Análisis mediante qPCR de la expresión relativa de genes típicos de neuronas sensoriales en cultivos derivados de CMMh. Se representan las medias y las barras de error con el error típico de la media. N= 3. Barras de escala: 100 μ m.

AR: ácido retinoico; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; CMM: células madre mesenquimales; CMMh: CMM humanas; d: día; DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; Fsk: forskolina; IBMX: isobutilmetilxantina; ICC: inmunocitoquímica; MSS: medio sin suero; qPCR: PCR cuantitativa; SBF: suero bovino fetal; Shh: Sonic hedgehog.

1.5.1.2 Método NSA2

Se diseñaron variaciones del protocolo tomado de Kondo y cols., 2005 (o NSA1), de modo que se cambió el primer paso de “preinducción” por la generación de PN mediante el tratamiento con β ME y AR en presencia de SBF. Los PN se trataron después con el medio de diferenciación empleado por Kondo y cols., (2005) pero sólo durante 3 días para luego pasar a un MSS con bFGF y factores neurotróficos, NT3 y BDNF (Figura R13A), importantes en la regulación de la diferenciación y supervivencia de las NSA (Nicholl y cols., 2005; Ramekers y cols., 2012). En estas condiciones se detectó en los cultivos un aumento significativo en los niveles transcripcionales de Sox2, Islet1 y Ngn1 (Figura R13B). A nivel de proteína, en algunas células se vio la expresión de las proteínas neurales NF200 (presente en el citoesqueleto de neuronas) y Calretinina (presente en NSA, Dechesne y cols., 1994) (Figura R13C).

1.5.1.3 Método NSA3

El protocolo NSA3 se modificó eliminando el IBMX y la forskolina del medio empleado en el primer paso de diferenciación de los PN del método NSA2 y añadiendo ya en este primer paso los factores neurotróficos, introduciendo después un paso intermedio con bFGF para la inducción de un fenotipo ótico (esquema en figura R14A). De este modo, se consiguió, además de un aumento de la expresión de Sox2, Islet1 y Ngn1, un aumento significativo de Gata3 (Figura R14B). Los análisis por ICC también detectaron proteínas como NF200, que fue positivo en el $3,24 \pm 0,68$ % de las células, y el marcador sensorial Calretinina en el $3,63 \pm 2,27$ % de las células (Figura R14C y D).

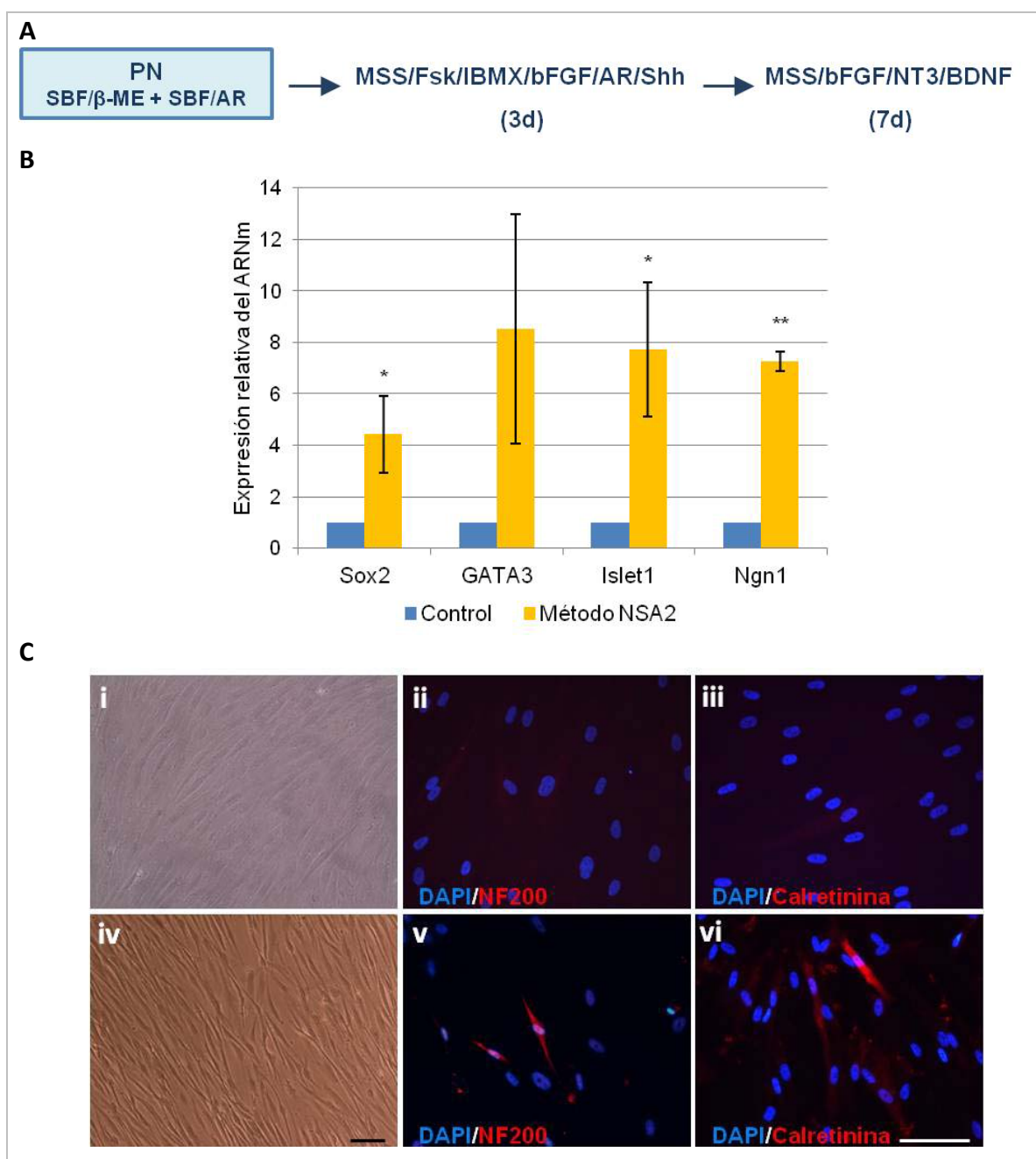


Figura R13. Método de diferenciación hacia neuronas sensoriales auditivas NSA2. (A) Esquema del protocolo de diferenciación NSA2. (B) El análisis mediante qPCR indicó un aumento de la expresión relativa de ARNm de los genes Sox2, Islet1 y Ngn1. Los niveles de expresión de Gata3 fueron muy variables en los cultivos tratados de modo que el aumento de expresión no fue estadísticamente significativo. Se representan las medias y barras con el error típico de la media. N= 4. Test T de Student *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$. (C) Cultivos control de PN derivados de CMMh (i, ii y iii) comparados con cultivos de PN tratados como se indica en A (iv, v y vi). En las fotografías (i) y (iv) se puede ver que el tratamiento NSA2 provoca un cambio de morfología en las células, haciéndolas más alargadas. Ocasionalmente se observaron células que expresaban las proteínas NF200 y Calretinina (v y vi). Núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala: 100 μ m.

AR: ácido retinoico; β ME: β -mercaptoetanol; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; CMMh: células madre mesenquimales (humanas); d: día; DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; EGF: factor de crecimiento epidérmico; Fsk: forskolina; IBMX: isobutilmetilxantina; MSS: medio sin suero; NT3: Neurotrofina 3; PN: progenitor neural; qPCR: PCR cuantitativa; SBF: suero bovino fetal.

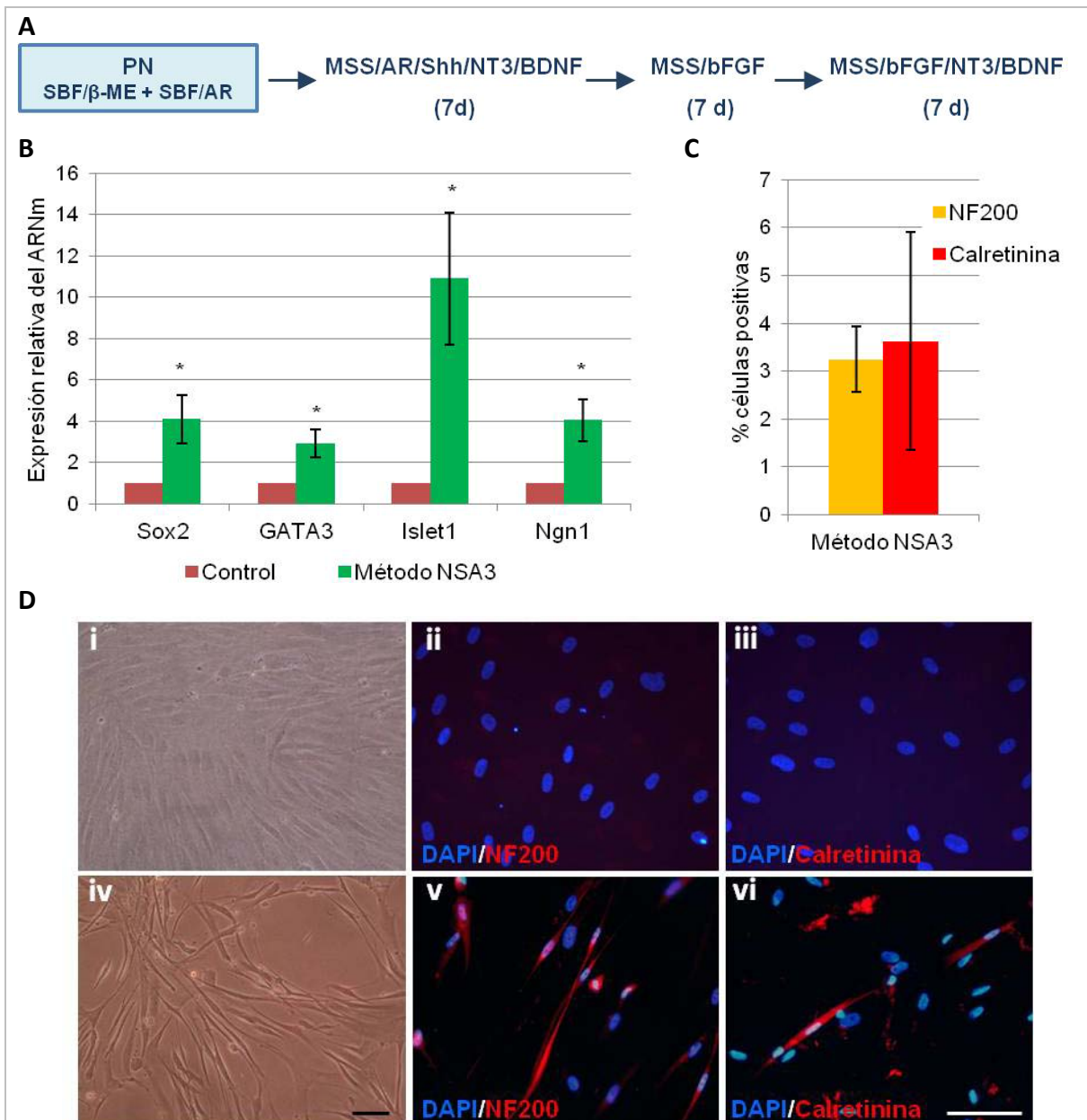


Figura R14. Método de diferenciación hacia neuronas sensoriales auditivas NSA3.

(A) Esquema del protocolo de diferenciación NSA3. **(B)** Los resultados de las qPCR mostraron un aumento de la expresión de ARNm de todos los genes analizados: Sox2, Islet1, Ngn1 y Gata3. Se representan las medias y barras con el error típico de la media. N= 5. Test T de Student *: $p < 0,05$. **(C)** Porcentaje de células de los cultivos tratados que expresan las proteínas NF200 y Calretinina según las tinciones mediante ICC. Se representan las medias y barras de error con el error típico de la media. N=3. **(D)** Cultivos control de PN derivados de CMMh (i, ii y iii) comparados con cultivos de PN tratados con el método NSA3 (iv, v y vi). En iv se observa un cambio de morfología en las células, que están más alargadas. Se detectó la expresión de NF200 y Calretinina en los cultivos tratados (v y vi, respectivamente). Nucleos teñidos con DAPI. Barra de escala: 100 μ m.

AR: ácido retinoico; β ME: β -mercaptoetanol; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; CMMh: células madre mesenquimales humanas; d: día; DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; EGF: factor de crecimiento epidérmico; ICC: inmunocitoquímica; MSS: medio sin suero; NT3: Neurotrofina 3; PN: progenitor neural; qPCR: PCR cuantitativa; SBF: suero bovino fetal; Shh: Sonic hedgehog.

1.5.1.4 Método NSA4

En otra serie de experimentos, se emplearon PN generados al cultivar las CMMh en condiciones no adherentes en presencia de SFB y AR. Una vez adheridas a platos de cultivo, las células se trataron con bFGF, para promover un fenotipo óptico en los PN (Oshima y cols., 2010) y seguidamente con Shh, bFGF, BDNF y NT3, siguiendo el protocolo descrito por Chen y cols. (2009) (esquema en figura R15A). En Chen y cols., (2009) se emplea esta combinación de factores para diferenciar progenitores ópticos derivados de cócleas fetales humanas (Chen y cols., 2007). Así, nos basamos en una metodología ya descrita para diferenciar células humanas, en contraposición a protocolos empleados con células murinas, que no parecen ser igualmente efectivos en las células humanas. En este caso los análisis de expresión génica por qPCR demostraron un aumento significativo en la transcripción de Sox2, GATA3 y Ngn1, pero no de Islet1 ($p=0,2$) (Figura R15B). La diferenciación neural quedó confirmada por las tinciones ICC: el $5,64 \pm 1,79$ % de las células fueron positivas para NF-200, mientras que el $3,63 \pm 0,60$ % de las células lo fueron para Calretinina (Figura R15C y D).

En los experimentos de diferenciación a NSA se analizó también la expresión del marcador neuronal temprano β -III-Tubulina. Su expresión no fue tomada en cuenta para determinar el grado de diferenciación de las CMMh sometidas a los distintos tratamientos (NSA2, 3 y 4) ya que, de acuerdo con algunas publicaciones (Tondreau y cols., 2004; Hermann y cols., 2006) la proteína fue detectada en los cultivos control de CMMh (Figura R16A).

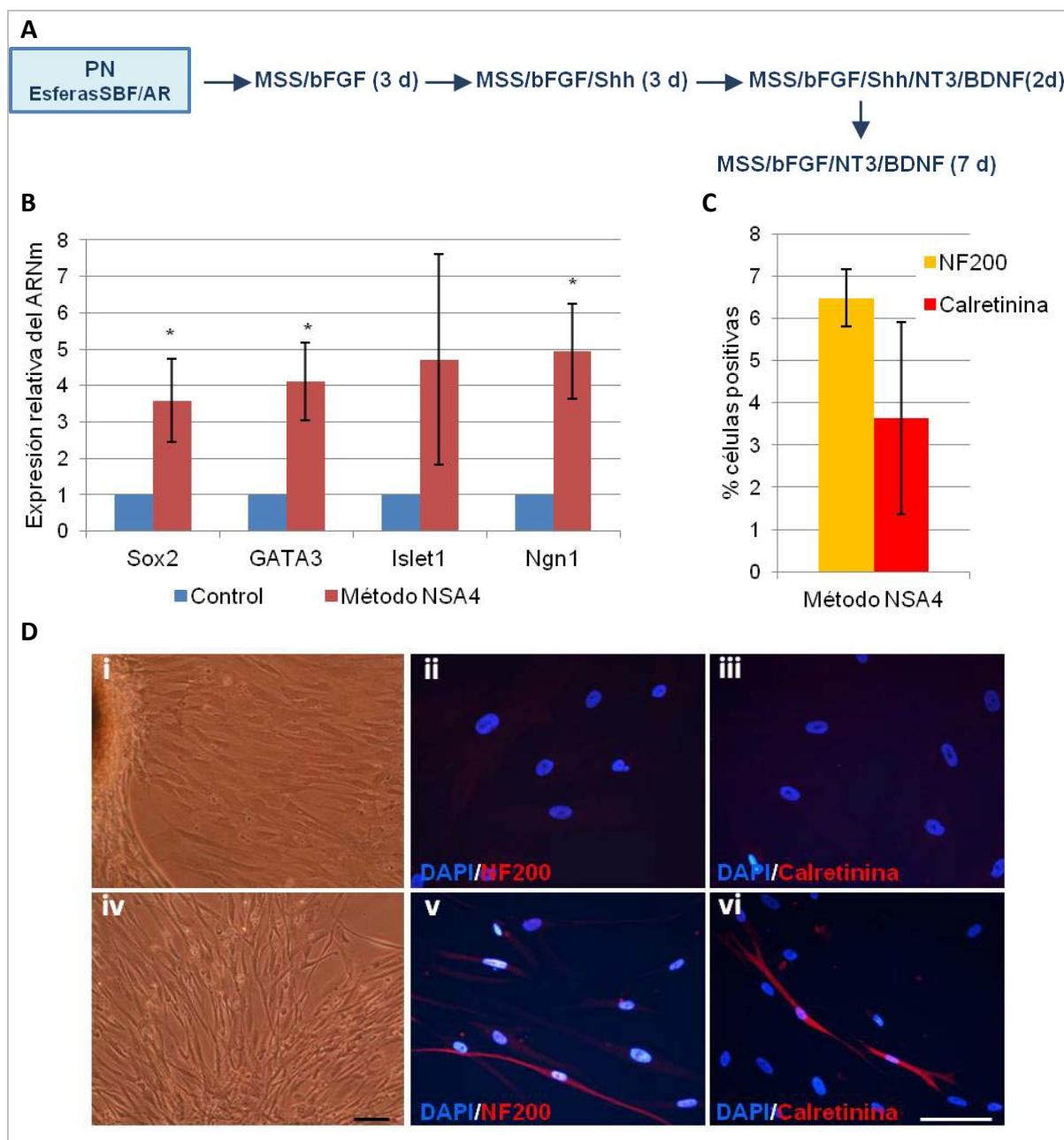


Figura R15. Método de diferenciación hacia neuronas sensoriales auditivas NSA4. (A) Esquema del protocolo de diferenciación NSA4. **(B)** Los análisis de qPCR mostraron un aumento en la expresión relativa del ARNm de los genes Sox2, Ngn1 y Gata3. El aumento de expresión de Islet1 no fue significativo. Se representan las medias y barras de error con el error típico de la media. N=5. Test T de Student *: $p < 0,05$. **(C)** Según los análisis por ICC se determinó el porcentaje de células que expresaron las proteínas NF200 y Calretinina en los cultivos tratados con el método NSA4. Se representan las medias y barras con el error típico de la media. N=3. **(D)** Cultivos control de PN derivados de CMMh (i, ii y iii) comparados con cultivos de PN tratados con el método NSA4. i y iv son fotografías representativas de los cultivos. Además de un cambio en la morfología de la células, se observó la expresión de NF200 y Calretinina en los cultivos tratados (v y vi, respectivamente). Núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala: 100 μ m.

AR: ácido retinoico; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; CMMh: células madre mesenquimales humanas; d: día; DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; ICC: inmunocitoquímica; MSS: medio sin suero; NT3: Neurotrofina 3; PN: progenitor neural; qPCR: PCR cuantitativa; SBF: suero bovino fetal; Shh: Sonic hedgehog.

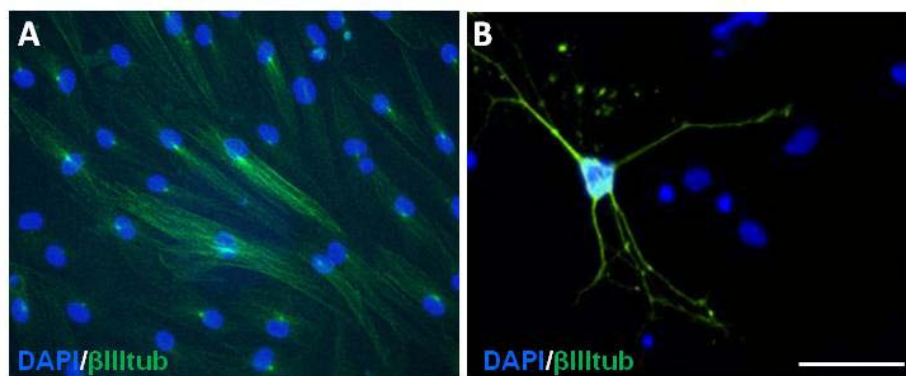


Figura R16. Expresión de la proteína β -III-tubulina en cultivos de CMMh crecidas en presencia de 20% SBF. Esta proteína del citoesqueleto, considerada un marcador de desarrollo neural temprano, tiene una elevada expresión basal en los cultivos control de CMMh (A). En la fotografía (B) se observa una célula positiva para β -III-tubulina en un cultivo de células del epitelio sensorial del oído de un embrión de ratón E14, demostrando que el anticuerpo empleado era específico. Barra de escala: 100 μ m. Núcleos teñidos en azul con DAPI.

CMMh: células madre mesenquimales humanas. DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; SBF: suero bovino fetal.

1.5.2 Inducción mediante cocultivo con explantes cocleares: método NSA5

Finalmente, otro grupo de experimentos consistió en cocultivar PN derivados de CMMh, concretamente esferas formadas en MSS/EGF/bFGF, con explantes cocleares de ratones neonatos, siguiendo un protocolo similar al empleado en Coleman y cols. (2007) con CME (Figura R17A). La diferenciación neuronal fue determinada por la tinción ICC para NF200 y la contratinción con HuNu para diferenciar las células humanas de las procedentes del explante. Después de 2 semanas en cultivo, se observaron algunas células humanas (HuNu positivas) que expresaban la proteína NF200 (Figura R17Biv).

Los resultados de los experimentos NSA2-NSA5, en conjunto, parecen indicar que es posible inducir la expresión de marcadores neuronales y sensoriales en CMMh tratadas en condiciones concretas.

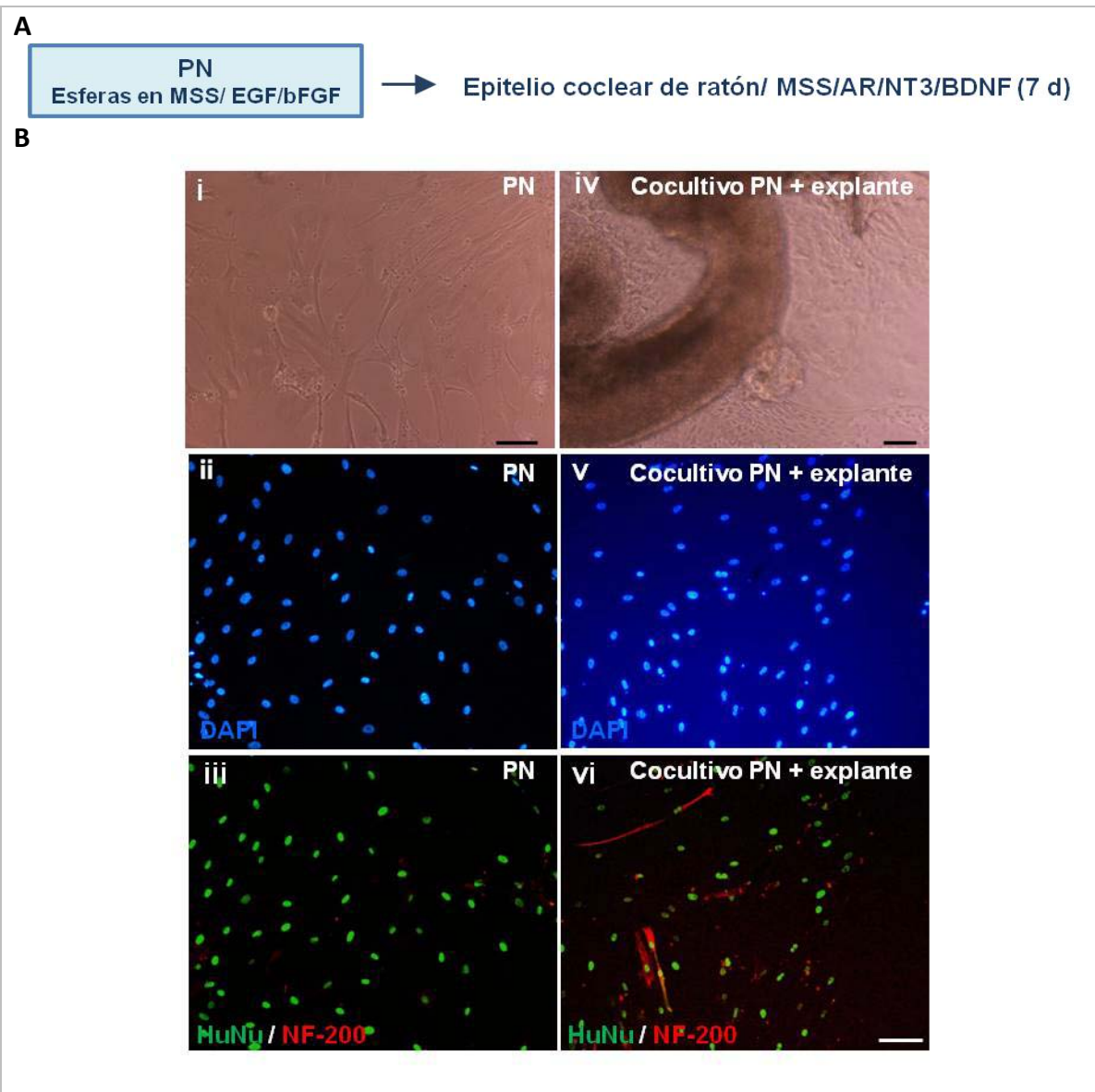


Figura R17. Método de diferenciación hacia neuronas sensoriales auditivas NSA5: cocultivo de PN con explantes de cócleas de ratón neonato. (A) Esquema que resume el protocolo empleado en este método de diferenciación. **(B)** Las imágenes i, ii y iii muestran el cultivo de PN en MSS suplementado con AR, BDNF y NT3. En iv, v y vi, las mismas células se han cocultivado con un explante de epitelio coclear de ratón neonato, (mostrado en iv). Sólo en los cocultivos se detectó expresión de NF200 en células derivadas de CMMh (vi). Los núcleos humanos se identificaron utilizando un anticuerpo para el antígeno nuclear HuNu. Núcleos teñidos en azul con DAPI. Barra de escala: 100 μ m, excepto en i y iv: 200 μ m.

AR: ácido retinoico; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; CMMh: células madre mesenquimales humanas; d: día; EGF: factor de crecimiento epidérmico; MSS: medio sin suero; NT3: Neurotrofina 3; PN: progenitor neural SBF: suero bovino fetal.

2. ESTUDIOS DE REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS HACIA CC

2.1 Reprogramación directa de fibroblastos mediante transfección con factores clave en la formación de las CC

La reprogramación directa consiste en obtener una célula madura especializada a partir de otra célula madura sin necesidad de pasar por un estado de pluripotencia (Chambers y Studer, 2011; Kelaini y cols., 2014). La reprogramación directa se puede conseguir mediante la transfección de factores de transcripción. Unos o varios factores de transcripción pueden ser suficientes para conseguir que una célula somática madura se transforme en otra de distinto linaje celular (Ieda 2013). Para ello es necesario identificar qué factores pueden ser claves para la formación del tipo celular que queremos obtener. Nuestro objetivo era obtener células similares a las CC del oído interno partiendo de fibroblastos.

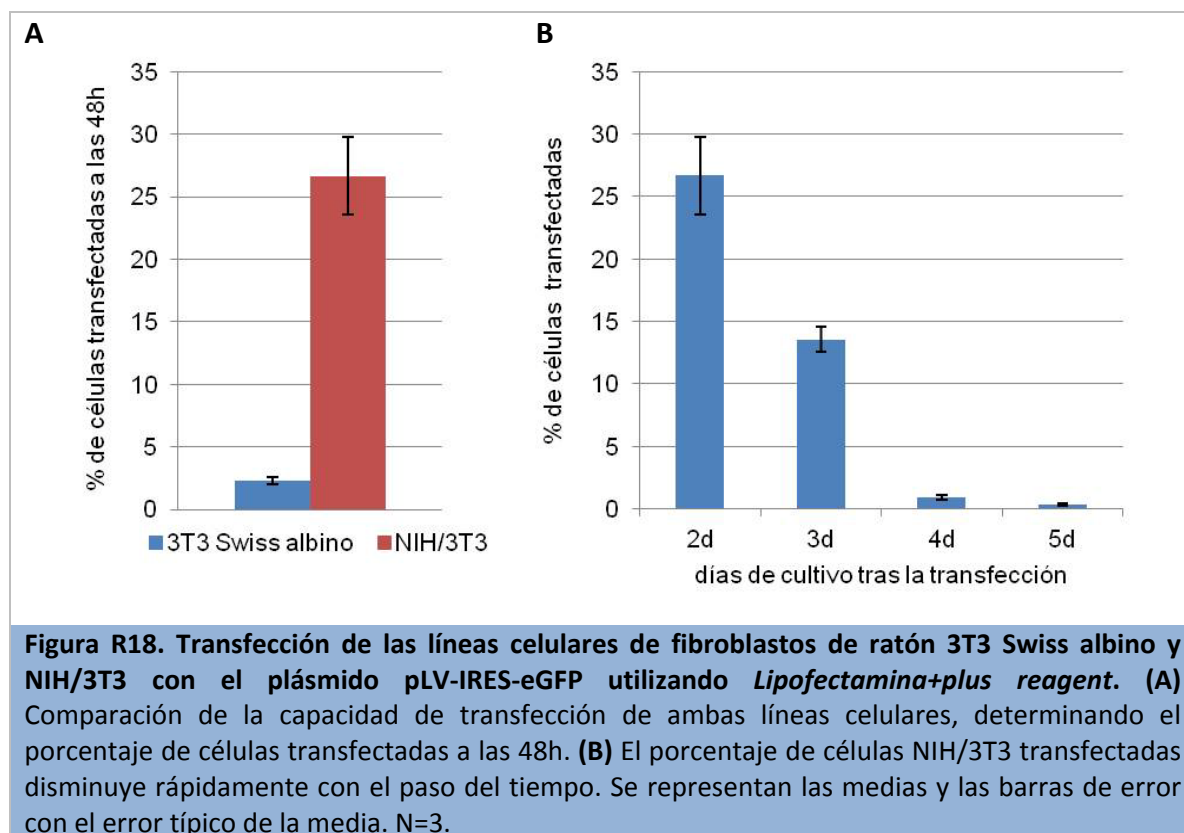
Antes de determinar qué factores podrían ser los adecuados, establecimos la eficiencia de los métodos de transfección y qué tipo de fibroblastos de los disponibles en el laboratorio eran los más adecuados para los experimentos iniciales de transdiferenciación.

2.1.1 Ensayos preliminares de transfección

En el laboratorio contábamos con cultivos primarios de fibroblastos humanos y con dos líneas comerciales de fibroblastos embrionarios de ratón: NIH/3T3 (número ATCC: CRL-1658) y 3T3 Swiss albino (número ATCC: CCL-92). Para los ensayos preliminares de transfección se empleó un vector de expresión de GFP para poder detectar fácilmente las células transfectadas. Al igual que ocurrió con las CMMh, los fibroblastos primarios humanos adultos fueron muy difíciles de transfectar. Empleando compuestos que incluyen el ADN en liposomas, como *Lipofectamine LTX + PLUS Reagent*, no se observaron células transfectadas. En cuanto a la electroporación, se probaron diversas condiciones (Tamura y cols., 1998; Jordan y cols., 2008) pero en todos los casos la mortalidad fue muy alta. El porcentaje de células electroporadas a las 48 h del procedimiento en la mejor de las condiciones probadas (320 V y 500 μ F, Tamura y cols., 1998) fue del $11,73 \pm 2,64$ % de las células supervivientes.

Las líneas celulares de fibroblastos de ratón (3T3 Swiss albino y NIH/3T3) presentaron grandes diferencias entre ellas en cuanto a la capacidad de introducir ADN exógeno (Copeland y Cooper, 1979). Transfectando el vector pLV-IRES-eGFP con *Lipofectamine LTX + PLUS reagent*, el porcentaje de células GFP positivas 48h después de la transfección fue de $2,32 \pm 0,27$ % en la línea 3T3 Swiss albino, mientras que en la línea NIH/3T3 fue de $26,67 \pm 3,08$ % (figura R18A). La transfección a través de liposomas es transitoria, y este hecho junto a la elevada tasa de división de estas líneas celulares hizo que el porcentaje

de células transfectadas fuera disminuyendo rápidamente con el tiempo. Para la línea NIH/3T3 el porcentaje de células transfectadas fue del $13,55 \pm 1,02$ % a los 3 días, $0,89 \pm 0,20$ % a los 4 días y $0,35 \pm 0,10$ % a los 5 días (figura R18B).



2.1.2 Transfección con factores de transcripción en NIH/3T3

Debido a que la línea de fibroblastos de ratón NIH/3T3 fue la que mejor se transfectó, se utilizaron estas células para llevar a cabo los estudios de transfección con factores clave para estudiar el efecto en la expresión de marcadores que indican la transdiferenciación hacia CC del oído interno.

Los cultivos de NIH/3T3 se transfectaron con distintos vectores empleando *Lipofectamine LTX + PLUS reagent*. El día siguiente a la transfección y para facilitar la diferenciación, se cambió el medio de cultivo por un medio con baja concentración de FBS (1%) y 1% de N2. Los cultivos se analizaron 3 días después para estudiar cómo había afectado la sobreexpresión de estos genes a los niveles endógenos de expresión de ARNm de genes implicados en la formación y diferenciación de las CC.

2.1.2.1 Transfección con Atoh1 y Sox2

Como se ha explicado anteriormente, Sox2 es necesario para el desarrollo del dominio neurosensorial del oído y para especificar los precursores de las CC y CS (Kiernan y cols., 2005b; Neves y cols., 2012) mientras que Atoh1 parece ser esencial para que los precursores se diferencien a CC (Birmingham y cols., 1999; Chen y cols., 2002). Por tanto, cultivos de NIH/3T3 se transfectaron con vectores de expresión de Sox2, Atoh1 o ambos (Fig. R19A) y se estudió la expresión endógena de Sox2, Atoh1, Miosina7a y Brn3c (Fig R19B).

La transfección con Sox2 o Atoh1 individualmente no aumentó la expresión de ninguno de los marcadores analizados. Al contrario, la sobreexpresión de Atoh1 disminuyó la expresión endógena de Sox2, Atoh1 y Miosina7a, mientras que la sobreexpresión de Sox2 inhibió la expresión endógena de Atoh1 (Figura R19B). Sin embargo, la combinación de ambos plásmidos (Atoh1 + Sox2) consiguió un aumento significativo en la expresión del ARNm de Sox2, Atoh1 y Brn3c, mientras que la de Miosina7a no cambió (Figura R19B). A nivel de proteína tampoco se detectó Miosina7a (Figura R19C).

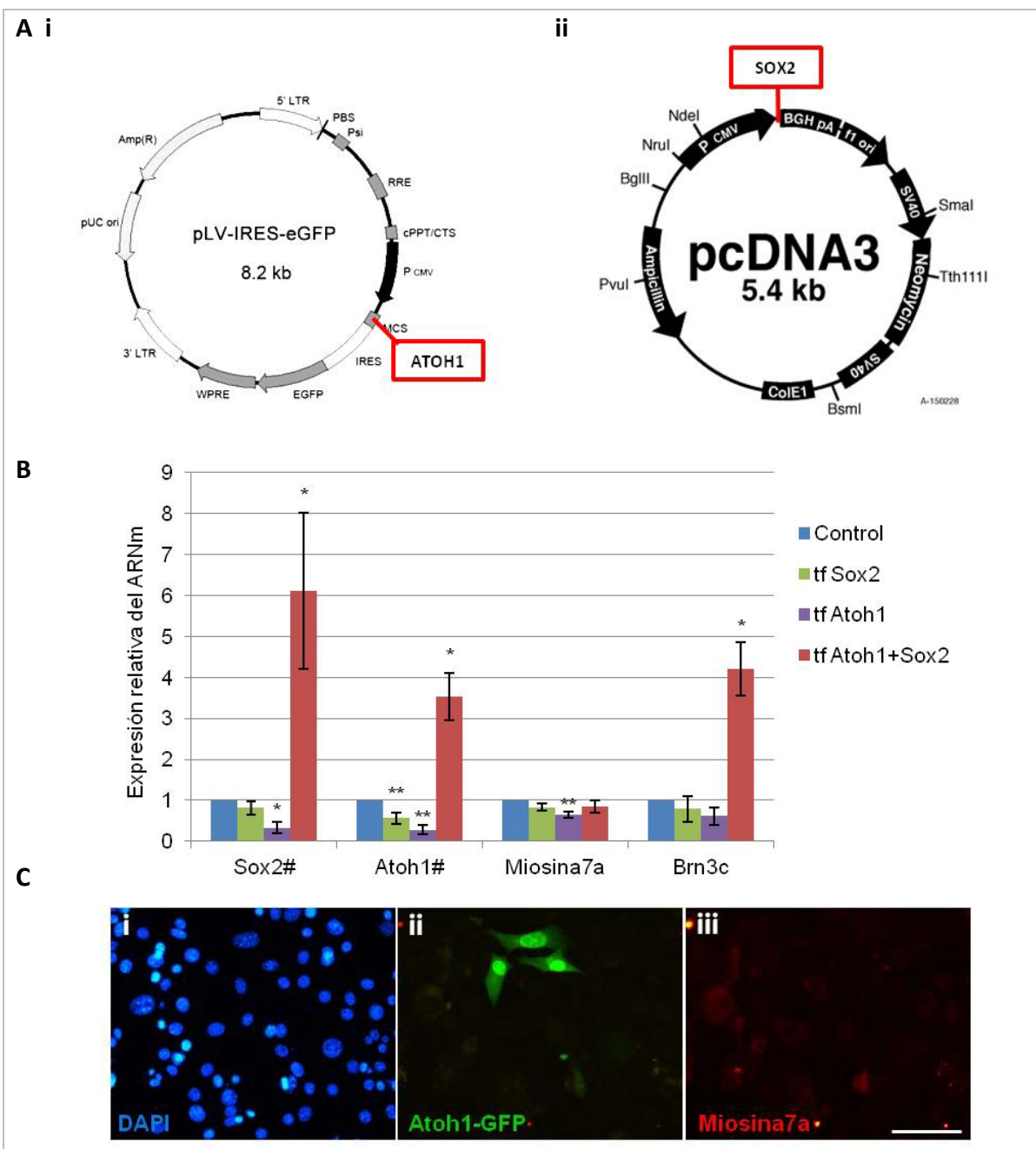
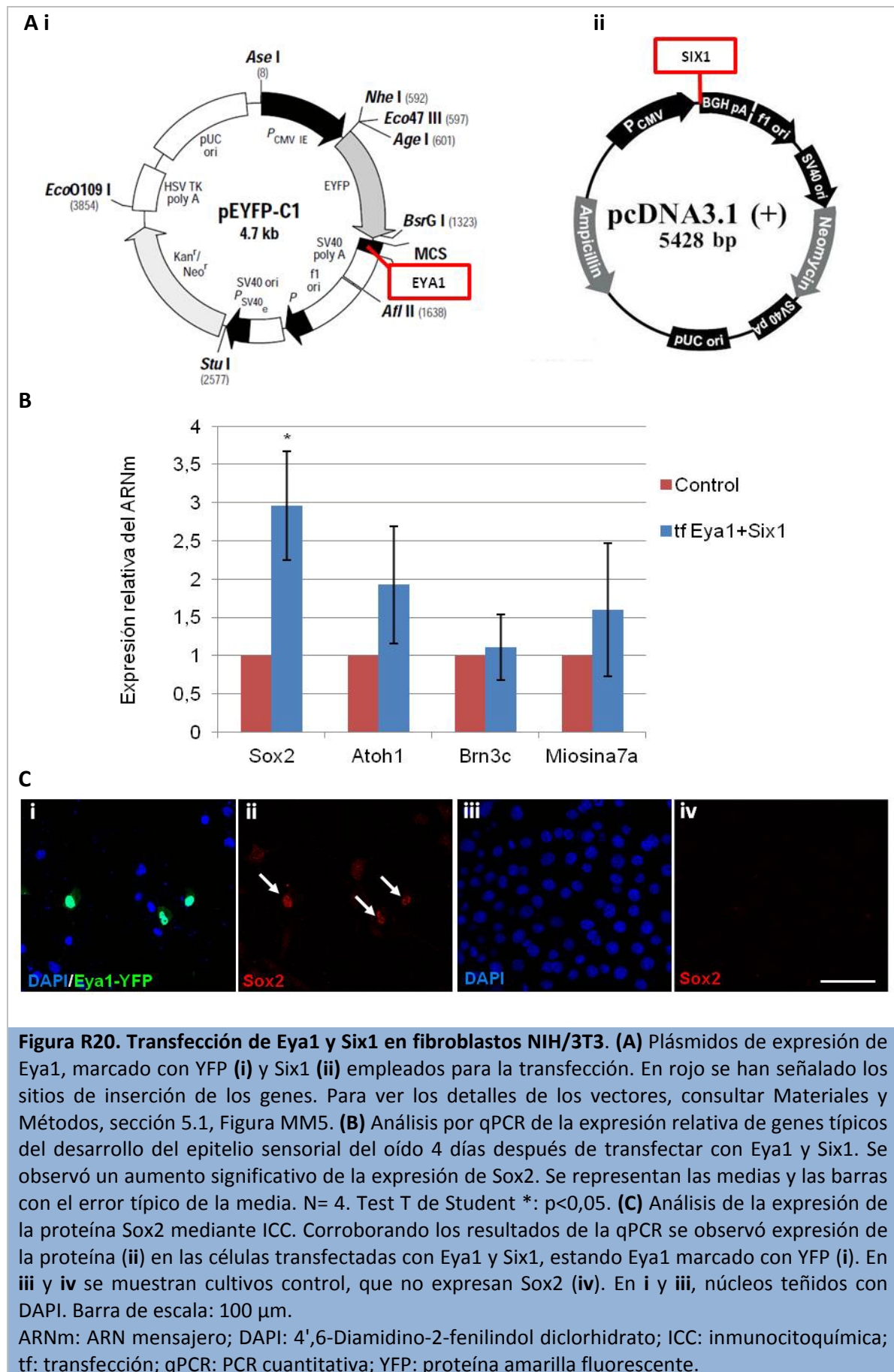


Figura R19. Efectos de la transfección de Atoh1, Sox2 y Atoh1+Sox2 en fibroblastos de ratón NIH/3T3. (A) Plásmidos de expresión de Atoh1 con GFP, (i) y Sox2 (ii) empleados para la transfección. Se ha marcado en rojo el lugar del inserto. Más detalles de los plásmidos están descritos en Materiales y Métodos en la sección 5.1, Figura MM5. **(B)** Análisis por qPCR de la expresión relativa de Sox2 y genes típicos de las CC 4 días después de transfectar con Sox2, Atoh1 o ambos. Se observó un aumento de la expresión de Sox2, Atoh1 y Brn3c en las células transfectadas con Sox2+Atoh1. Sox2 indujo una disminución en la expresión endógena de Atoh1 mientras que la sobreexpresión de Atoh1 disminuyó la expresión endógena de Sox2, Atoh1 y Miosina7a. Se representan las medias y barras con el error típico de la media. N= 5. Test T de Student *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. **(C)** De acuerdo con la qPCR, no se detectó mediante ICC la expresión de Miosina7a (iii) en los cultivos transfectados con Atoh1+Sox2 (ii). En (i), núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala: 100 μm . #: en la qPCR se utilizaron cebadores específicos para detectar sólo la expresión endógena del ARNm de Atoh1 y Sox2; ARNm: ARN mensajero; ICC: inmunocitoquímica; GFP: proteína verde fluorescente; tf: transfección; qPCR: PCR cuantitativa.

2.1.2.2 Transfección con Eya1 y Six1

Hay otros genes que intervienen en la especificación del dominio neurosensorial y la diferenciación de las células progenitoras hacia CC. Eya1 y Six1 son dos proteínas que interaccionan entre sí y cuyos genes se expresan durante el desarrollo del oído interno. Además, estudios en mutantes condicionales para Eya1 o Six1 indican que ambos genes son necesarios para el desarrollo de las CC y la expresión de Atoh1 *in vivo* (Wong y cols., 2013).

Según el trabajo de Ahmed y cols. (2012a), la expresión de Eya1 y Six1 es suficiente para inducir CC ectópicas en células no sensoriales del epitelio auditivo, aunque ello requiere la expresión endógena de Sox2 en esas células. Sin embargo, en las células NIH/3T3, que no expresan Sox2, la transfección con vectores que llevan Eya1 y Six1 (Fig R20A) no indujo la expresión de ningún marcador de CC (Atoh1, Brn3c, Miosina7a), sino que precisamente aumentó la transcripción de Sox2 (Figura R20B) y la expresión de la proteína Sox2 en el $53,57 \pm 3,57\%$ de las células transfectadas al menos con Eya1 (marcado con YFP, Figura R20C).



2.2 Obtención de PN a partir de fibroblastos mediante factores de crecimiento

Otros métodos de reprogramación están basados en el cultivo de las células en presencia de determinados factores de crecimiento (Page y cols., 2009; Greene y cols., 2014). Del mismo modo que con las CMMh, se consideró emplear factores de crecimiento para generar PN a partir de los fibroblastos, para posteriormente poder continuar la diferenciación hacia CC.

Los fibroblastos dérmicos humanos han demostrado tener características similares a CMMh, tanto en la expresión de antígenos de superficie como en su potencial de diferenciación hacia condrocitos, adipocitos y osteocitos (Lorenz y cols., 2008; Brohem y cols., 2013) y capacidad inmunorreguladora (Hanniffa y cols., 2007). Por lo tanto, la metodología utilizada para obtener un PN en las CMMh (Materiales y Métodos, 1.3.1.1) podría tener el mismo efecto en los cultivos de fibroblastos humanos.

Se estudió la expresión de los genes de PN Sox2 y Nestina, así como el marcador de pluripotencia Oct4 (Figuras R21Bi y ii), a nivel de ARNm, en dos tipos de cultivos no adherentes de fibroblastos: esferas en medio con SBF y AR, y en MSS suplementado con EGF y bFGF (figura R21A). Estos tratamientos no aumentaron la expresión de Sox2, aunque sí la expresión de Nestina. La expresión de Oct4 aumentó sólo en las esferas formadas en MSS en presencia de EGF y bFGF (figura R21Bii). La ausencia de Sox2, marcador tanto de pluripotencia como de linaje neural y óptico, indica que los fibroblastos humanos no forman PN en estas condiciones de cultivo, y por lo tanto, en este caso, no responden igual que las CMMh.

Las dos líneas de fibroblastos murinos también se trataron siguiendo estos procedimientos resumidos de la figura R21A. En estos casos tampoco se observó un aumento en la expresión de Sox2 dado que en la mayoría de los experimentos ni siquiera se detectó su expresión por qPCR en las esferas.

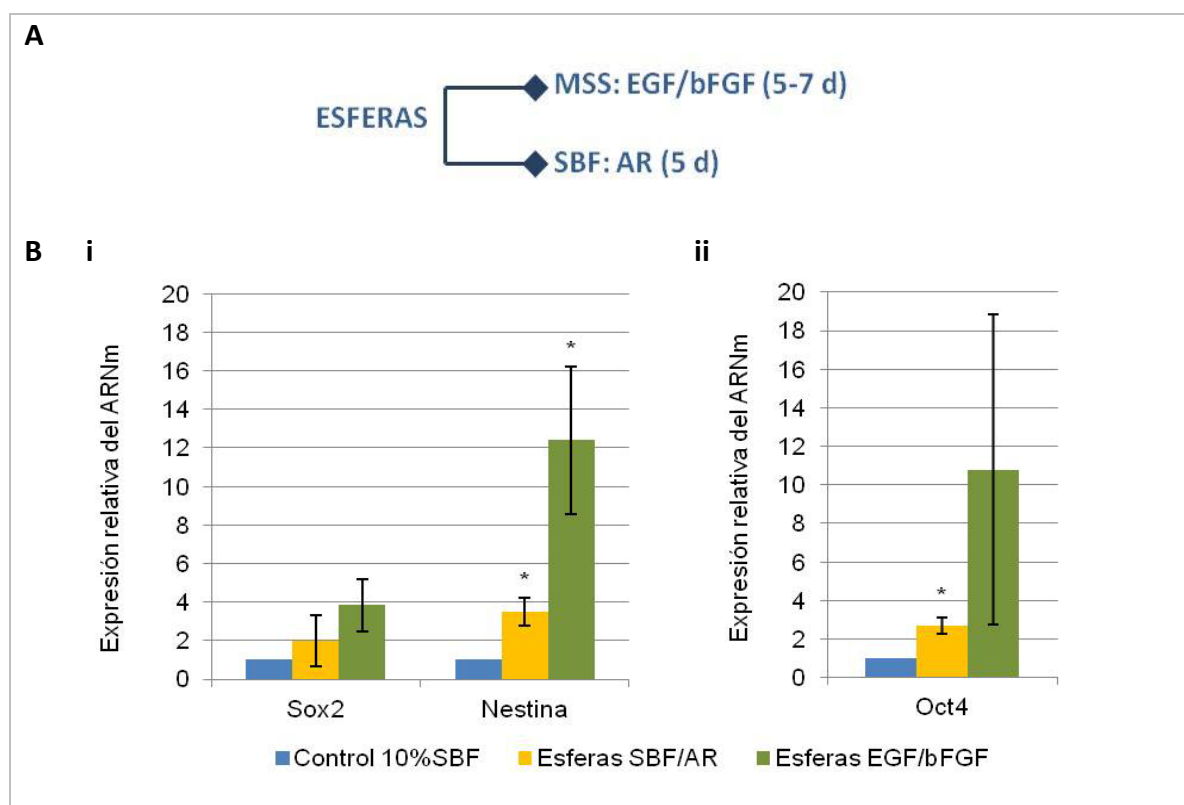


Figura R21. Inducción de la expresión de genes neurales y de pluripotencia en fibroblastos humanos después del tratamiento con factores que promueven la formación de PN a partir de CMMh (A) Esquema de los protocolos empleados para diferenciar los fibroblastos humanos. Son métodos similares a los empleados con las CMMh. (B) El estudio de expresión de los genes proneurales Sox2 y Nestina mediante qPCR muestra que estos tratamientos no indujeron la expresión de Sox2 en los fibroblastos humanos, aunque sí de Nestina en ambos tipos de esferas (i). Las esferas formadas en presencia de suero y AR además expresaban significativamente más Oct4 que el cultivo control (ii). Se representan las medias y las barras de error con el error típico de la media. Test T de Student *: $p < 0,05$. N= 5.

AR: ácido retinoico; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; CMMh: células madre mesenquimales humanas; d: día; EGF: factor de crecimiento epidérmico; MSS: medio sin suero; SBF: suero bovino fetal.

2.3 Reprogramación mediante inhibidores de la metilación del ADN: 5'aza-deoxicitidina.

La regulación epigenética de los genes interviene en el control de los mecanismos implicados en la diferenciación celular así como en el mantenimiento de estados indiferenciados de la célula. Uno de estos mecanismos epigenéticos es la metilación del ADN, cuya alteración puede modificar la conformación de la cromatina y por tanto cambiar el estado transcripcional de los genes. Existen compuestos químicos capaces de modificar este sistema, por ejemplo el 5'aza-deoxicitidina (5azadC), que actúa uniéndose a las metiltransferasas de ADN inhibiendo su efecto (Jaenisch y Bird, 2003). Aunque determinados niveles de 5azadC pueden resultar tóxicos para las células, a concentraciones no tóxicas, el 5azadC puede desmetilar secuencias reguladoras específicas de tejido, cuya metilación depende del tipo celular o del momento del desarrollo, favoreciendo la transcripción génica (Li, 2002; Ikegami y cols., 2009). En este trabajo, el objetivo fue estudiar el efecto del 5azadC en la expresión de genes de pluripotencia, como Sox2, Oct4, Nanog y Klf4 (Chambers y Tomlinson, 2009; Dutta 2013) y otros genes relacionados con el desarrollo del oído, en los cultivos de fibroblastos.

Fue importante determinar la concentración adecuada para conseguir reprogramar los fibroblastos, ya que el cultivo de fibroblastos en presencia de 10-15 μM 5azadC causó una gran mortalidad celular tanto en los cultivos de fibroblastos humanos (Figura R22) como en los murinos, por lo que se deduce que esta concentración tuvo un efecto tóxico. En las células supervivientes tampoco se observó la inducción de Sox2 a nivel de ARNm.

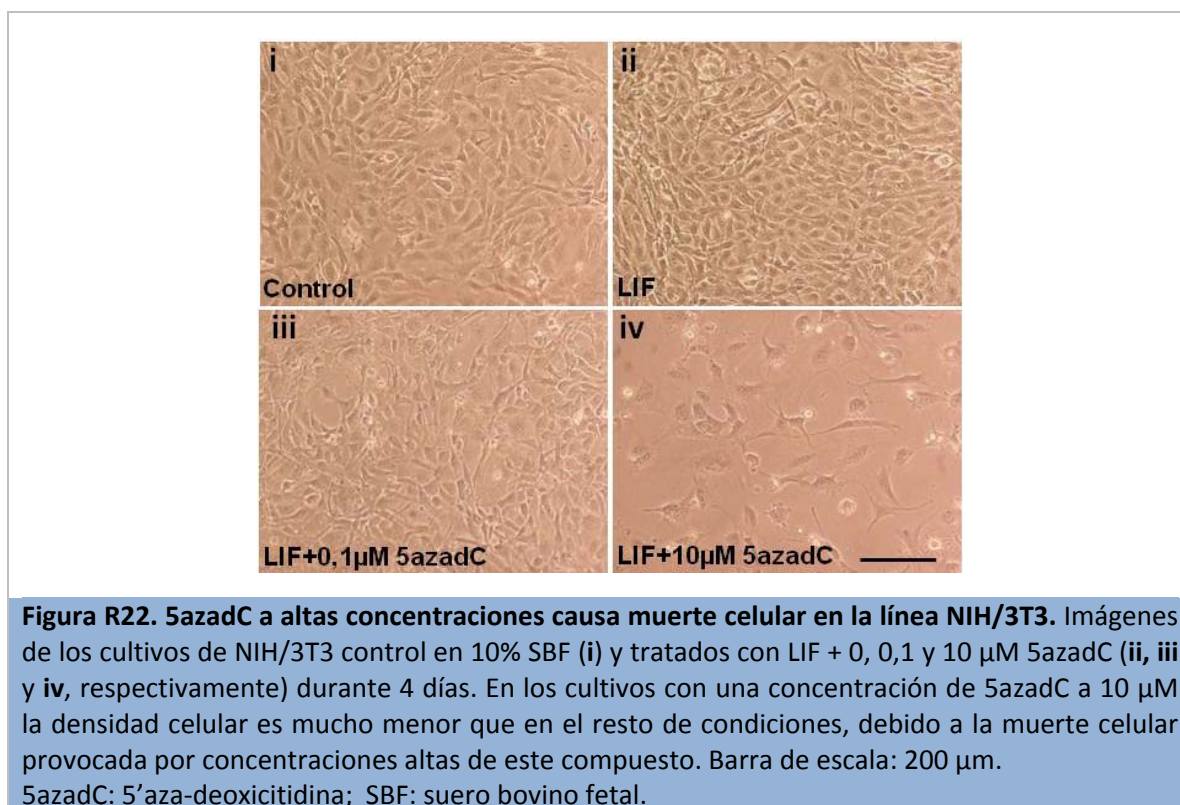


Figura R22. 5azadC a altas concentraciones causa muerte celular en la línea NIH/3T3. Imágenes de los cultivos de NIH/3T3 control en 10% SBF (i) y tratados con LIF + 0, 0,1 y 10 μM 5azadC (ii, iii y iv, respectivamente) durante 4 días. En los cultivos con una concentración de 5azadC a 10 μM la densidad celular es mucho menor que en el resto de condiciones, debido a la muerte celular provocada por concentraciones altas de este compuesto. Barra de escala: 200 μm . 5azadC: 5'aza-deoxicitidina; SBF: suero bovino fetal.

Basándonos en la literatura disponible y en la observación de Lim y cols. (2010) de que concentraciones bajas de 5azadC son óptimas para desmetilar las regiones génicas, sin desmetilar regiones repetitivas que podrían llevar a la muerte celular, cultivamos fibroblastos NIH/3T3 durante 4 días con 5azadC 0,1 μ M, en un medio típico de CME (15% SBF más 20 ng/ml LIF), como el empleado por Zhang y cols. (2010). El efecto fue el aumento significativo de la expresión de Sox2 y Oct4 a nivel de ARNm con respecto al control (Figura R23A). También se detectó un aumento de la expresión de Sox2 a nivel de proteína (Figura R23B). Sin embargo Klf4 y Nanog no se vieron afectados por el tratamiento con 5azadC (Figura R23A). Por otro lado, en presencia de 5azadC a 0,1 μ M los cultivos crecieron más lentamente que en el medio normal pero no se observó la llamativa muerte celular que sí fue provocada por las concentraciones más altas de 5azadC (figura R22).

También cuantificamos en estos cultivos la expresión de otros genes a nivel de ARNm: Nestina, como marcador de progenitores neurales (Mignone y cols., 2004) y Pax2, Pax8 y Gata3, como marcadores de progenitores óticos (Lawoko-Kerali y cols., 2002; Bouchard y cols., 2010). Todos los genes analizados, a excepción de Pax8, aumentaron su expresión de ARNm en los cultivos tratados con 5azadC y LIF de un modo estadísticamente significativo (Figura R24).

Además, se estudió si la desmetilación del ADN provocada por una baja concentración de 5azadC afectaba también a genes específicos de las CC. El cultivo con 5azadC aumentó la expresión a nivel de ARNm de Brn3c y Atoh1, mientras que provocó una disminución estadísticamente significativa de la expresión de Miosina7a (Figura R25).

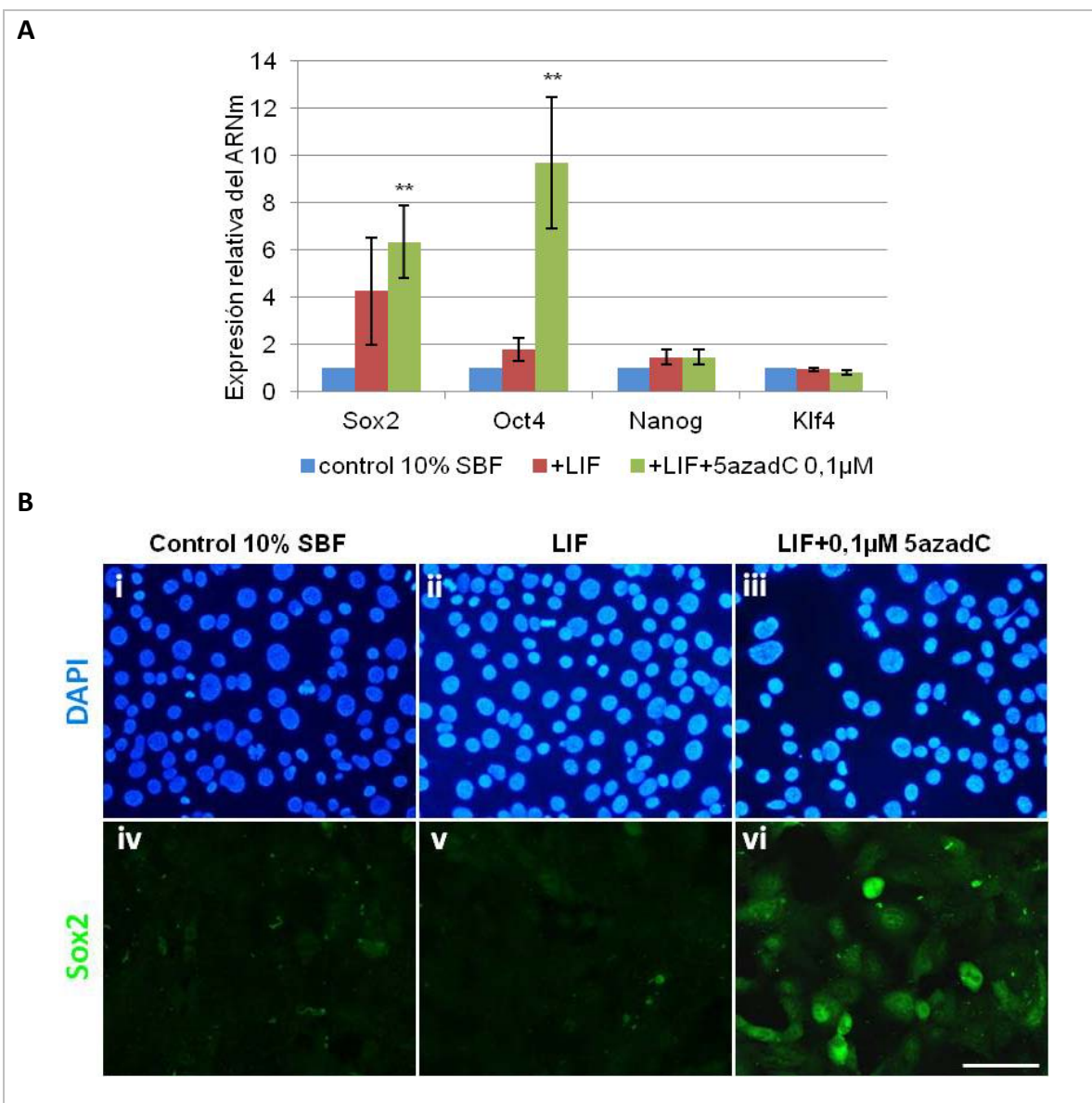
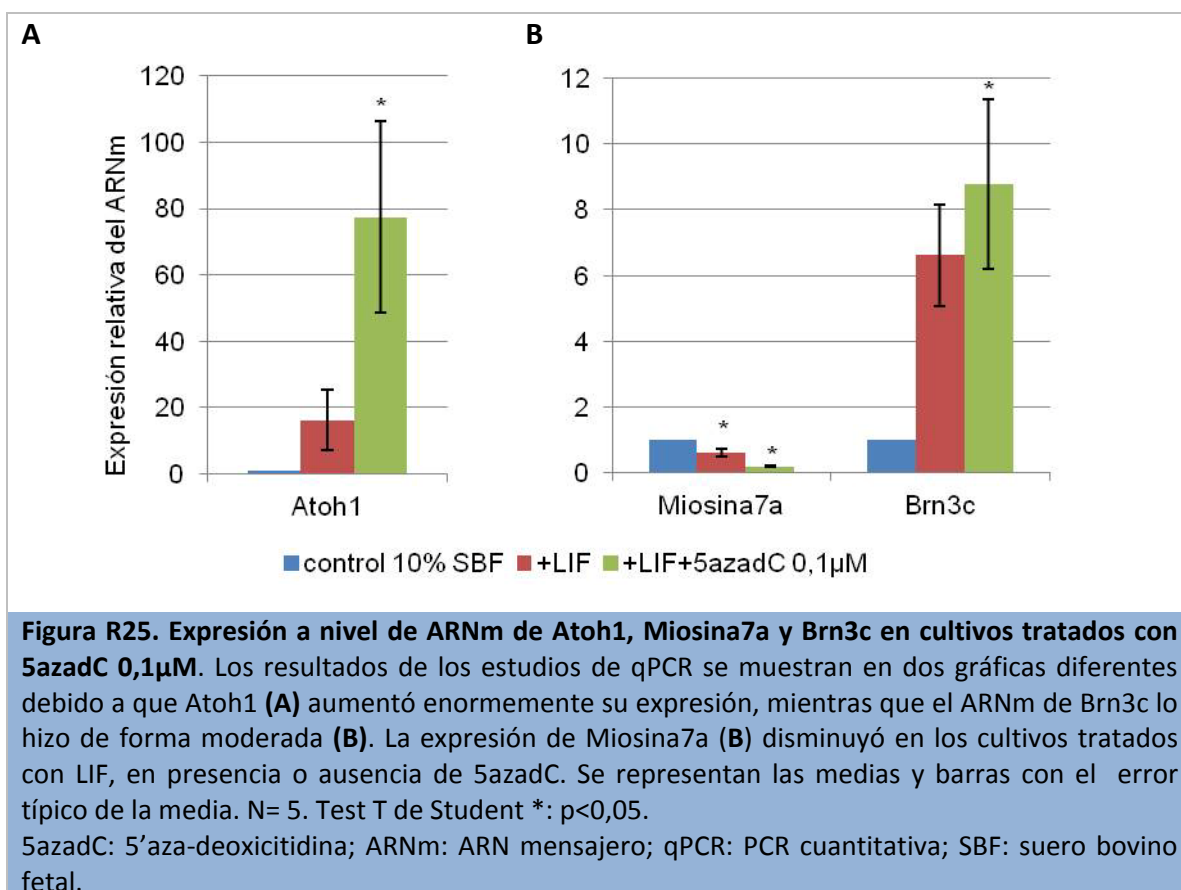
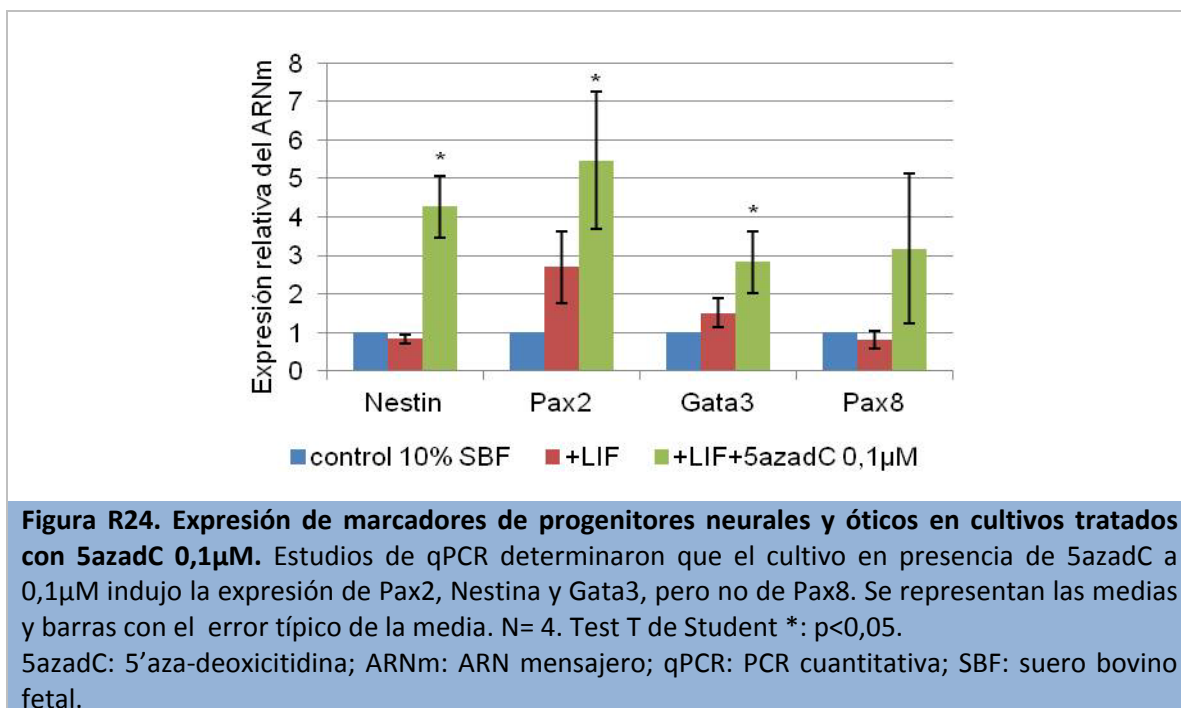


Figura R23. 5azadC a bajas concentraciones induce la expresión de los genes de pluripotencia Sox2 y Oct4 en la línea NIH/3T3. (A) Los análisis de qPCR mostraron un aumento en la expresión relativa del ARNm de los genes Sox2 y Oct4 en los cultivos tratados con 0,1 µM 5azadC. Nanog y Klf4, los otros genes relacionados con la pluripotencia analizados, no cambiaron su expresión en presencia de 5azadC. Se representan las medias y barras de error con el error típico de la media. N= 4-9. Test T de Student **: $p < 0,01$. **(B)** La expresión de Sox2 también aumenta a nivel de proteína en los cultivos tratados con 5azadC a 0,1 µM **(vi)** frente al control en 10%SBF **(iv)**, y al cultivo con LIF **(v)**. Barra de escala: 100 µm.

5azadC: 5'aza-deoxicitidina; ARNm: ARN mensajero; DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; ICC: inmunocitoquímica; qPCR: PCR cuantitativa; SBF: suero bovino fetal.



En resumen, el 5azadC a bajas concentraciones fue capaz de aumentar la expresión de genes de pluripotencia, así como de genes característicos de PN, progenitores óticos y de algunos marcadores de CC a nivel de ARNm (figuras R22, 24 y 25). Estos resultados indican que, tras el tratamiento con 5azadC 0,1 μ M, las células se encuentran en un estado parcialmente reprogramado en el que podrían ser capaces de responder a otros estímulos (Liu y cols., 2010). La adición de factores de crecimiento implicados en el desarrollo del epitelio sensorial del oído interno (Li y cols., 2003b; Jeon y cols., 2007; Qin y cols., 2011) podría inducir la formación de CC.



DISCUSIÓN

1. APLICACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS EN LA TERAPIA CELULAR FRENTE A LA PÉRDIDA DE AUDICIÓN

SNLH es la discapacidad sensorial más común debido, principalmente, a los numerosos factores ambientales que causan la degeneración de las células sensoriales del oído (Zahnert, 2011) y a que estas no se regeneran en los mamíferos adultos (Ronaghi y cols., 2012). Además, en la actualidad no existen tratamientos para aliviar esta patología, por lo que la terapia celular basada en la implantación de células exógenas constituye una opción muy atractiva. El objetivo de este trabajo ha sido probar la capacidad que tienen células madre adultas para diferenciarse a un tipo celular próximo a las células ciliadas, evaluando diferentes protocolos y tipos celulares de partida.

Las CMMh, son células madre de fácil acceso, sin problemas éticos ni legales relativos a su manipulación y, en cierto modo, pluripotentes (Hwang y cols., 2009). Poder diferenciarlas *in vitro* a CC o NSA, además de para un futuro uso en terapias regenerativas, ofrecería una herramienta de trabajo muy interesante no solo a nivel teórico-básico para seguir aprendiendo sobre el proceso de desarrollo de estas células, sino también práctico, pudiendo emplearse para ensayos de fármacos o sustancias químicas que pudieran afectar al desarrollo o supervivencia de las CC y NSA humanas.

Los fibroblastos, por su parte, son una fuente de tejido mucho más accesible y fácil de obtener de cualquier persona que las CMM. Aunque de por sí no son pluripotentes, las investigaciones hechas en los últimos años han demostrado que tienen cierta plasticidad y que son reprogramables a otros tipos celulares sin necesidad de pasar por un estado intermedio de pluripotencia (Junker y cols., 2010; Ieda 2013). El establecimiento de un protocolo de diferenciación de fibroblastos hacia CC, además de como muestra de la plasticidad de estas células, podría emplearse para el estudio de mutaciones genéticas humanas que pueden afectar al desarrollo y/o funcionalidad de las CC. Trabajando con fibroblastos de pacientes concretos se podría conocer de una forma sencilla cómo se ven afectadas las CC por la mutación y de este modo poder buscar y experimentar con algún tipo de terapia (farmacológica o génica) que pudiera ayudar a la recuperación de la audición. Estas posibilidades también serían aplicables al sistema vestibular, ya que son también las CC las encargadas de la función sensorial específica de estos órganos.

No obstante, parece poco probable que una célula postmitótica totalmente diferenciada como es una CC pueda integrarse y sobrevivir en el tejido tras el trasplante, por lo que parece más adecuado dirigir los esfuerzos a obtener *in vitro* una célula precursora de CC que, una vez integrada, pudiera diferenciarse a una CC. A pesar del gran número de trabajos que existen relacionados con el estudio de la generación de CC a partir de diversos tipos de células madre, en la práctica no se conoce el modo de poder sustituir las CC dañadas del oído interno de un paciente por otras CC funcionales obtenidas *in vitro* a

través de la diferenciación controlada de células madre. La principal barrera para encontrar una terapia real y efectiva no es tanto la generación de CC a partir de una fuente segura y accesible de células madre sino la dificultad para implantar las CC en el lugar exacto donde realizan su función, debido a la complejidad estructural y funcional del oído interno. Además de una zona pequeña y de difícil acceso por encontrarse en un hueco dentro del hueso temporal, el epitelio sensorial auditivo tiene una organización muy compleja y las células deben seguir un orden anatómico exacto para que la función auditiva pueda llevarse a cabo (ver figura I2 de la Introducción). No obstante, se está realizando un esfuerzo considerable para encontrar una solución al problema de una correcta integración de células precursoras exógenas (Shibata y Raphael, 2010; Zhao y cols., 2013). Relevantes son las observaciones de Li y cols., (2003b) y Zhao y cols., (2013) indicando que un daño inducido en el tejido sensorial anteriormente a la administración de células exógenas promueve la migración e integración de estas células en el órgano de Corti. En el caso de las NSA su reemplazamiento no requeriría una cirugía tan invasiva ni una integración de las células exógenas tan precisa para lograr recuperar la función perdida (Jongkamonwiwat y cols., 2010; Chen y cols., 2012).

2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS DE LA MÉDULA ÓSEA

2.1 Las CMMh procedentes de la médula ósea pueden ser una herramienta útil en terapias regenerativas, pero tienen ciertas limitaciones.

Las CMM son un tipo de células madre adultas que tienen un enorme interés en el campo de la medicina regenerativa debido a que son relativamente fáciles de obtener y expandir *in vitro* y a que, además, permiten los trasplantes autólogos evitando problemas de rechazo inmunológico. La médula ósea es la principal fuente de obtención de CMMh para aplicación clínica y por ello hay numerosos estudios que muestran su utilidad en la terapia celular, fundamentalmente en relación a tejidos de origen mesenquimal (Steinert y cols., 2012; Cashman y cols., 2013). En numerosas investigaciones se ha explorado la capacidad de diferenciación neural de las CMM de médula ósea *in vitro* (Woodbury y cols., 2000; Jiang y cols., 2003; Hermann y cols., 2006) o *in vivo* (Bonilla y cols., 2005) e incluso en la actualidad hay ensayos clínicos en progreso en los que se está probando la utilidad de las CMM en enfermedades neurodegenerativas (Nery y cols., 2013). Dado el origen neural de CC y NSA, las CMM podrían ser unas buenas candidatas para su uso en terapia regenerativa del oído interno.

Además de la médula ósea, las CMM se han aislado del tejido adiposo, membrana sinovial, cordón umbilical, músculo esquelético y membrana amniótica, entre otros tejidos (Phinney y Prockop, 2007). Las características de las CMM pueden variar en función del tejido del que se aíslan. Por ejemplo, las CMM procedentes de tejido adiposo

presentan los mismos marcadores de superficie que las de médula ósea, se diferencian también fácilmente a células del linaje mesodérmico y permiten el trasplante autólogo (Zuk y cols., 2002). Presentan, además, ciertas ventajas, ya que el procedimiento para su obtención es más sencillo y menos invasivo que el aspirado de médula ósea y su capacidad de proliferación en cultivo es superior a la de las CMMh de médula ósea (Hass y cols., 2011). También hay estudios que indican que pueden diferenciarse *in vitro* hacia células neurales (Jang y cols., 2010; Zavan y cols., 2010). El cordón umbilical también es una fuente interesante de CMMh. La sangre de cordón umbilical presenta un bajo porcentaje de CMM (Montesinos y cols., 2009). En cambio, se pueden aislar un gran número de CMM del tejido gelatinoso del cordón, que además presenta una capacidad de proliferación y de diferenciación al linaje neural superior a las CMMh de médula ósea y tejido adiposo (Balasubramanian y cols., 2013). La principal desventaja de esta fuente de CMM es que su disponibilidad para un trasplante autólogo depende de que se haya guardado el cordón umbilical del paciente en un banco de tejidos.

Los principales problemas en cuanto al empleo de células madre en la clínica están relacionados con la posibilidad de que las células se diferencien espontáneamente o generen tumores en el paciente. A diferencia de las CMM murinas, que con los pases pueden transformarse o inmortalizarse espontáneamente debido a una acumulación de anomalías genéticas y cromosómicas (Miura y cols., 2006), las CMMh parecen ser más estables (Redaelli y cols., 2012). Esto puede resultar una ventaja en relación a una terapia celular más segura pero, por otro lado, implica que las CMMh entran antes en senescencia. La senescencia celular conlleva una menor proliferación y también afecta al fenotipo de las células y a su capacidad de diferenciación (Bonab y cols., 2006; Wagner y cols., 2008, Brohlin y cols., 2012). En este trabajo, las CMMh se utilizaron para los estudios de diferenciación durante los pases 5-9, cuando la proliferación todavía no ha disminuido considerablemente y, según los estudios de citometría y diferenciación a linaje mesodérmico, conservan las características típicas de las CMM. Un bajo número de pases, imprescindible para conservar la pluripotencia de las CMMh, puede ser un factor limitante a la hora de conseguir *in vitro* la cantidad óptima de células necesarias para un uso en clínica. La edad del donante también influye en las características de las CMMh de un modo parecido a los pases: las CMM de donantes adultos proliferan más lentamente y se diferencian peor a ciertos linajes celulares como al linaje neural (Hermann y cols., 2010; Brohlin y cols., 2012; Zaim y cols., 2012). Este “envejecimiento” de las CMMh sería un problema dado que la SNHL se da más frecuentemente en la población de mayor edad y dificultaría una posible terapia celular a partir de células autólogas.

Por otro lado, no todas las células dentro del cultivo de CMM tienen la misma capacidad de diferenciación. Recientemente se ha descubierto una pequeña población celular que se ha denominado “células MUSE” (*Multilineage-differentiating stress enduring*) dentro de las CMM cuya característica principal es que tienen capacidad para generar células de

las tres capas germinativas (Kuroda y cols., 2010). Se denominaron así ya que, a diferencia del resto de CMM, sobreviven a ciertas condiciones de estrés, como una baja concentración de nutrientes en el medio de cultivo o una larga exposición a tripsina. Las células *MUSE* sólo suponen un pequeño porcentaje del cultivo de CMM (1% en CMMh derivadas de médula ósea, y 8,8% en CMMh derivadas de tejido adiposo (Kuroda y cols., 2010; Ogura y cols., 2014). En consecuencia, su diferenciación hacia el linaje neural estaría bastante limitada. Según estos datos, el tejido adiposo sería más adecuado que la médula ósea como fuente de células madre pluripotentes. Sin embargo, la comparación de la expresión génica entre células *MUSE* de tejido adiposo y de médula ósea realizado por estos mismos investigadores (Ogura y cols., 2014) concluye que las células *MUSE* derivadas de la médula ósea presentan una mayor expresión de marcadores ectodermales y, por tanto, son más susceptibles de diferenciarse a un linaje neural que las CMMh derivadas de tejido adiposo.

En relación a la capacidad de las CMM para diferenciarse a células neurales existe cierta controversia, ya que en varios trabajos se ha cuestionado la diferenciación neural de las CMM (Krabbe y cols., 2005, Sugaya 2003). Los cambios rápidos en la morfología de las células son debidos, en general, a un efecto citotóxico del tratamiento (Jin y cols. 2003; Lu y cols., 2004) y, por otro lado, muchas proteínas típicas de neuronas o de células de la glía ya se expresan en cultivos de MSC sin ningún tratamiento específico de inducción (Tondreau y cols., 2004). Un ejemplo de esto es la detección de la proteína β III-tubulina, característica de neuronas, en nuestros cultivos de CMM indiferenciadas (ver Resultados, Figura R16).

En consecuencia, los estudios de diferenciación que se han llevado a cabo en este trabajo incluyen como control de referencia cultivos de CMM no tratadas (indiferenciadas). Además, la diferenciación no sólo se ha basado en la observación de la expresión de proteínas por métodos ICC, que podría dar falsos positivos debido al cambio morfológico provocado por un efecto citotóxico del tratamiento, sino que se han detectado cambios significativos también a nivel de transcripción génica. Por otro lado, los cambios morfológicos observados en los cultivos tratados no fueron bruscos, sino que se mantuvieron en el tiempo y no se produjo muerte celular significativa. Hay que resaltar que los protocolos de diferenciación empleados están basados en métodos que ya han demostrado ser eficaces en otras poblaciones celulares (Kondo y cols., 2005; Caddick y cols., 2006; Jeon y cols., 2007; Chen y cols., 2009) y que se discutirán más adelante.

2.2 La transfección de Atoh1 no induce la expresión de Miosina7a en los cultivos derivados de CMMh.

Reconocida la función de Atoh1 en el establecimiento del dominio prosensorial así como en la diferenciación de las CC del oído interno (Bermingham y cols., 1999; Woods y cols.,

2004; Yang y cols., 2010; Chonko y cols., 2013), este gen se presenta como un buen candidato para la terapia génica. No en vano, la sobreexpresión de Atoh1 en la cóclea de roedores tanto *in vivo*, *in vitro* o *in utero* resulta en la producción de CC ectópicas a partir de células no sensoriales del epitelio auditivo (Zheng y Gao, 2000; Shou y cols., 2003; Izumikawa y cols., 2005; Gubbels y cols., 2008; Yang y cols., 2012). La sobreexpresión de Atoh1 también se ha empleado en células madre neurales y CMM de roedores para generar CC *in vitro* como modelo para una posible terapia regenerativa (Jeon y cols., 2007; Han y cols., 2010; Lin y cols., 2012).

Por lo tanto, en este trabajo la primera aproximación para diferenciar las CMMh hacia CC fue sobreexpresar el vector pAtoh1-IRES2AcGFP1 en los cultivos de CMMh. Sin embargo, las CMMh presentaron una gran dificultad para ser transfectadas (Helledie y cols., 2008). La transfección empleando liposomas fue menor al 5%, resultados similares a los obtenidos por otros investigadores en CMM de ratón y humanas (Baksh y cols., 2007; Jeon y cols., 2007). Como también era de esperar, mediante electroporación o *Nucleofection* se consiguió una transfección más eficiente pero a costa de una elevada muerte celular (Aluigi y cols., 2006; Baksh y cols., 2007).

Sorprendentemente, si bien se comprobó que la electroporación de las CMMh con pAtoh1-IRES2AcGFP1 transfectaba un mayor número de células que el uso de *Lipofectamine LTX + PLUS reagent* y que la expresión de la proteína GFP se mantenía durante varios días, también se observó que la proteína Atoh1 no se expresaba en todas las células GFP-positivas y que la expresión de Atoh1, además, desaparecía casi totalmente a los pocos días (Figura R3Aii). Se podría pensar que la expresión de Atoh1 se apagaba, pero transfectando con un vector de Atoh1 con la GFP fusionada en el extremo C-terminal se comprobó que pocos días después de la electroporación no había apenas células GFP-positivas en el cultivo y las pocas presentes mostraban un núcleo apoptótico. De estos resultados surgió la hipótesis de que la sobreexpresión de Atoh1 podría estar provocando la muerte de las células. En los cultivos transfectados con el plásmido pAtoh1-Ires-GFP es posible que se estuviesen seleccionando células que sólo expresaban GFP pero no Atoh1, y que son las que permanecieron en el cultivo. De un modo muy parecido, la expresión ectópica de Atoh1 en los precursores neurales durante el desarrollo de ratón, provoca la muerte por apoptosis de grupos de neuronas inmaduras, mientras que las células de la glía no parecían estar afectadas (Isaka y cols., 1999). Por otro lado, una sobreexpresión de Atoh1 en progenitores de células granulares del cerebelo impide su diferenciación y el órgano no se desarrolla correctamente, apuntando también a una probable muerte celular (Helms y cols., 2001). En conjunto, estos resultados indican que la expresión de Atoh1 debe ser controlada de forma muy precisa durante el desarrollo o diferenciación celular, ya que su sobreexpresión en algunos tipos celulares puede causar apoptosis.

Considerando que los efectos de la sobreexpresión de Atoh1 podrían en gran medida depender del contexto celular y pudiera ser responsable de la muerte celular observada, se decidió tratar los cultivos de CMMh con factores de diferenciación y posteriormente sobreexpresar Atoh1. El problema en este caso fue que estos cultivos no respondieron a la transfección con *Lipofectamine* y la electroporación provocó una mayor mortalidad que la transfección de las CMMh sin tratar. Los parámetros de la electroporación se optimizaron para las CMMh en expansión, pero tras el tratamiento de las células con factores de crecimiento, la electroporación causó la muerte celular de la mayoría de las células cultivadas. Este efecto posiblemente se debe a que las células habían estado en un medio de diferenciación, sin SBF y con factores de crecimiento, que causó un cese de la proliferación y la muerte celular. En consecuencia, habría que partir de muchos millones de células, lo que hace el proceso mucho más complicado, caro y poco provechoso.

Otros métodos de transfección más efectivos para las CMMh y otras células difíciles de transfectar son los basados en virus. Sin embargo, y pese a la amplia variedad de vectores virales existentes, a la hora de buscar un método que pudiera ser aplicable para terapia génica son preferibles los métodos no virales. Toxicidad, riesgo de provocar una respuesta inmune, mutagénesis por inserción en el genoma de la célula hospedadora o la complejidad a la hora de su producción y manipulación en el laboratorio (Vannucci y cols., 2013), son las principales desventajas del uso de virus para la modificación génica de células.

2.3 Varios protocolos basados en el cultivo con factores de crecimiento y otras moléculas de señalización logran la conversión de las CMMh en un PN que expresa los genes proneurales Sox2 y Nestina

Diferentes estudios destacan la necesidad de convertir las CMM en un PN o célula madre neural antes de su diferenciación a un tipo celular neural más concreto (Hermann y cols, 2006; Keilhoff y cols., 2006; Ogita y cols., 2010; Boddy y cols., 2012). Con el tratamiento de “neuralización” se ha pretendido generar un PN capaz de diferenciarse posteriormente a los dos tipos principales de células sensoriales del oído, CC y NSA.

Los protocolos empleados para la diferenciación de las CMMh en PN se basaron en métodos que han sido empleados como primer paso en la generación de células neurales más diferenciadas, como células de Schwann a partir de CMM de ratón (Caddick y cols., 2006), células de la glía y neuronas funcionales a partir de CME de ratón y CMMh (Fraichard y cols., 1995; Hermann y cols., 2004), o CC a partir de CMM de ratón (Jeon y cols., 2007; Qin y cols., 2011). A pesar de la diferencia existente entre los tratamientos, en todos los casos se observó un aumento en la expresión de los marcadores neurales analizados, Sox2 y Nestina, ya que todos los factores de crecimiento y compuestos

empleados para la diferenciación están involucrados en el desarrollo del sistema nervioso y/o se han empleado anteriormente para generar PN a partir de células madre de distintas fuentes.

En el trabajo de Caddick y cols. (2006) se empleó el tratamiento con β ME y AR sobre un cultivo en monocapa de CMM para condicionar las células antes de añadir el medio de diferenciación que las llevará a un fenotipo de célula de Schwann. Es decir, algo similar a lo que estábamos buscando: una célula con características de PN que sea capaz de responder a posteriores estímulos para diferenciarla a tipos celulares concretos, en nuestro caso NSA y CC. El β ME es un potente antioxidante, que facilita la supervivencia y promueve la diferenciación de los progenitores neurales (Ishii y cols., 1993; Ni y cols., 2001), mientras que el AR es la forma activa de la vitamina A, importante para el desarrollo del sistema nervioso y del oído interno (Frenz y cols., 2010; Shearer y cols., 2012). Además, el AR induce la expresión de genes ectodérmicos en las CMM e inhibe la expresión de genes característicos del mesodermo (Bi y cols., 2010; Solmesky y cols., 2010).

El cultivo en monocapa de CMMh tratadas con MSS, bFGF, NT3 y BDNF se empleó en el trabajo de Jeon y cols. (2007) para generar PN a partir de CMM de ratón y continuar la diferenciación hacia CC. En las CMMh, al igual que sucede en el ectodermo durante el desarrollo, se expresan los receptores para estos factores neurotróficos (Bartkowska y cols., 2010; Rezaee y cols., 2010). Además, el bFGF favorece la expresión de marcadores de neuroectodermo en CMM de ratón (Jiang y cols., 2003) y las neurotrofinas son importantes en la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células madre neurales adultas y en el desarrollo temprano del sistema nervioso (Bartkowska y cols., 2010; Oliveira y cols., 2012). De este modo, la combinación de bFGF, NT3 y BDNF favorece la expresión de marcadores neurales tempranos en las CMMh. Al igual que en nuestros experimentos, Jeon y cols. (2007) observaron un aumento de expresión de Sox2 y Nestina en estos PN.

Por otro lado el cultivo de células en condiciones no adherentes es un método frecuentemente empleado para la generación de células madre neurales o PN a partir de CME, CMM y otros tipos de células pluripotentes (por ejemplo, Hermann y cols., 2004; Li y cols., 2009; Ogita y cols., 2010). En los cultivos de esferas derivadas de CMMh, la presencia de AR en el medio es suficiente para inducir la expresión de marcadores proneurales, al igual que se observó en las CME (Fraichard y cols., 1995). En otros trabajos, la combinación de EGF y bFGF en ausencia de suero se ha empleado en la generación de neuroesferas a partir de CMM de diferentes especies. Estas neuroesferas se caracterizan por expresar Nestina y Musashi1 (Kang y cols., 2004; Ogita y cols., 2010). Además de Nestina, Sox2 y Musashi1, en nuestros cultivos en condiciones no adherentes con EGF y bFGF se detectó también la expresión de Oct4. Éste es un marcador de

pluripotencia que colabora con Sox2 promoviendo la neurogénesis en CME y en el mantenimiento de un fenotipo de PN, desapareciendo conforme avanza la diferenciación neural (Shimokazi y cols., 2003; Archer y cols., 2011; Ilieva y Dufva, 2013).

Podemos concluir que a través de distintas condiciones de cultivo es posible aumentar la expresión de Nestina y Sox2 en las CMMh. Sin embargo, los compuestos empleados en estos protocolos están involucrados en distintos procesos celulares, por lo que las diferencias entre los distintos métodos de diferenciación se van a hacer patentes al intentar generar CC y NSA a partir de estos PN.

2.4 Diferenciación de CMMh hacia CC: el cultivo en presencia de EGF y AR aumenta la expresión de marcadores de CC en PN, pero sólo en aquellos generados a partir de esferas en EGF/bFGF

Dado que la sobreexpresión de Atoh1 en CMMh no ayudó a la diferenciación hacia CC, se buscaron otros métodos para obtener la expresión de marcadores de CC a partir de células derivadas de las CMMh. En CME, CMM o células madre del oído interno de ratón, el cultivo en presencia de EGF, IGF1 y bFGF induce la expresión de marcadores de CC (Li y cols., 2003a y 2003b; Jeon y cols., 2007; Qin y cols., 2011, véase también Figura R7). Sin embargo, en las pruebas llevadas a cabo en el laboratorio, el tratamiento con estos factores (combinaciones de IGF1/EGF/bFGF) de CMMh, PN o cuerpos embrionarios formados a partir de CMMh no tuvo el efecto deseado sobre la expresión de marcadores de CC. Las diferencias con las células de ratón ya se observaron en algunos PN. Aquellos generados al cultivar las CMMh en MSS con bFGF y neurotrofinas mostraron una menor expresión de Atoh1 que los controles, lo que es opuesto a lo observado en Jeon y cols. (2007) en las CMM de ratón. Esto sugiere que los PN no son iguales a pesar de haber recibido el mismo tratamiento. El único método de cultivo probado que aumentó de manera significativa la expresión de proteínas y genes característicos de CC en los cultivos de PN derivados de CMMh fue la combinación de EGF y AR, ya empleado en el trabajo de Chen y cols (2009) para la diferenciación de progenitores óticos derivados de células madre auditivas fetales humanas. El EGF estimula la proliferación en CME y CM derivadas del oído y su diferenciación a CC (Li y cols., 2003a y b; Doetzlhofer y cols., 2004) y actúa como factor de supervivencia en líneas celulares derivadas del epitelio coclear (Zheng y cols., 2008). Además, interviene en la regeneración de CC en las aves disminuyendo la expresión de p27^{kip} en las CS (White y cols., 2012), lo que es necesario para la “desdiferenciación” y posterior diferenciación de nuevas CC. El AR, por su parte, además de estar implicado en la formación de la VO (Frenz y cols., 2010), induce la expresión de Miosina7a en líneas celulares derivadas del epitelio sensorial del oído (Helyer y cols., 2007) y se ha sugerido que interviene en la diferenciación temprana de las CC durante el desarrollo del órgano de Corti (Raz y Kelley, 1999).

Hay que destacar que no todos los PN respondieron al tratamiento de diferenciación. El aumento de expresión de Miosina7a (ARNm y proteína), Atoh1 (ARNm y proteína) y Brn3c (ARNm) sólo se observó en aquellos PN generados como esferas en MSS con EGF y bFGF. Este primer paso de tratamiento con EGF y bFGF coincide con protocolos empleados para diferenciar CMM murinas hacia CC o NSA (Qin y cols., 2011). Aparte de estimular la diferenciación de células progenitoras hacia CC, se sabe que el EGF favorece la proliferación y promueve la actividad paracrina de las CMMh (Tamama y cols., 2010). El bFGF, por su parte es necesario para la inducción de progenitores óticos a partir de CME humanas (Chen y cols., 2012; Ronagui y cols., 2014), y en estadios tempranos del desarrollo promueve la actividad de Sox2 y Atoh1 en el oído (Vazquez-Echevarria y cols., 2008; Millimaki y cols., 2010; Sweet y cols., 2011). Estos PN, por tanto, estarían predispuestos o facilitados para responder al posterior tratamiento con EGF y AR e inducir la expresión de proteínas típicas de CC.

La diferenciación completa de progenitores óticos derivados de CMM o CME a CC no ocurre fácilmente *in vitro* simplemente modificando el medio de cultivo, sino que en muchos trabajos son necesarios métodos adicionales como la sobreexpresión de algún gen (Jeon y cols., 2007) u otro tipo de señal, a través de cocultivos, estructuras tridimensionales o injertos en tejido auditivo (Li y cols. 2003a, Jeon y cols., 2007; Oshima y cols., 2010; Koehler y cols., 2013). Sin embargo, en contraste con los datos obtenidos por Oshima y cols., (2010) con CMM de ratón, en nuestras manos el cocultivo de los PN derivados de CMMh con células estromales de utrículo de pollo no produjo el aumento de expresión de genes y proteínas típicas de CC. Probablemente, los PN derivados de las CMMh no presentan las mismas características que los obtenidos a partir de CME o células iPS de ratón y sea necesaria una diferenciación previa hacia un linaje más ótico antes del establecimiento de los cocultivos u otro tipo de cocultivo que estimule adecuadamente a los PN derivados de CMMh.

2.5 Varios métodos de diferenciación a partir de PN derivados de CMMh llevan a la expresión de marcadores de NSA, todos basados en diferentes combinaciones de Shh, FGF y AR.

Al igual que en los experimentos para diferenciar las CMMh a CC, el primer paso fue intentar reproducir experimentos publicados para diferenciar CMM de ratón a NSA. En este caso seleccionamos el método empleado por Kondo y cols. (2005). En esta publicación se emplea una combinación de Shh, AR, bFGF y BDNF en cultivos de CMM de ratón que han sido previamente prediferenciadas con bFGF, forskolina e IBMX. El uso de la forskolina e IBMX para aumentar la producción de AMPc se ha empleado frecuentemente para inducir un fenotipo neural en las CMM (Woodbury y cols., 2000; Jang y cols., 2010), sin embargo algunos autores afirman que los cambios en la morfología

de las CMM son transitorios y que, además, incrementa el número de células que sufren apoptosis (Rooney y cols., 2011). En los experimentos realizados con las CMMh no observamos que las células adoptaran un aspecto neuronal, sino que el tratamiento tuvo un efecto tóxico (células vacuoladas, pérdida de adherencia de las células) por lo que podemos suponer que la exposición a forskolina e IBMX durante tantos días (8 en total) afectó a las CMMh más de lo que se ven afectadas las CMM de otras especies.

Sin embargo, los factores de crecimiento empleados por Kondo y cols. (2005) para la diferenciación de las CMM de ratón sí tienen un efecto similar en las CMMh. Varios métodos probados basados en el tratamiento con factores de crecimiento llevaron a la diferenciación de PN en neuronas, con la característica de que en los tres métodos se expuso a las células a combinaciones de Shh con AR o bFGF. Además de la importancia durante la especificación y el desarrollo de las distintas partes del oído (Riccomagno y cols., 2002; Bok y cols., 2011), Shh promueve la competencia hacia neuronas sensoriales en cultivos celulares (Ota y cols., 2003; Kondo y cols., 2005), mientras que el AR y el bFGF promueven el desarrollo de las neuronas auditivas (Carnicero y cols., 2003; Martínez-Monedero y cols., 2008). En los tratamientos empleados, estos compuestos, más relacionados con procesos tempranos de desarrollo, se combinaron con factores neurotróficos (BDNF y NT3) que *in vivo* intervienen en fases más tardías del desarrollo como soporte trófico de las NSA (Pirvola e Ylikowski, 2003).

Al igual que ocurrió con la expresión de marcadores de CC, no todos los PN respondieron positivamente a la inducción neurosensorial. Sólo aquellos PN que habían sido expuestos previamente a AR aumentaron la expresión de marcadores de NSA. El AR en las CMM induce la expresión de genes ectodermales y disminuye la expresión de los genes mesodermales, promoviendo la diferenciación neural (Keilhoff y cols., 2006; Bi y cols., 2010; Gong y cols., 2013). Además, este resultado coincide con las observaciones del trabajo de Martínez-Monedero y cols. (2008), donde se destaca la importancia del AR para aumentar la capacidad de diferenciación hacia NSA. Es importante resaltar el hecho de que el AR es capaz de delimitar una región con competencia óptica dependiente de FGF (Hans y cols., 2007) durante el desarrollo normal de la vesícula óptica, de modo que la cooperación de FGFs y AR parece tener gran importancia tanto en la diferenciación de CC como de las NSA.

2.6 El epitelio coclear de ratón neonato libera al medio factores de crecimiento o genera señales que promueven la expresión de marcadores neuronales en PN derivados de CMMh

Al igual que ocurre en la generación *in vitro* de NSA, en muchos casos se emplean medios condicionados o cocultivos para observar la expresión de marcadores de diferenciación. En el trabajo ya mencionado de Kondo y cols. (2005), la detección de determinados

marcadores de NSA, como Brn3a, sólo fue posible tras el cocultivo de las CMM tratadas con explantes de órgano de Corti o empleando un medio de cultivo condicionado en presencia de romboencéfalo, somitas y otocistos. Otro ejemplo es el trabajo de Boddy y cols. (2012), donde se utiliza un medio condicionado por células embrionarias cocleares humanas junto con el tratamiento con factores de crecimiento para conseguir la diferenciación de CMMh a NSA.

También se ha descrito que los explantes cocleares en cocultivo facilitan la diferenciación PN derivados de CME de ratón o humanas a NSA (Coleman y cols 2007; Shi y cols., 2007). En nuestro caso, los PN derivados de las CMMh se cocultivaron con explantes cocleares procedentes de ratones neonatos en un medio suplementado con AR, NT3 y BDNF durante 2 semanas y después de este tiempo se observó la expresión de marcadores neuronales en las células humanas. El efecto de los explantes sobre los PN está determinado por los mismos procesos que ocurren en el desarrollo ya que las CC aportan factores tróficos a las NSA durante el desarrollo, como NT3 y BDNF (Ramekers y cols., 2012). Siendo así, aunque en varios estudios de diferenciación hacia NSA empleando cocultivos con explantes cocleares se utilizan medios suplementados con neurotrofinas (Martinez-Monedero y cols., 2008; Nayagam y cols., 2013), en otros, como Coleman y cols. (2007) y Shi y cols. (2007) se muestra que estos factores no son necesarios para inducir la expresión de marcadores de NSA en presencia de los explantes. Por otro lado, se sabe que el epitelio auditivo en cultivo expresa BMP4 y puede inducir la expresión de marcadores de NSA como se ha observado en PN derivados de CME humanas (Shi y cols., 2007).

Llama la atención que mientras sólo los cultivos derivados de PN formados en presencia de AR se diferenciaron a NSA mediante un protocolo de exposición a factores de crecimiento, fueron las esferas formadas en MSS con EGF y bFGF las que respondieron a la inducción neural durante el cocultivo con explantes cocleares. De nuevo, esto apunta a una heterogeneidad de los distintos PN obtenidos con los diferentes tratamientos. Además, las señales o factores emitidos por los explantes cocleares, al no estar totalmente caracterizados, no se corresponden necesariamente con los medios definidos empleados en los métodos NSA1-4, de modo que los PN formados en MSS, EGF y bFGF expresan NF200 en este contexto y no en otros, lo contrario a lo que ocurre en los PN formados en presencia de AR.

2.7 La respuesta de las CMM a los tratamientos de diferenciación hacia células sensoriales del oído interno empleando factores de crecimiento es diferente dependiendo de la especie animal

En un principio, para intentar la diferenciación de CMMh hacia células sensoriales del oído se emplearon procedimientos ya descritos para las CMM de roedores. Sin embargo, los

resultados obtenidos no replicaron los procesos de diferenciación *in vitro* descritos en otras especies. Las CMMh y PN derivados de ellas no respondieron a la sobreexpresión de Atoh1 como cabía esperar, como por ejemplo un aumento de expresión de Miosina7a (Jeon y cols., 2007). Además, la sobreexpresión de Atoh1 en las CMMh pareció causar la muerte de las células, mientras que en las CMM de ratón este hecho no se ha reflejado en ninguna publicación (Jeon y cols., 2007; Lin y cols., 2012). Por otro lado, las células estromales de utrículo de pollo no parecen aportar ningún beneficio en la inducción de marcadores de CC en las CMMh (Oshima y cols., 2010). Otra muestra de estas diferencias se observó durante la generación de PN mediante el tratamiento con bFGF y neurotrofinas. En estas condiciones, las CMM de ratón forman unos PN con una mayor expresión de Atoh1 que el control (Jeon y cols., 2007), mientras que en las CMMh disminuyó. Finalmente, las condiciones de cultivo capaces de generar neuronas sensoriales a partir de CMM de ratón (Kondo y cols., 2005) no solo no funcionan en las humanas sino que parecen tener un efecto tóxico. En contraposición a estos resultados, el uso de combinaciones de factores utilizadas para diferenciar células humanas (diferenciación de CC y métodos NSA4, basados en Chen y cols., 2009) sí tuvo éxito a la hora de aumentar la expresión de marcadores de CC y NSA en las CMMh.

Estas discrepancias entre las CMM humanas y murinas sugieren importantes diferencias entre especies que deben ser tenidas en cuenta a la hora de potenciales aplicaciones terapéuticas.

3. REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS HACIA CC

3.1 Los fibroblastos son una fuente de células disponibles para la reprogramación a una gran variedad de células diferenciadas

En los últimos años, los fibroblastos se han revelado como una interesante fuente de células capaces de ser diferenciadas a diferentes linajes y susceptibles de ser empleadas como un nuevo tipo de célula madre en todo tipo de terapias regenerativas (Chamber y Studer, 2011; Vierbuchen y Wernig, 2011; Ieda 2013). Una de sus principales ventajas es la obtención de una alta producción de células mediante procedimientos mínimamente invasivos a partir de una pequeña biopsia de piel. Además, los fibroblastos humanos obtenidos a partir de biopsias de piel han demostrado tener una tasa de proliferación similar a CMMh, así como otras características comunes a las CMMh: expresión de antígenos de superficie típicos de CMM, marcadores de pluripotencia, potencial de diferenciación hacia condrocitos, adipocitos y osteocitos mediante el cultivo en medios definidos (Lorenz y cols., 2008; Alt y cols., 2011; Brohem y cols., 2013) e incluso cierta capacidad para disminuir la respuesta inmune (Haniffa y cols., 2007). Sin embargo, no ocurre lo mismo en líneas celulares de fibroblastos. En distintas líneas de fibroblastos

humanos no se ha detectado la expresión de marcadores de pluripotencia (o fue mucho menor), ni se han podido diferenciar a otras células mesodermales (Pittenger y cols., 1999; Alt y cols., 2011). Esto indica que es probable que en los cultivos de fibroblastos aislados a partir de biopsias de piel se encuentre algún tipo de célula madre con características diferentes a las de los fibroblastos diferenciados (Alt y cols., 2011; Hematti 2012). En cualquier caso, estos datos no hacen sino realzar las ventajas de la piel como fuente de células para la regeneración de tejidos.

A la hora de generar nuevas células diferenciadas a partir de fibroblastos, existen dos formas de abordar el proceso (Vierbuchen y Wernig, 2011). Por un lado, los fibroblastos pueden desdiferenciarse o reprogramarse hacia un estado pluripotente (células iPS) o célula progenitora, por ejemplo un PN, y continuar la diferenciación hacia una célula madura distinta. Por otro lado, la transdiferenciación directa consiste en el cambio directo de un tipo celular a otro sin pasar por un estado de pluripotencia, por ejemplo la generación de miocitos o hepatocitos a partir de fibroblastos (Ieda y cols., 2010; Huang y cols., 2011).

En este trabajo hemos utilizado estas dos alternativas para estudiar cómo se podrían generar CC a partir de fibroblastos. Para ello empleamos, a su vez, distintas aproximaciones. Una es la transdiferenciación mediante el uso de transgenes. Por lo general se suelen emplear como genes de reprogramación factores de transcripción relacionados con el desarrollo del tipo celular que se quiere obtener, ya que durante el desarrollo son los principales efectores en el establecimiento de los linajes celulares (Weintraub y cols., 1989; Vierbuchen y cols., 2010; Wada y cols., 2013). También se puede reprogramar sin emplear transgenes mediante la modificación de las condiciones de cultivo y el uso de factores de crecimiento y otras moléculas que alteran la señalización celular (Feng y cols., 2009; Vierbuchen y Wernig, 2011). Finalmente, hemos también querido estudiar el efecto de sustancias, como 5azadC, que afectan a los mecanismos epigenéticos que controlan la expresión génica, tan importantes en el desarrollo y la diferenciación celular (Ikegami y cols., 2009).

3.2 Transfección de fibroblastos NIH/3T3 con factores clave para el desarrollo de las CC.

Para la reprogramación de fibroblastos se suelen emplear genes de factores de transcripción que sean determinantes en el desarrollo del tipo celular elegido. Entre ellos, los factores de tipo *bHLH*, ya que muchos de ellos tienen importantes funciones en el desarrollo. por ejemplo, MyoD1 en la generación de células musculares (Weintraub y cols., 1989), Ngn3 en la diferenciación de células pancreáticas (Yechool y cols., 2009) o Ascl en la inducción de marcadores neuronales (Vierbuchen y col., 2010). En la formación de los epitelios sensoriales, los factores del tipo *bHLH* son importantes en la producción y diferenciación de los receptores sensoriales siendo Atoh1 el factor clave para el desarrollo

de las CC (Birmingham y cols., 1999). Además, también se estudió el efecto de otros genes importantes en la formación de CC, como son los factores de transcripción Sox2, Eya1 y Six1. Para conocer el efecto que tendrían estas modificaciones dentro de un contexto de futura aplicación clínica, lo deseable hubiese sido emplear fibroblastos primarios humanos. Dada la dificultad que tuvimos para transfectar estas células, los experimentos de sobreexpresión de estos factores de transcripción se realizaron en la línea celular de fibroblastos de ratón NIH/3T3.

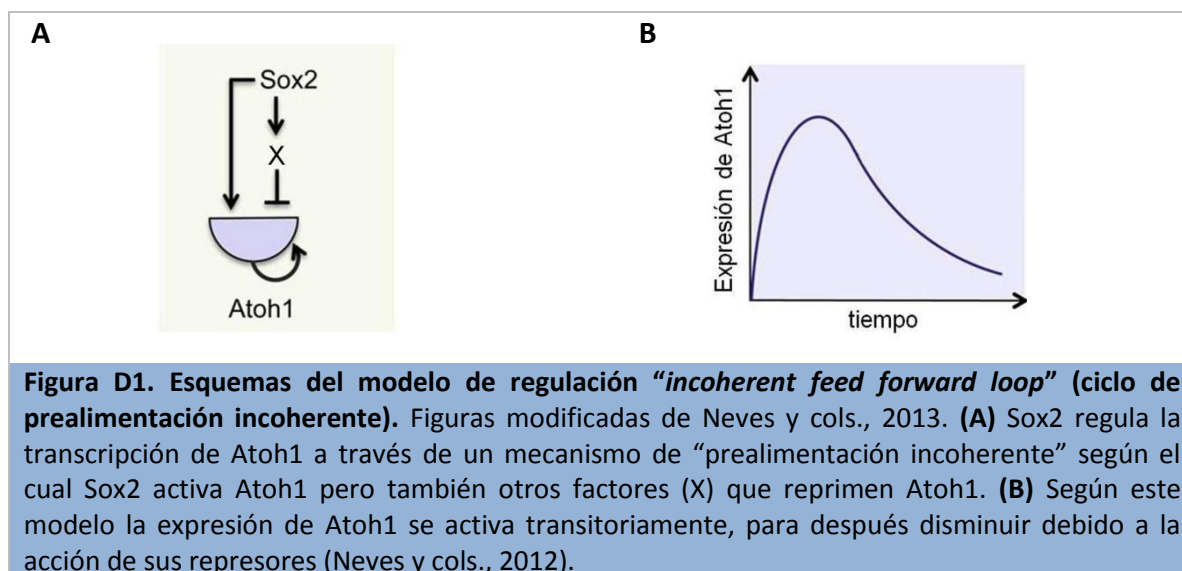
3.2.1 Transfección con Sox2 y Atoh1

En determinados tipos de PN o en las células no sensoriales del epitelio coclear, la sobreexpresión de Atoh1 conlleva la diferenciación hacia CC o al menos la expresión de marcadores característicos como Miosina7a (Jeon y cols., 2007; Qin y cols., 2011; Ahmed y cols., 2012a). Por otro lado, según estudios sobre regulación génica, el factor de transcripción Atoh1 después de su activación por otros factores de transcripción, mantiene y aumenta su propia expresión en los precursores sensoriales a través de un mecanismo de autorregulación positiva (Helms y cols., 2000; Raft y cols., 2007). Como resultado, una sobreexpresión transitoria del gen, teóricamente, sería suficiente para mantener los niveles adecuados de la proteína.

En los experimentos de sobreexpresión de Atoh1 en fibroblastos NIH/3T3 llevados a cabo en el laboratorio no se observaron cambios en los niveles de expresión de Brn3c y disminuyó la expresión endógena de ARNm de Atoh1, Sox2 y Miosina7a. Durante el desarrollo del oído sólo zonas concretas son capaces de generar CC en respuesta a una expresión ectópica de Atoh1 (Woods y cols., 2004; Sweet y cols., 2011). Es decir, si la competencia para responder a Atoh1 en el oído está restringida espacialmente, es de esperar que en una línea celular de fibroblastos la sobreexpresión de Atoh1 no sea suficiente para inducir la expresión de genes característicos de CC. Por otro lado, en líneas celulares con expresión endógena de Sox2, la transfección de Atoh1 suprime la expresión de la proteína Sox2 (Dabdoub y cols., 2008). En el caso de las NIH/3T3, aunque la proteína Sox2 no se detectó mediante ICC ni antes ni después de la transfección la sobreexpresión de Atoh1 produjo una disminución de la expresión del ARNm de Sox2. La disminución de los niveles de expresión de Atoh1 endógeno, podría indicar que la proteína humana no funcione del mismo modo en células de ratón. Sin embargo, la expresión de Atoh1 está controlada por dos regiones reguladoras altamente conservadas en los mamíferos (Helms y cols., 2000) de modo que es probable que Atoh1 humano reconozca la secuencia reguladora de Atoh1 de ratón y pueda activar su expresión endógena. Por otra parte, la sobreexpresión del Atoh1 humano en la cóclea del ratón sí genera CC ectópicas (Shou y cols., 2003). Por todo esto, parece improbable que la proteína humana no sea funcional en ratón. La funcionalidad del vector empleado en nuestro modelo también quedó demostrada por los efectos en la expresión endógena de Sox2 ya comentados y porque al

cotransfectar Atoh1 junto a Sox2 se observaron diferencias con respecto a la transfección de las células NIH/3T3 sólo con Sox2. Una opción que explique por qué Atoh1 ectópico no activa la expresión endógena de Atoh1 podría ser que se necesitara la activación endógena de Atoh1 por Sox2 u otra vía para que pueda tener lugar la regulación positiva descrita (Neves y cols., 2012). La bajada de los niveles de Atoh1 endógeno estaría relacionada con la disminución de Sox2, un principal activador de la expresión de Atoh1 (Kiernan y cols., 2005b; Neves y cols., 2012).

En otra serie de experimentos, se mostró que la transfección de las células NIH/3T3 con Sox2 inhibió la expresión endógena de Atoh1. Del mismo modo, en el órgano de Corti en desarrollo también se ha observado que la sobreexpresión artificial de Sox2 inhibe la formación de CC (Dabdoub y cols., 2008) ya que, aunque es necesario para establecer la región prosensorial de la cóclea, Sox2 debe reprimirse para la diferenciación de las CC. Este efecto está justificado por la regulación existente entre Atoh1 y Sox2. Se ha sugerido que Sox2 regula la expresión de Atoh1 a través de un *“incoherent feedforward loop”* (Neves y cols., 2012 y 2013). Según este modelo, Sox2 activa la expresión de Atoh1 mediante unión directa a secuencias activadoras de la expresión de Atoh1, pero a la vez promueve la activación de inhibidores de Atoh1 como Hey1, Hes5 y Ngn1 (Neves y cols., 2011 y 2012), por lo que finalmente la expresión de Atoh1 se mantiene baja hasta los estadios de diferenciación. Ya que los cultivos se analizaron varios días después de la transfección, se puede pensar que esas cascadas inhibitorias activadas por Sox2 ya habrían provocado un descenso del nivel basal de Atoh1 en los fibroblastos del ratón, y no existirían los factores que rompen el ciclo durante el desarrollo normal.



Aunque por separado la sobreexpresión de Atoh1 y Sox2 no tuvo una gran repercusión en la expresión de ARNm de los genes analizados, la combinación de ambos tuvo el efecto de aumentar la expresión de Atoh1, Sox2 y Brn3c de un modo estadísticamente significativo. Este resultado está de acuerdo con lo observado por Sweet y cols., (2011) en el pez cebra,

en donde la expresión ectópica de Sox2 junto a Atoh1 hace que células del epitelio de la VO no competentes para diferenciarse a CC expresen marcadores como Brn3c. Sin embargo, tanto en el trabajo de Dabdoub y cols., (2008) como en el de Ahmed y cols., (2012a) (ambos realizados en ratones) la transfección de explantes cocleares con Sox2 junto a Atoh1 en la zona no sensorial del epitelio, antagoniza el efecto que tiene la sobreexpresión individual de Atoh1 e inhibe la formación de CC. Puede ser que el efecto observado en los epitelios sensoriales de ratón esté relacionado con el hecho de que estas células ya proceden de un progenitor sensorial y expresan Sox2. Además puede haber otros factores implicados en la diferenciación sensorial, como ligandos y receptores Notch, que determinan qué células del epitelio forman CC o CS (Neves y cols., 2011)). En estos casos, la sobreexpresión de Atoh1 es suficiente para diferenciarlas a CC mientras que si adicionalmente se sobreexpresa Sox2, el exceso de esta proteína impide la diferenciación a CC. Sin embargo, en los fibroblastos NIH/3T3 observamos que la transcripción basal de Sox2 es muy baja, por tanto la presencia de Sox2 exógeno ayudaría a hacer “competente” a las células y posibilitaría que Atoh1 activara la expresión de Brn3c. Sox2 activaría inicialmente la expresión endógena de Atoh1, que a partir de ese momento ya podría regular positivamente su expresión de modo que aumentan los niveles endógenos de Atoh1, lo que no ocurriría con la transfección aislada de Atoh1. Cuesta más entender por qué a pesar de la presencia de Sox2 se mantiene el aumento de expresión de Atoh1 endógeno y por qué se produce un aumento en la expresión de Sox2 a pesar de la sobreexpresión de Atoh1. Sox2 activa la expresión de inhibidores de Atoh1, pero el exceso de Atoh1 (exógeno) podría impedir la actividad de estas proteínas represoras, por ejemplo bloqueando las zonas reguladoras de Atoh1 donde se unen los inhibidores. Sería interesante analizar la expresión de estos inhibidores de Atoh1 en los cultivos transfectados con ambos genes o por separado para confirmar esta hipótesis.

Ya que no conocemos cómo está regulada la expresión de Sox2/Atoh1 en las células NIH/3T3, el aumento de la expresión de Sox2 endógeno en los cultivos transfectados con Atoh1 y Sox2 podría explicarse por el modelo celular empleado. Sin embargo, si tenemos en cuenta el tipo de regulación de estos genes en un contexto similar al desarrollo del oído, una posibilidad que explique el aumento de expresión de Sox2 endógeno en el cultivo es que este aumento tenga lugar sólo en ciertas células. Debido a que no todas las células del cultivo han recibido las mismas copias de los transgenes, aquellas con una elevada expresión de Atoh1 pueden activar la expresión de Sox2 en células adyacentes, del mismo modo que ocurre durante la formación de CC y CS del epitelio sensorial (Doetzlhofer y cols., 2009; Neves y cols., 2011). Este efecto no pudo comprobarse mediante técnicas ICC ya que el anticuerpo para Sox2 no distingue entre la proteína endógena y la proteína generada mediante la expresión ectópica.

3.2.2 Transfección con Eya1/Six1

En el oído interno, Eya1 y Six1 se expresan durante las distintas etapas del desarrollo: desde la placoda ótica, continuando en la zona ventral de la VO y neuroblastos hasta quedar restringidos a las CC de los epitelios sensoriales del oído interno (Wong y cols., 2012). Junto a Sox2, se expresan en la parte ventral de la copa ótica a E8,5 y en el futuro ducto coclear en E11,5. Six1 tiene un gradiente de expresión temporal similar al de Atoh1 pero un poco adelantado, lo que sugiere que puede actuar como regulador positivo de la expresión de Atoh1 y por tanto de la diferenciación de las CC (Ahmed y cols., 2012a). Según el trabajo de Ahmed y cols., (2012a), la transfección de células no sensoriales del epitelio auditivo con Eya1 y Six1 produce la formación de CC ectópicas. Eya1 y Six1 puede actuar activando la transcripción de Atoh1, pero parece necesaria la presencia de Sox2 en la célula, al menos al inicio del proceso para que la diferenciación pueda llevarse a cabo.

En cultivos de células NIH/3T3 vimos que la transfección con Eya1 y Six1 no modificó la expresión de marcadores de CC. Pero sabiendo que la expresión basal de Sox2 en estas células es muy baja, la falta de Sox2 puede ser la causa de que la sobreexpresión de Eya1+Six1 en NIH/3t3 no tenga el efecto esperado. Sin embargo, sí que se detectó un aumento en la expresión de Sox2 a nivel de ARNm y proteína. En Zou y cols (2008) ya se observó una relación directa entre Eya1 y Sox2, ya que en ratones nulos o hipomórficos para Eya1, la expresión de Sox2 disminuye en la VO. En el estudio de Ahmed y cols. (2012a), sin embargo, no se determinó qué efecto tenían Eya1 y/o Six1 sobre la expresión de Sox2 en el epitelio coclear, ya que en este tejido ya se expresa. En otro trabajo de los mismos autores (Ahmed y cols., 2012b) la sobreexpresión de Eya1/Six1 en NIH/3T3 indujo la expresión de Ngn1 pero no se analizó la expresión de Sox2. No obstante, para que tenga lugar la neurogénesis en el oído interno, es necesario que haya un aumento de expresión de Sox2 ya que este factor activa la expresión de Ngn1 (Puligilla y cols., 2010; Evsen y cols., 2013). Por lo tanto, se podría pensar que para que se induzca la expresión de Ngn1 en las células NIH/3T3, la transfección con Eya1/Six1 tiene que incrementar la expresión de Sox2, que es lo que nosotros observamos. En resumen, aunque Eya1/Six1 inducen la expresión de Sox2 en las células NIH/3T3, podemos decir que la presencia de estos tres factores no es suficiente para inducir la expresión de marcadores de CC. Debe haber otros factores en el epitelio no sensorial que intervienen en la activación de Atoh1 y que no están presentes en las células NIH/3T3 transfectadas con Eya1 y Six1.

3.3 Los fibroblastos humanos y de ratón no responden a los tratamientos empleados con las CMMh para obtener PN

En la literatura encontramos ejemplos de generación de PN a partir de fibroblastos humanos (Page y cols., 2009), pero por lo general se basan en el empleo de transgenes o a partir de células iPS (Zou y cols., 2014; Yoo y cols., 2011). La reprogramación sin

transgenes, empleando factores de crecimiento y otras moléculas de señalización, se ha empleado para convertir células del mismo linaje, por ejemplo la conversión de progenitor linfoide a progenitor mieloide mediante la adición de citoquinas al medio de cultivo (Kondo y cols., 2000), pero también para reprogramar fibroblastos a neuronas diferenciadas o inducir la expresión de genes de pluripotencia (Page y cols., 2009; Wang y cols., 2011). Aunque estos mecanismos no tienen la misma eficiencia que otros métodos que utilizan la sobreexpresión de factores de transcripción mediante transgenes, evitan los problemas derivados del uso de genes externos como inserciones azarosas en el genoma de la célula o la dificultad de algunas células para ser transfectadas. Sin embargo, la respuesta de las células a las moléculas de señalización está limitada a la existencia de receptores adecuados en la célula inicial. En el caso de los fibroblastos humanos derivados de piel, ya se ha comentado que presentan muchas similitudes con las CMMh y que responden de un modo similar a ciertos protocolos de diferenciación (Lorenz y cols., 2008; Alt y cols., 2011; Brohem y cols., 2013). Además, presentan receptores para responder a una gran variedad de factores de crecimiento y otras moléculas de señalización (Tsou y cols., 1994; Root y Shipley, 2000; Shiraha y cols., 2000; Narine y cols., 2006; Palazzo y cols., 2012). De este modo, quisimos comprobar si los métodos para generar un PN a partir de CMMh eran igualmente efectivos en los fibroblastos humanos. Por otro lado, el cultivo en forma de esferas favorece la expresión de factores de reprogramación (Su y cols., 2013). Sin embargo, en las esferas formadas a partir de fibroblastos dérmicos humanos siguiendo los procedimientos empleados con las CMMh no se indujo la expresión del factor de transcripción Sox2, de lo que se deduce que estas células no tienen la misma plasticidad de las CMMh o no responden igual a ciertas señales, a pesar de tener muchas características en común.

3.4 Efecto del agente desmetilante del ADN 5azadC en la expresión de genes de pluripotencia y del linaje ótico en los fibroblastos de ratón NIH/3T3.

3.4.1 Regulación transcripcional de los genes de la línea celular NIH3T3 mediante 5azadC

El desarrollo de los organismos y la diferenciación celular hacia un tejido concreto se asocia con la desmetilación y metilación del ADN genómico. Las secuencias no génicas del genoma, como las secuencias repetitivas, se encuentran densamente metiladas, y su activación provoca inestabilidad genómica que causa muerte celular y mutaciones (Jaenisch y Bird, 2003). Dentro de las secuencias génicas, existen patrones de metilación dependiendo del tejido o tipo celular, que son los que nos interesan en este trabajo.

La regulación transcripcional de los genes mediante metilación consiste generalmente en la metilación de islas CpG de los promotores de los genes o de secuencias potenciadoras o silenciadoras, afectando a la expresión de estos (Li, 2002). El estado epigenético de las

regiones metiladas dependiendo del tejido está regulado por la interacción entre metiltransferasas de ADN, enzimas de modificación de histonas y proteínas nucleares, entre otros mecanismos (Ikegami y cols., 2009). Por ello, el uso de agentes que modifican estos procesos es una herramienta empleada frecuentemente para inducir o facilitar la reprogramación celular. Un ejemplo de estos compuestos son el 5azadC, que bloquea la acción de las dimetiltransferasas de ADN, o la Tricostatina A (TSA) y el ácido valproico, que son inhibidores de las deacetilasas de histonas (Jaenisch y Bird, 2003; Ikegami y cols., 2009). La hipoacetilación de histonas provoca una mayor condensación de la cromatina por lo que ambos tipos de compuestos se suelen combinar en estudios de activación de expresión génica.

Al comenzar el estudio del efecto del 5azadC en los fibroblastos fue muy importante establecer una concentración no tóxica de 5azadC. Está descrito que el compuesto 5azadC tiene una doble acción, ya que a dosis bajas induce hipometilación de ciertos genes mientras que en concentraciones altas es citotóxico (Lim y cols., 2010). Esto puede deberse a que a mayor concentración la desmetilación de las secuencias cortas repetitivas que hay en el genoma aumenta, provocando inestabilidad genómica y activación de genes proapoptóticos (Wang y cols., 2005; Lim y cols., 2010; Mukherjee y cols., 2010). En este trabajo observamos que a concentraciones altas (10-15 μM) se observó una gran muerte celular tanto en los cultivos de fibroblastos humanos como de ratón. En las células NIH/3T3 está descrito que concentraciones entre 1 y 10 μM inducen una fuerte desmetilación de secuencias repetitivas del genoma, además de afectar a la supervivencia celular (Lim y cols., 2010), mientras que en otras células no se ha observado toxicidad para esas concentraciones de 5azadC (Logan y cols., 2010). Por lo tanto, parece que no todos los tipos celulares se ven afectados a las mismas concentraciones de 5azadC.

Corroborando los resultados de Lim y cols., (2010), los fibroblastos NIH/3T3 cultivados en presencia de 0,1 μM de 5azadC a simple vista no presentaron cambios en la proliferación/muerte celular con respecto al control sin 5azadC, a diferencia de la muerte celular observada a 10 y 15 μM . En el medio de cultivo, junto a 5azadC se añadió LIF (Zhang y cols., 2010) que, además de mantener el estado pluripotente y proliferativo en las CME de ratón (Williams y cols., 1988), induce una respuesta mitogénica en fibroblastos de ratón (Dekanty y cols., 2006) y ayuda a la reprogramación (Tang y Tian, 2013). Además, mientras que en el trabajo de Zhang y cols. (2010) la inducción de Sox2 y Oct4 en fibroblastos NIH/3T3 sólo se consiguió combinando 5azadC y TSA, nuestros resultados mostraron que una concentración adecuada de 5azadC (0,1 μM frente a 5 y 0,01 μM en Zhang y cols., 2010) fue suficiente para aumentar la expresión de Oct4 y Sox2, que en el caso de Sox2 se tradujo también en un aumento de la expresión de la proteína. Algunos genes relacionados con el desarrollo neural y del oído aumentaron su

expresión a nivel de ARNm, como Nestina, Pax2, Gata3, Atoh1 y Brn3c. Otros genes no vieron afectada su expresión, como fue el caso de Nanog, Klf4 y Pax8.

La activación de la transcripción génica en respuesta al tratamiento con 5azadC depende del gen, de la concentración de 5azadC, del tipo celular o del momento del desarrollo (Ikegami y cols., 2009). Por ejemplo, en el trabajo de Zhang y cols. (2010), el aumento de expresión de Klf4 en fibroblastos NIH/3T3 sólo se observa con 5azadC 5 μ M y no a concentraciones inferiores. Además, en el caso de genes que ya se están expresando, éstos pueden no verse afectados, como ocurre con Oct4 en cuerpos embrionarios derivados de la línea de ratón de carcinoma embrionario P19 (Abbey y Seshagiri, 2013) o el receptor de prostaglandina E en fibroblastos pulmonares sanos (Huang y cols., 2010).

3.4.2 5azadC como potenciador de la reprogramación celular

La inducción de la expresión de Sox2 en los fibroblastos NIH/3T3 tratados con 5azadC ya significa un gran paso en relación a la reprogramación, tanto hacia una célula pluripotente como a un progenitor neural y ótico (Pevny y Nicolis, 2010; Neves y cols., 2013): Ya se ha indicado anteriormente que Sox2 es un marcador típico de células pluripotentes pero también se expresa en CM neurales, en el dominio neurosensorial de la vesícula ótica y en las células progenitoras de CC y CS. En consecuencia, Sox2 es un factor clave en la monitorización del proceso de transdiferenciación de los fibroblastos hacia células similares a CC. Oct4 por su parte, como también se ha comentado, es un marcador de pluripotencia aunque su expresión también está presente en progenitores neurales (Ilieva y Dufva, 2013). La transducción de Sox2 y Oct4, conjunta o individualmente, ha sido considerada suficiente para reprogramar distintos tipos celulares hacia células iPS (Huangfu y cols., 2008; Zhu y cols., 2010; Tsai y cols., 2011; Yuan y cols., 2011), aunque sustituyendo el resto de factores de transcripción por combinaciones de moléculas capaces de conseguir los mismos efectos mediante la inhibición de la metilación génica y cambios en el metabolismo y señalización celular (Feng y cols., 2009). Otro ejemplo es el trabajo de Ring y cols. (2012) en el que únicamente sobreexpresando Sox2 en fibroblastos embrionarios de ratón y exponiendo las células a factores de crecimiento se logran obtener PN multipotentes. Esta aproximación se asemejaría más a nuestro objetivo, ya que tras el tratamiento de los fibroblastos NIH/3T3 con 5azadC tenemos una población celular que expresa genes de pluripotencia (Oct4 y Sox2). En estos cultivos se podría estudiar el efecto de distintos factores de crecimiento sobre la expresión de otros marcadores de PN y óticos y continuar con la diferenciación hacia CC.

El hecho de que algunos genes del desarrollo temprano y tardío del oído también se expresen en las células NIH/3T3 en presencia de 5azadC no implica que se estén traduciendo las proteínas. Sin embargo, la activación transcripcional de algunos de los genes típicos de progenitores óticos es un paso importante en el desarrollo de un

protocolo de transdiferenciación de fibroblastos a CC. Así, 5azadC empleado conjuntamente con otras herramientas de diferenciación, como el cultivo en presencia de factores de crecimiento y moléculas de señalización, o la transfección con factores de transcripción pro-óticos facilitaría la diferenciación de fibroblastos a CC. Este efecto se ha observado, por ejemplo, en la diferenciación de células estromales del ligamento periodontal a miocitos (Song y cols., 2012), donde el pretratamiento con 5azadC desmetila el ADN de genes que codifican para factores de transcripción específicos del músculo y promueve la posterior diferenciación de las células estromales en un medio de inducción miogénica.

Por otro lado, el uso de inhibidores de metiltransferasas de ADN mejora la eficiencia de producción de células iPS, indicando que la metilación del ADN es una barrera epigenética importante a la hora de conseguir una reprogramación completa (Feng y cols., 2009). En fibroblastos porcinos, la combinación de 5azadC y TSA antes de la sobreexpresión de factores de transcripción ayuda a mantener la expresión de los transgenes (Kong y cols., 2011) y también podría aumentar la capacidad de estos factores transfectados para inducir la diferenciación de las células tratadas, ya que los cambios en la estructura de la cromatina dejarían más accesibles las secuencias reguladoras de la expresión génica.

3.5 La elección del tipo de fibroblasto adecuado para los estudios de diferenciación. Ventajas e inconvenientes de los fibroblastos primarios humanos y las líneas celulares de ratón.

Dada su similitud con las CMMh y la facilidad de obtención de muestras autólogas, inicialmente nos propusimos trabajar con cultivos primarios de fibroblastos humanos para estudiar su capacidad de diferenciación hacia células similares a CC. Sin embargo, estas células presentan ciertos inconvenientes que dificultan la realización de los experimentos de diferenciación como por ejemplo un bajo rendimiento de transfección.

Por lo tanto, las líneas celulares de fibroblastos de ratón NIH/3T3 y 3T3 Swiss albino surgieron como una opción más eficaz para realizar estos estudios. Como líneas celulares, se mantienen estables durante muchos pases sin mostrar signos de senescencia. Por otro lado, comparado con las células humanas, existen mejores herramientas como, por ejemplo, una gran variedad de anticuerpos funcionales disponibles para los estudios de expresión de proteínas. Otra ventaja es el buen conocimiento del proceso de desarrollo del oído y de los factores de crecimiento que intervienen en el ratón. Dentro de las líneas celulares de fibroblastos de ratón también existen diferencias prácticas (Copeland y Cooper, 1979). Comparada con la línea de fibroblastos de ratón 3T3 Swiss albino, la línea NIH/3T3 presenta la gran ventaja de tener una mayor capacidad para ser transfectada con métodos lipídicos (2,3% en la línea 3T3 Swiss albino a las 24 horas frente al 26,7% en la línea NIH/3T3). Además, existe mucha literatura científica sobre este tipo de células en

relación a experimentos de diferenciación, reprogramación y estudios de expresión de transgenes, que han sido de gran utilidad para interpretar los resultados obtenidos (Dekanty y cols., 2006; Lim y cols., 2010; Zhang y cols., 2010; Ahmed y cols., 2012b; entre otros).

Las ventajas prácticas del uso de una línea celular no esconden su principal inconveniente, que es el alejamiento de un modelo más aplicable a la clínica, como sería el uso de los fibroblastos primarios humanos aislados de tejidos adultos. Además, en la literatura encontramos que, igual que con las CMM, existen diferencias entre la capacidad de diferenciación de fibroblastos de ratón y humanos. En general parece que las células de ratón se reprograman más fácilmente que las humanas (Kelaini y cols., 2014). Por ejemplo, en Vierbuchen y cols 2010, se consigue una diferenciación completa de fibroblastos de ratón a neuronas. Sin embargo, el mismo método aplicado en fibroblastos humanos embrionarios sólo consigue una diferenciación parcial (Pang y cols. 2011) y para obtener el mismo efecto se necesita introducir más genes.

Así, aunque las líneas celulares de ratón pueden ser un buen modelo para el estudio del desarrollo y regeneración de las CC, finalmente es necesario evaluar los efectos de los diferentes protocolos de diferenciación y reprogramación en células humanas para un potencial uso en procedimientos clínicos.



CONCLUSIONES

1. Respecto a la modificación génica de las células estudiadas, el método más eficiente para las CMMh es la Nucleofección. Por otra parte, la transfección con Lipofectamina permite alcanzar porcentajes de transfección satisfactorios en la línea de fibroblastos de ratón NIH/3T3.
2. Contrariamente a lo observado en las CMM de ratón, la sobreexpresión en CMMh de Atoh1, no induce su diferenciación hacia CC, sino que lleva a un proceso de muerte celular.
3. La sobreexpresión de los genes Atoh1 y Sox2 en NIH/3T3, aunque no aumenta la expresión de Miosina7a, es suficiente para inducir la expresión de genes típicamente expresados en CC.
4. Aplicando varios protocolos a los cultivos de CMMh se han obtenido células con características de PN, que expresan Sox2 y Nestina. Este paso es crítico para diferenciar las CMMh hacia células del linaje ótico. Por otra parte, ninguno de estos métodos ha permitido obtener PN a partir de cultivos de fibroblastos.
5. Distintos métodos de inducción neural generan diferentes poblaciones de PN, que responden de forma distinta a tratamientos posteriores de diferenciación.
6. El tratamiento con AR y EGF de PN obtenidos a partir de esferas formadas en medio sin suero induce la expresión de marcadores de CC.
7. Los PN obtenidos en presencia de AR pueden diferenciarse y expresar marcadores de neuronas sensoriales cuando se cultivan en presencia de Shh y bFGF. El co-cultivo de las esferas formadas en medio sin suero con explantes cocleares también favorece la expresión de marcadores neuronales.
8. Bajas concentraciones del agente inhibidor de las dimetiltransferasas de ADN 5azadC activan en NIH/3T3 la transcripción de genes relacionados con la pluripotencia y con el desarrollo del oído. Este tratamiento se presenta como un buen punto de partida para la reprogramación de estas células a CC.
9. Los datos obtenidos en este trabajo, así como la bibliografía consultada, apuntan a la existencia de diferencias importantes en la respuesta de CMM y fibroblastos de humanos y roedores a factores de diferenciación y otros estímulos. Por lo tanto, a pesar de las ventajas prácticas de los modelos celulares murinos, es de gran importancia hacer estudios en células humanas para evaluar el potencial uso de las CMM y los fibroblastos en terapias regenerativas.



BIBLIOGRAFÍA

- Abbey, D. y Seshagiri, P.B. (2013) Aza-Induced Cardiomyocyte Differentiation of P19 EC-Cells by Epigenetic Co-Regulation and ERK Signaling. *Gene*, 526 (2), pp. 364-373.
- Abello, G., Khatri, S., Radosevic, M., Scotting, P.J., Giraldez, F. y Alsina, B. (2010) Independent Regulation of Sox3 and Lmx1b by FGF and BMP Signaling Influences the Neurogenic and Non-Neurogenic Domains in the Chick Otic Placode. *Dev.Biol.*, 339 (1), pp. 166-178.
- Agterberg, M.J., Versnel, H., van Dijk, L.M., de Groot, J.C. y Klis, S.F. (2009) Enhanced Survival of Spiral Ganglion Cells After Cessation of Treatment with Brain-Derived Neurotrophic Factor in Deafened Guinea Pigs. *J.Assoc.Res.Otolaryngol.*, 10 (3), pp. 355-367.
- Agterberg, M.J., Versnel, H., de Groot, J.C., van den Broek, M. y Klis, S.F. (2010) Chronic Electrical Stimulation does Not Prevent Spiral Ganglion Cell Degeneration in Deafened Guinea Pigs. *Hear.Res.*, 269 (1-2), pp. 169-179.
- Ahmed, M., Wong, E.Y., Sun, J., Xu, J., Wang, F. y Xu, P.X. (2012a) Eya1-Six1 Interaction is Sufficient to Induce Hair Cell Fate in the Cochlea by Activating Atoh1 Expression in Cooperation with Sox2. *Dev.Cell.*, 22 (2), pp. 377-390.
- Ahmed, M., Xu, J. y Xu, P.X. (2012b) EYA1 and SIX1 Drive the Neuronal Developmental Program in Cooperation with the SWI/SNF Chromatin-Remodeling Complex and SOX2 in the Mammalian Inner Ear. *Development*, 139 (11), pp. 1965-1977.
- Ahn, K.S., Jeon, S.J., Jung, J.Y., Kim, Y.S., Kang, J.H., Shin, S., Choi, T., Choi, S.J., Chung, P. y Shim, H. (2008) Isolation of Embryonic Stem Cells from Enhanced Green Fluorescent Protein-Transgenic Mouse and their Survival in the Cochlea After Allotransplantation. *Cytotherapy*, 10 (7), pp. 759-769.
- Alt, E., Yan, Y., Gehmert, S., Song, Y.H., Altman, A., Gehmert, S., Vykoukal, D. y Bai, X. (2011) Fibroblasts Share Mesenchymal Phenotypes with Stem Cells, but Lack their Differentiation and Colony-Forming Potential. *Biol.Cell.*, 103 (4), pp. 197-208.
- Altschuler, R.A., O'Shea, K.S. y Miller, J.M. (2008) Stem Cell Transplantation for Auditory Nerve Replacement. *Hear.Res.*, 242 (1-2), pp. 110-116.
- Aluigi, M., Fogli, M., Curti, A., Isidori, A., Gruppioni, E., Chiodoni, C., Colombo, M.P., Versura, P., D'Errico-Grigioni, A., Ferri, E., Baccarani, M. y Lemoli, R.M. (2006) Nucleofection is an Efficient Nonviral Transfection Technique for Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 24 (2), pp. 454-461.
- Angeli, S., Lin, X. y Liu, X.Z. (2012) Genetics of Hearing and Deafness. *Anat.Rec.(Hoboken)*, 295 (11), pp. 1812-1829.
- Archer, T.C., Jin, J. y Casey, E.S. (2011) Interaction of Sox1, Sox2, Sox3 and Oct4 during Primary Neurogenesis. *Dev.Biol.*, 350 (2), pp. 429-440.
- Bae, K.S., Park, J.B., Kim, H.S., Kim, D.S., Park, D.J. y Kang, S.J. (2011) Neuron-Like Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Yonsei Med.J.*, 52 (3), pp. 401-412.
- Baksh, D., Yao, R. y Tuan, R.S. (2007) Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. *Stem Cells*, 25 (6), pp. 1384-1392.
- Balasubramanian, S., Thej, C., Venugopal, P., Priya, N., Zakaria, Z., Sundarraj, S. y Majumdar, A.S. (2013) Higher Propensity of Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stromal Cells Towards Neuronal Lineage in Comparison to those Derived from Adipose and Bone Marrow. *Cell Biol.Int.*, 37 (5), pp. 507-515.

- Bartkowska, K., Turlejski, K. y Djavadian, R.L. (2010) Neurotrophins and their Receptors in Early Development of the Mammalian Nervous System. *Acta Neurobiol.Exp.(Wars)*, 70 (4), pp. 454-467.
- Bas, E., Van De Water, T.R., Gupta, C., Dinh, J., Vu, L., Martinez-Soriano, F., Lainez, J.M. y Marco, J. (2012) Efficacy of Three Drugs for Protecting Against Gentamicin-Induced Hair Cell and Hearing Losses. *Br.J.Pharmacol.*, 166 (6), pp. 1888-1904.
- Batts, S.A., Shoemaker, C.R. y Raphael, Y. (2009) Notch Signaling and Hes Labeling in the Normal and Drug-Damaged Organ of Corti. *Hear.Res.*, 249 (1-2), pp. 15-22.
- Bell, D., Streit, A., Gorospe, I., Varela-Nieto, I., Alsina, B. y Giraldez, F. (2008) Spatial and Temporal Segregation of Auditory and Vestibular Neurons in the Otic Placode. *Dev.Biol.*, 322 (1), pp. 109-120.
- Bermingham, N.A., Hassan, B.A., Price, S.D., Vollrath, M.A., Ben-Arie, N., Eatock, R.A., Bellen, H.J., Lysakowski, A. y Zoghbi, H.Y. (1999) Math1: An Essential Gene for the Generation of Inner Ear Hair Cells. *Science*, 284 (5421), pp. 1837-1841.
- Bi, Y., Gong, M., Zhang, X., Zhang, X., Jiang, W., Zhang, Y., Chen, J., Liu, Y., He, T.C. y Li, T. (2010) Pre-Activation of Retinoid Signaling Facilitates Neuronal Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Dev.Growth Differ.*, 52 (5), pp. 419-431.
- Boddy, S.L., Chen, W., Romero-Guevara, R., Kottam, L., Bellantuono, I. y Rivolta, M.N. (2012) Inner Ear Progenitor Cells can be Generated in Vitro from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Regen.Med.*, 7 (6), pp. 757-767.
- Bodmer, D. (2008) Protection, Regeneration and Replacement of Hair Cells in the Cochlea: Implications for the Future Treatment of Sensorineural Hearing Loss. *Swiss Med.Wkly.*, 138 (47-48), pp. 708-712.
- Bok, J., Chang, W. y Wu, D.K. (2007a) Patterning and Morphogenesis of the Vertebrate Inner Ear. *Int.J.Dev.Biol.*, 51 (6-7), pp. 521-533.
- Bok, J., Dolson, D.K., Hill, P., Ruther, U., Epstein, D.J. y Wu, D.K. (2007b) Opposing Gradients of Gli Repressor and Activators Mediate Shh Signaling Along the Dorsoroventral Axis of the Inner Ear. *Development*, 134 (9), pp. 1713-1722.
- Bok, J., Raft, S., Kong, K.A., Koo, S.K., Drager, U.C. y Wu, D.K. (2011) Transient Retinoic Acid Signaling Confers Anterior-Posterior Polarity to the Inner Ear. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 108 (1), pp. 161-166.
- Bok, J., Zenczak, C., Hwang, C.H. y Wu, D.K. (2013) Auditory Ganglion Source of Sonic Hedgehog Regulates Timing of Cell Cycle Exit and Differentiation of Mammalian Cochlear Hair Cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 110 (34), pp. 13869-13874.
- Bonab, M.M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S.H., Ghavamzadeh, A. y Nikbin, B. (2006) Aging of Mesenchymal Stem Cell in Vitro. *BMC Cell Biol.*, 7, pp. 14.
- Bonilla, S., Silva, A., Valdes, L., Geijo, E., Garcia-Verdugo, J.M. y Martinez, S. (2005) Functional Neural Stem Cells Derived from Adult Bone Marrow. *Neuroscience*, 133 (1), pp. 85-95.
- Bouchard, M., de Caprona, D., Busslinger, M., Xu, P. y Fritzscht, B. (2010) Pax2 and Pax8 Cooperate in Mouse Inner Ear Morphogenesis and Innervation. *BMC Dev.Biol.*, 10, pp. 89-213X-10-89.
- Bramhall, N.F., Shi, F., Arnold, K., Hochedlinger, K. y Edge, A.S. (2014) Lgr5-Positive Supporting Cells Generate New Hair Cells in the Postnatal Cochlea. *Stem Cell.Reports*, 2 (3), pp. 311-322.

- Braunstein, E.M., Crenshaw, E.B., 3rd, Morrow, B.E. y Adams, J.C. (2008) Cooperative Function of Tbx1 and Brn4 in the Periotic Mesenchyme is Necessary for Cochlea Formation. *J.Assoc.Res.Otolaryngol.*, 9 (1), pp. 33-43.
- Brohem, C.A., de Carvalho, C.M., Radoski, C.L., Santi, F.C., Baptista, M.C., Swinka, B.B., de A Urban, C., de Araujo, L.R., Graf, R.M., Feferman, I.H. y Lorencini, M. (2013) Comparison between Fibroblasts and Mesenchymal Stem Cells Derived from Dermal and Adipose Tissue. *Int.J.Cosmet.Sci.*, 35 (5), pp. 448-457.
- Brohlin, M., Kingham, P.J., Novikova, L.N., Novikov, L.N. y Wiberg, M. (2012) Aging Effect on Neurotrophic Activity of Human Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*, 7 (9), pp. e45052.
- Brown, A.S. y Epstein, D.J. (2011) Otic Ablation of Smoothed Reveals Direct and Indirect Requirements for Hedgehog Signaling in Inner Ear Development. *Development*, 138 (18), pp. 3967-3976.
- Bryant, J., Goodyear, R.J. y Richardson, G.P. (2002) Sensory Organ Development in the Inner Ear: Molecular and Cellular Mechanisms. *Br.Med.Bull.*, 63, pp. 39-57.
- Budenz, C.L., Pflugst, B.E. y Raphael, Y. (2012) The use of Neurotrophin Therapy in the Inner Ear to Augment Cochlear Implantation Outcomes. *Anat.Rec.(Hoboken)*, 295 (11), pp. 1896-1908.
- Burton, Q., Cole, L.K., Mulheisen, M., Chang, W. y Wu, D.K. (2004) The Role of Pax2 in Mouse Inner Ear Development. *Dev.Biol.*, 272 (1), pp. 161-175.
- Caddick, J., Kingham, P.J., Gardiner, N.J., Wiberg, M. y Terenghi, G. (2006) Phenotypic and Functional Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Differentiated Along a Schwann Cell Lineage. *Glia*, 54 (8), pp. 840-849.
- Cafaro, J., Lee, G.S. y Stone, J.S. (2007) Atoh1 Expression Defines Activated Progenitors and Differentiating Hair Cells during Avian Hair Cell Regeneration. *Dev.Dyn.*, 236 (1), pp. 156-170.
- Cashman, T.J., Gouon-Evans, V. y Costa, K.D. (2013) Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Therapy: Practical Challenges and Potential Mechanisms. *Stem Cell.Rev.*, 9 (3), pp. 254-265.
- Chambers, I. y Tomlinson, S.R. (2009) The Transcriptional Foundation of Pluripotency. *Development*, 136 (14), pp. 2311-2322.
- Chambers, S.M. y Studer, L. (2011) Cell Fate Plug and Play: Direct Reprogramming and Induced Pluripotency. *Cell*, 145 (6), pp. 827-830.
- Chen, P., Johnson, J.E., Zoghbi, H.Y. y Segil, N. (2002) The Role of Math1 in Inner Ear Development: Uncoupling the Establishment of the Sensory Primordium from Hair Cell Fate Determination. *Development*, 129 (10), pp. 2495-2505.
- Chen, W., Cacciabue-Rivolta, D.I., Moore, H.D. y Rivolta, M.N. (2007) The Human Fetal Cochlea can be a Source for Auditory progenitors/stem Cells Isolation. *Hear.Res.*, 233 (1-2), pp. 23-29.
- Chen, W., Johnson, S.L., Marcotti, W., Andrews, P.W., Moore, H.D. y Rivolta, M.N. (2009) Human Fetal Auditory Stem Cells can be Expanded in Vitro and Differentiate into Functional Auditory Neurons and Hair Cell-Like Cells. *Stem Cells*, 27 (5), pp. 1196-1204.
- Chen, W., Jongkamonwiwat, N., Abbas, L., Eshtan, S.J., Johnson, S.L., Kuhn, S., Milo, M., Thurlow, J.K., Andrews, P.W., Marcotti, W., Moore, H.D. y Rivolta, M.N. (2012) Restoration of Auditory Evoked Responses by Human ES-Cell-Derived Otic Progenitors. *Nature*, 490 (7419), pp. 278-282.

- Chonko, K.T., Jahan, I., Stone, J., Wright, M.C., Fujiyama, T., Hoshino, M., Fritzsich, B. y Maricich, S.M. (2013) Atoh1 Directs Hair Cell Differentiation and Survival in the Late Embryonic Mouse Inner Ear. *Dev.Biol.*, 381 (2), pp. 401-410.
- Cimadamore, F., Fishwick, K., Giusto, E., Gnedeva, K., Cattarossi, G., Miller, A., Pluchino, S., Brill, L.M., Bronner-Fraser, M. y Terskikh, A.V. (2011) Human ESC-Derived Neural Crest Model Reveals a Key Role for SOX2 in Sensory Neurogenesis. *Cell.Stem Cell.*, 8 (5), pp. 538-551.
- Coleman, B., Hardman, J., Coco, A., Epp, S., de Silva, M., Crook, J. y Shepherd, R. (2006) Fate of Embryonic Stem Cells Transplanted into the Deafened Mammalian Cochlea. *Cell Transplant.*, 15 (5), pp. 369-380.
- Coleman, B., Fallon, J.B., Pettingill, L.N., de Silva, M.G. y Shepherd, R.K. (2007) Auditory Hair Cell Explant Co-Cultures Promote the Differentiation of Stem Cells into Bipolar Neurons. *Exp.Cell Res.*, 313 (2), pp. 232-243.
- Copeland, N.G. y Cooper, G.M. (1979) Transfection by Exogenous and Endogenous Murine Retrovirus DNAs. *Cell*, 16 (2), pp. 347-356.
- Corrales, C.E., Pan, L., Li, H., Liberman, M.C., Heller, S. y Edge, A.S. (2006) Engraftment and Differentiation of Embryonic Stem Cell-Derived Neural Progenitor Cells in the Cochlear Nerve Trunk: Growth of Processes into the Organ of Corti. *J.Neurobiol.*, 66 (13), pp. 1489-1500.
- Corwin, J.T. y Cotanche, D.A. (1988) Regeneration of Sensory Hair Cells After Acoustic Trauma. *Science*, 240 (4860), pp. 1772-1774.
- Cotanche, D.A. y Kaiser, C.L. (2010) Hair Cell Fate Decisions in Cochlear Development and Regeneration. *Hear.Res.*, 266 (1-2), pp. 18-25.
- Cox, B.C., Chai, R., Lenoir, A., Liu, Z., Zhang, L., Nguyen, D.H., Chalasani, K., Steigelman, K.A., Fang, J., Cheng, A.G. y Zuo, J. (2014) Spontaneous Hair Cell Regeneration in the Neonatal Mouse Cochlea in Vivo. *Development*, 141 (4), pp. 816-829.
- Cox, J.L. y Rizzino, A. (2010) Induced Pluripotent Stem Cells: What Lies Beyond the Paradigm Shift. *Exp.Biol.Med.(Maywood)*, 235 (2), pp. 148-158.
- Dabdoub, A., Puligilla, C., Jones, J.M., Fritzsich, B., Cheah, K.S., Pevny, L.H. y Kelley, M.W. (2008) Sox2 Signaling in Prosensory Domain Specification and Subsequent Hair Cell Differentiation in the Developing Cochlea. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 105 (47), pp. 18396-18401.
- De Filippis, L. y Binda, E. (2012) Concise Review: Self-Renewal in the Central Nervous System: Neural Stem Cells from Embryo to Adult. *Stem Cells Transl.Med.*, 1 (4), pp. 298-308.
- Dechesne, C.J., Rabejac, D. y Desmadryl, G. (1994) Development of Calretinin Immunoreactivity in the Mouse Inner Ear. *J.Comp.Neurol.*, 346 (4), pp. 517-529.
- Dekanty, A., Sauane, M., Cadenas, B., Coluccio, F., Barrio, M., Casala, J., Paciencia, M., Rogers, F., Coso, O.A., Piwien-Pilipuk, G., Rudland, P.S. y de Asua, L.J. (2006) Leukemia Inhibitory Factor Induces DNA Synthesis in Swiss Mouse 3T3 Cells Independently of Cyclin D1 Expression through a Mechanism Involving MEK/ERK1/2 Activation. *J.Biol.Chem.*, 281 (10), pp. 6136-6143.
- Delorme, B., Nivet, E., Gaillard, J., Haupl, T., Ringe, J., Deveze, A., Magnan, J., Sohier, J., Khrestchatsky, M., Roman, F.S., Charbord, P., Sensebe, L., Layrolle, P. y Feron, F. (2010) The Human Nose Harbors a Niche of Olfactory Ectomesenchymal Stem Cells Displaying Neurogenic and Osteogenic Properties. *Stem Cells Dev.*, 19 (6), pp. 853-866.

- Diaz, D., Lepousez, G., Gheusi, G., Alonso, J.R., Lledo, P.M. y Weruaga, E. (2012) Bone Marrow Cell Transplantation Restores Olfaction in the Degenerated Olfactory Bulb. *J.Neurosci.*, 32 (26), pp. 9053-9058.
- Doetzlhofer, A., White, P.M., Johnson, J.E., Segil, N. y Groves, A.K. (2004) In Vitro Growth and Differentiation of Mammalian Sensory Hair Cell Progenitors: A Requirement for EGF and Periotic Mesenchyme. *Dev.Biol.*, 272 (2), pp. 432-447.
- Doetzlhofer, A., Basch, M.L., Ohyama, T., Gessler, M., Groves, A.K. y Segil, N. (2009) Hey2 Regulation by FGF Provides a Notch-Independent Mechanism for Maintaining Pillar Cell Fate in the Organ of Corti. *Dev.Cell.*, 16 (1), pp. 58-69.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. y Horwitz, E. (2006) Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. the International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*, 8 (4), pp. 315-317.
- Doyle, K.L., Kazda, A., Hort, Y., McKay, S.M. y Oleskevich, S. (2007) Differentiation of Adult Mouse Olfactory Precursor Cells into Hair Cells in Vitro. *Stem Cells*, 25 (3), pp. 621-627.
- Driver, E.C., Pryor, S.P., Hill, P., Turner, J., Ruther, U., Biesecker, L.G., Griffith, A.J. y Kelley, M.W. (2008) Hedgehog Signaling Regulates Sensory Cell Formation and Auditory Function in Mice and Humans. *J.Neurosci.*, 28 (29), pp. 7350-7358.
- Dutta, D. (2013) Signaling Pathways Dictating Pluripotency in Embryonic Stem Cells. *Int.J.Dev.Biol.*, 57 (9-10), pp. 667-675.
- Edalatmanesh, M.A., Bahrami, A.R., Hosseini, E., Hosseini, M. y Khatamsaz, S. (2011) Neuroprotective Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Animal Model of Cerebellar Degeneration. *Neurol.Res.*, 33 (9), pp. 913-920.
- Evsen, L., Sugahara, S., Uchikawa, M., Kondoh, H. y Wu, D.K. (2013) Progression of Neurogenesis in the Inner Ear Requires Inhibition of Sox2 Transcription by neurogenin1 and neurod1. *J.Neurosci.*, 33 (9), pp. 3879-3890.
- Ewert, D.L., Lu, J., Li, W., Du, X., Floyd, R. y Kopke, R. (2012) Antioxidant Treatment Reduces Blast-Induced Cochlear Damage and Hearing Loss. *Hear.Res.*, 285 (1-2), pp. 29-39.
- Fairchild, P.J., Robertson, N.J., Minger, S.L. y Waldmann, H. (2007) Embryonic Stem Cells: Protecting Pluripotency from Alloreactivity. *Curr.Opin.Immunol.*, 19 (5), pp. 596-602.
- Fekete, D.M. y Wu, D.K. (2002) Revisiting Cell Fate Specification in the Inner Ear. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 12 (1), pp. 35-42.
- Feng, B., Ng, J.H., Heng, J.C. y Ng, H.H. (2009) Molecules that Promote Or Enhance Reprogramming of Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell.Stem Cell.*, 4 (4), pp. 301-312.
- Ford, H.L., Kabingu, E.N., Bump, E.A., Mutter, G.L. y Pardee, A.B. (1998) Abrogation of the G2 Cell Cycle Checkpoint Associated with Overexpression of HSIX1: A Possible Mechanism of Breast Carcinogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95 (21), pp. 12608-12613.
- Fraichard, A., Chassande, O., Bilbaut, G., Dehay, C., Savatier, P. y Samarut, J. (1995) In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells into Glial Cells and Functional Neurons. *J.Cell.Sci.*, 108 (Pt 10) (Pt 10), pp. 3181-3188.

- Fransson, A., Maruyama, J., Miller, J.M. y Ulfendahl, M. (2010) Post-Treatment Effects of Local GDNF Administration to the Inner Ears of Deafened Guinea Pigs. *J.Neurotrauma*, 27 (9), pp. 1745-1751.
- Frenz, D.A., Liu, W., Cvekl, A., Xie, Q., Wassef, L., Quadro, L., Niederreither, K., Maconochie, M. y Shanske, A. (2010) Retinoid Signaling in Inner Ear Development: A "Goldilocks" Phenomenon. *Am.J.Med.Genet.A.*, 152A (12), pp. 2947-2961.
- Freter, S., Muta, Y., Mak, S.S., Rinkwitz, S. y Ladher, R.K. (2008) Progressive Restriction of Otic Fate: The Role of FGF and Wnt in Resolving Inner Ear Potential. *Development*, 135 (20), pp. 3415-3424.
- Freyer, L., Aggarwal, V. y Morrow, B.E. (2011) Dual Embryonic Origin of the Mammalian Otic Vesicle Forming the Inner Ear. *Development*, 138 (24), pp. 5403-5414.
- Gillespie, L.N., Clark, G.M., Bartlett, P.F. y Marzella, P.L. (2003) BDNF-Induced Survival of Auditory Neurons in Vivo: Cessation of Treatment Leads to Accelerated Loss of Survival Effects. *J.Neurosci.Res.*, 71 (6), pp. 785-790.
- Gillespie, L.N., Clark, G.M. y Marzella, P.L. (2004) Delayed Neurotrophin Treatment Supports Auditory Neuron Survival in Deaf Guinea Pigs. *Neuroreport*, 15 (7), pp. 1121-1125.
- Gillespie, L.N. y Shepherd, R.K. (2005) Clinical Application of Neurotrophic Factors: The Potential for Primary Auditory Neuron Protection. *Eur.J.Neurosci.*, 22 (9), pp. 2123-2133.
- Gong, M., Bi, Y., Jiang, W., Zhang, Y., Chen, L., Hou, N., Chen, J. y Li, T. (2013) Retinoic Acid Receptor Beta Mediates all-Trans Retinoic Acid Facilitation of Mesenchymal Stem Cells Neuronal Differentiation. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 45 (4), pp. 866-875.
- Greene, C.A., Chang, C.Y., Fraser, C.J., Nelidova, D.E., Chen, J.A., Lim, A., Brebner, A., McGhee, J., Sherwin, T. y Green, C.R. (2014) Cells from the Adult Corneal Stroma can be Reprogrammed to a Neuron-Like Cell using Exogenous Growth Factors. *Exp.Cell Res.*, 322 (1), pp. 122-132.
- Gresch, O., Engel, F.B., Nestic, D., Tran, T.T., England, H.M., Hickman, E.S., Korner, I., Gan, L., Chen, S., Castro-Obregon, S., Hammermann, R., Wolf, J., Muller-Hartmann, H., Nix, M., Siebenkotten, G., Kraus, G. y Lun, K. (2004) New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells. *Methods*, 33 (2), pp. 151-163.
- Grifone, R., Laclef, C., Spitz, F., Lopez, S., Demignon, J., Guidotti, J.E., Kawakami, K., Xu, P.X., Kelly, R., Petrof, B.J., Daegelen, D., Concordet, J.P. y Maire, P. (2004) Six1 and Eya1 Expression can Reprogram Adult Muscle from the Slow-Twitch Phenotype into the Fast-Twitch Phenotype. *Mol.Cell.Biol.*, 24 (14), pp. 6253-6267.
- Gubbels, S.P., Woessner, D.W., Mitchell, J.C., Ricci, A.J. y Brigande, J.V. (2008) Functional Auditory Hair Cells Produced in the Mammalian Cochlea by in Utero Gene Transfer. *Nature*, 455 (7212), pp. 537-541.
- Hackney, C.M., Mahendrasingam, S., Penn, A. y Fettiplace, R. (2005) The Concentrations of Calcium Buffering Proteins in Mammalian Cochlear Hair Cells. *J.Neurosci.*, 25 (34), pp. 7867-7875.
- Hakuba, N., Watabe, K., Hyodo, J., Ohashi, T., Eto, Y., Taniguchi, M., Yang, L., Tanaka, J., Hata, R. y Gyo, K. (2003) Adenovirus-Mediated Overexpression of a Gene Prevents Hearing Loss and Progressive Inner Hair Cell Loss After Transient Cochlear Ischemia in Gerbils. *Gene Ther.*, 10 (5), pp. 426-433.
- Han, J., Chen, L., Luo, G., Dai, B., Wang, X. y Dai, J. (2013) Three-Dimensional Culture may Promote Cell Reprogramming. *Organogenesis*, 9 (2), pp. 118-120.

- Han, Z., Yang, J.M., Chi, F.L., Cong, N., Huang, Y.B., Gao, Z. y Li, W. (2010) Survival and Fate of Transplanted Embryonic Neural Stem Cells by Atoh1 Gene Transfer in Guinea Pigs Cochlea. *Neuroreport*, 21 (7), pp. 490-496.
- Haniffa, M.A., Wang, X.N., Holtick, U., Rae, M., Isaacs, J.D., Dickinson, A.M., Hilkens, C.M. y Collin, M.P. (2007) Adult Human Fibroblasts are Potent Immunoregulatory Cells and Functionally Equivalent to Mesenchymal Stem Cells. *J.Immunol.*, 179 (3), pp. 1595-1604.
- Hans, S., Christison, J., Liu, D. y Westerfield, M. (2007) Fgf-Dependent Otic Induction Requires Competence Provided by Foxi1 and Dlx3b. *BMC Dev.Biol.*, 7, pp. 5.
- Hansen, M.R., Zha, X.M., Bok, J. y Green, S.H. (2001) Multiple Distinct Signal Pathways, Including an Autocrine Neurotrophic Mechanism, Contribute to the Survival-Promoting Effect of Depolarization on Spiral Ganglion Neurons in Vitro. *J.Neurosci.*, 21 (7), pp. 2256-2267.
- Hass, R., Kasper, C., Bohm, S. y Jacobs, R. (2011) Different Populations and Sources of Human Mesenchymal Stem Cells (MSC): A Comparison of Adult and Neonatal Tissue-Derived MSC. *Cell.Commun.Signal.*, 9, pp. 12-811X-9-12.
- Hayashi, T., Ray, C.A. y Bermingham-McDonogh, O. (2008) Fgf20 is Required for Sensory Epithelial Specification in the Developing Cochlea. *J.Neurosci.*, 28 (23), pp. 5991-5999.
- Helledie, T., Nurcombe, V. y Cool, S.M. (2008) A Simple and Reliable Electroporation Method for Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.*, 17 (4), pp. 837-848.
- Helms, A.W., Abney, A.L., Ben-Arie, N., Zoghbi, H.Y. y Johnson, J.E. (2000) Autoregulation and Multiple Enhancers Control Math1 Expression in the Developing Nervous System. *Development*, 127 (6), pp. 1185-1196.
- Helms, A.W., Gowan, K., Abney, A., Savage, T. y Johnson, J.E. (2001) Overexpression of MATH1 Disrupts the Coordination of Neural Differentiation in Cerebellum Development. *Mol.Cell.Neurosci.*, 17 (4), pp. 671-682.
- Helyer, R., Cacciabue-Rivolta, D., Davies, D., Rivolta, M.N., Kros, C.J. y Holley, M.C. (2007) A Model for Mammalian Cochlear Hair Cell Differentiation in Vitro: Effects of Retinoic Acid on Cytoskeletal Proteins and Potassium Conductances. *Eur.J.Neurosci.*, 25 (4), pp. 957-973.
- Hematti, P. (2012) Mesenchymal Stromal Cells and Fibroblasts: A Case of Mistaken Identity?. *Cytotherapy*, 14 (5), pp. 516-521.
- Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M.O., Fiedler, J., Boehm, B.O., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J., Brenner, R. y Storch, A. (2004) Efficient Generation of Neural Stem Cell-Like Cells from Adult Human Bone Marrow Stromal Cells. *J.Cell.Sci.*, 117 (Pt 19), pp. 4411-4422.
- Hermann, A., Liebau, S., Gastl, R., Fickert, S., Habisch, H.J., Fiedler, J., Schwarz, J., Brenner, R. y Storch, A. (2006) Comparative Analysis of Neuroectodermal Differentiation Capacity of Human Bone Marrow Stromal Cells using various Conversion Protocols. *J.Neurosci.Res.*, 83 (8), pp. 1502-1514.
- Hermann, A., List, C., Habisch, H.J., Vukicevic, V., Ehrhart-Bornstein, M., Brenner, R., Bernstein, P., Fickert, S. y Storch, A. (2010) Age-Dependent Neuroectodermal Differentiation Capacity of Human Mesenchymal Stromal Cells: Limitations for Autologous Cell Replacement Strategies. *Cytotherapy*, 12 (1), pp. 17-30.
- Hori, R., Nakagawa, T., Sakamoto, T., Matsuoka, Y., Takebayashi, S. y Ito, J. (2007) Pharmacological Inhibition of Notch Signaling in the Mature Guinea Pig Cochlea. *Neuroreport*, 18 (18), pp. 1911-1914.

- Hossain, W.A., Brumwell, C.L. y Morest, D.K. (2002) Sequential Interactions of Fibroblast Growth Factor-2, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin-3, and their Receptors Define Critical Periods in the Development of Cochlear Ganglion Cells. *Exp.Neurol.*, 175 (1), pp. 138-151.
- Hu, X., Huang, J., Feng, L., Fukudome, S., Hamajima, Y. y Lin, J. (2010) Sonic Hedgehog (SHH) Promotes the Differentiation of Mouse Cochlear Neural Progenitors Via the Math1-Brn3.1 Signaling Pathway in Vitro. *J.Neurosci.Res.*, 88 (5), pp. 927-935.
- Hu, Z., Wei, D., Johansson, C.B., Holmstrom, N., Duan, M., Frisen, J. y Ulfendahl, M. (2005) Survival and Neural Differentiation of Adult Neural Stem Cells Transplanted into the Mature Inner Ear. *Exp.Cell Res.*, 302 (1), pp. 40-47.
- Huang, P., He, Z., Ji, S., Sun, H., Xiang, D., Liu, C., Hu, Y., Wang, X. y Hui, L. (2011) Induction of Functional Hepatocyte-Like Cells from Mouse Fibroblasts by Defined Factors. *Nature*, 475 (7356), pp. 386-389.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W. y Melton, D.A. (2008) Induction of Pluripotent Stem Cells from Primary Human Fibroblasts with Only Oct4 and Sox2. *Nat.Biotechnol.*, 26 (11), pp. 1269-1275.
- Hwang, N.S., Zhang, C., Hwang, Y.S. y Varghese, S. (2009) Mesenchymal Stem Cell Differentiation and Roles in Regenerative Medicine. *Wiley Interdiscip.Rev.Syst.Biol.Med.*, 1 (1), pp. 97-106.
- Ieda, M., Fu, J.D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B.G. y Srivastava, D. (2010) Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors. *Cell*, 142 (3), pp. 375-386.
- Ieda, M. (2013) Direct Reprogramming into Desired Cell Types by Defined Factors. *Keio J.Med.*, 62 (3), pp. 74-82.
- Ikegami, K., Ohgane, J., Tanaka, S., Yagi, S. y Shiota, K. (2009) Interplay between DNA Methylation, Histone Modification and Chromatin Remodeling in Stem Cells and during Development. *Int.J.Dev.Biol.*, 53 (2-3), pp. 203-214.
- Ilieva, M. y Dufva, M. (2013) SOX2 and OCT4 mRNA-Expressing Cells, Detected by Molecular Beacons, Localize to the Center of Neurospheres during Differentiation. *PLoS One*, 8 (8), pp. e73669.
- Isaka, F., Ishibashi, M., Taki, W., Hashimoto, N., Nakanishi, S. y Kageyama, R. (1999) Ectopic Expression of the bHLH Gene Math1 Disturbs Neural Development. *Eur.J.Neurosci.*, 11 (7), pp. 2582-2588.
- Ishii, K., Katayama, M., Hori, K., Yodoi, J. y Nakanishi, T. (1993) Effects of 2-Mercaptoethanol on Survival and Differentiation of Fetal Mouse Brain Neurons Cultured in Vitro. *Neurosci.Lett.*, 163 (2), pp. 159-162.
- Ito, J., Kojima, K. y Kawaguchi, S. (2001) Survival of Neural Stem Cells in the Cochlea. *Acta Otolaryngol.*, 121 (2), pp. 140-142.
- Izumikawa, M., Minoda, R., Kawamoto, K., Abrashkin, K.A., Swiderski, D.L., Dolan, D.F., Brough, D.E. y Raphael, Y. (2005) Auditory Hair Cell Replacement and Hearing Improvement by Atoh1 Gene Therapy in Deaf Mammals. *Nat.Med.*, 11 (3), pp. 271-276.
- Izumikawa, M., Batts, S.A., Miyazawa, T., Swiderski, D.L. y Raphael, Y. (2008) Response of the Flat Cochlear Epithelium to Forced Expression of Atoh1. *Hear.Res.*, 240 (1-2), pp. 52-56.
- Jaenisch, R. y Bird, A. (2003) Epigenetic Regulation of Gene Expression: How the Genome Integrates Intrinsic and Environmental Signals. *Nat.Genet.*, 33 Suppl, pp. 245-254.

- Jan, T.A., Chai, R., Sayyid, Z.N., van Amerongen, R., Xia, A., Wang, T., Sinkkonen, S.T., Zeng, Y.A., Levin, J.R., Heller, S., Nusse, R. y Cheng, A.G. (2013) Tympanic Border Cells are Wnt-Responsive and can Act as Progenitors for Postnatal Mouse Cochlear Cells. *Development*, 140 (6), pp. 1196-1206.
- Jang, S., Cho, H.H., Cho, Y.B., Park, J.S. y Jeong, H.S. (2010) Functional Neural Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells using bFGF and Forskolin. *BMC Cell Biol.*, 11, pp. 25-2121-11-25.
- Jeon, S.J., Oshima, K., Heller, S. y Edge, A.S. (2007) Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells are Progenitors in Vitro for Inner Ear Hair Cells. *Mol.Cell.Neurosci.*, 34 (1), pp. 59-68.
- Jeon, S.J., Fujioka, M., Kim, S.C. y Edge, A.S. (2011) Notch Signaling Alters Sensory Or Neuronal Cell Fate Specification of Inner Ear Stem Cells. *J.Neurosci.*, 31 (23), pp. 8351-8358.
- Jiang, Y., Henderson, D., Blackstad, M., Chen, A., Miller, R.F. y Verfaillie, C.M. (2003) Neuroectodermal Differentiation from Mouse Multipotent Adult Progenitor Cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100 Suppl 1, pp. 11854-11860.
- Jin, K., Mao, X.O., Bateur, S., Sun, Y. y Greenberg, D.A. (2003) Induction of Neuronal Markers in Bone Marrow Cells: Differential Effects of Growth Factors and Patterns of Intracellular Expression. *Exp.Neurol.*, 184 (1), pp. 78-89.
- Jongkamonwiwat, N., Zine, A. y Rivolta, M.N. (2010) Stem Cell Based Therapy in the Inner Ear: Appropriate Donor Cell Types and Routes for Transplantation. *Curr.Drug Targets*, 11 (7), pp. 888-897.
- Jordan, E.T., Collins, M., Terefe, J., Ugozzoli, L. y Rubio, T. (2008) Optimizing Electroporation Conditions in Primary and Other Difficult-to-Transfect Cells. *J.Biomol.Tech.*, 19 (5), pp. 328-334.
- Junker, J.P., Sommar, P., Skog, M., Johnson, H. y Kratz, G. (2010) Adipogenic, Chondrogenic and Osteogenic Differentiation of Clonally Derived Human Dermal Fibroblasts. *Cells Tissues Organs*, 191 (2), pp. 105-118.
- Kamiya, K., Fujinami, Y., Hoya, N., Okamoto, Y., Kouike, H., Komatsuzaki, R., Kusano, R., Nakagawa, S., Satoh, H., Fujii, M. y Matsunaga, T. (2007) Mesenchymal Stem Cell Transplantation Accelerates Hearing Recovery through the Repair of Injured Cochlear Fibrocytes. *Am.J.Pathol.*, 171 (1), pp. 214-226.
- Kaneko, Y., Sakakibara, S., Imai, T., Suzuki, A., Nakamura, Y., Sawamoto, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Miyata, T. y Okano, H. (2000) Musashi1: An Evolutionally Conserved Marker for CNS Progenitor Cells Including Neural Stem Cells. *Dev.Neurosci.*, 22 (1-2), pp. 139-153.
- Kang, S.K., Putnam, L.A., Ylostalo, J., Popescu, I.R., Dufour, J., Belousov, A. y Bunnell, B.A. (2004) Neurogenesis of Rhesus Adipose Stromal Cells. *J.Cell.Sci.*, 117 (Pt 18), pp. 4289-4299.
- Kanzaki, S., Stover, T., Kawamoto, K., Prieskorn, D.M., Altschuler, R.A., Miller, J.M. y Raphael, Y. (2002) Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor and Chronic Electrical Stimulation Prevent VIII Cranial Nerve Degeneration Following Denervation. *J.Comp.Neurol.*, 454 (3), pp. 350-360.
- Kawamoto, K., Ishimoto, S., Minoda, R., Brough, D.E. y Raphael, Y. (2003) Math1 Gene Transfer Generates New Cochlear Hair Cells in Mature Guinea Pigs in Vivo. *J.Neurosci.*, 23 (11), pp. 4395-4400.
- Kawamoto, K., Izumikawa, M., Beyer, L.A., Atkin, G.M. y Raphael, Y. (2009) Spontaneous Hair Cell Regeneration in the Mouse Utricle Following Gentamicin Ototoxicity. *Hear.Res.*, 247 (1), pp. 17-26.
- Keilhoff, G., Goihl, A., Langnase, K., Fansa, H. y Wolf, G. (2006) Transdifferentiation of Mesenchymal Stem Cells into Schwann Cell-Like Myelinating Cells. *Eur.J.Cell Biol.*, 85 (1), pp. 11-24.

- Kelaini, S., Cochrane, A. y Margariti, A. (2014) Direct Reprogramming of Adult Cells: Avoiding the Pluripotent State. *Stem Cells Cloning*, 7, pp. 19-29.
- Kelly, M.C., Chang, Q., Pan, A., Lin, X. y Chen, P. (2012) Atoh1 Directs the Formation of Sensory Mosaics and Induces Cell Proliferation in the Postnatal Mammalian Cochlea in Vivo. *J.Neurosci.*, 32 (19), pp. 6699-6710.
- Kiernan, A.E., Cordes, R., Kopan, R., Gossler, A. y Gridley, T. (2005a) The Notch Ligands DLL1 and JAG2 Act Synergistically to Regulate Hair Cell Development in the Mammalian Inner Ear. *Development*, 132 (19), pp. 4353-4362.
- Kiernan, A.E., Pelling, A.L., Leung, K.K., Tang, A.S., Bell, D.M., Tease, C., Lovell-Badge, R., Steel, K.P. y Cheah, K.S. (2005b) Sox2 is Required for Sensory Organ Development in the Mammalian Inner Ear. *Nature*, 434 (7036), pp. 1031-1035.
- Kiernan, A.E., Steel, K.P. y Fekete, D.M. (2002) Development of the Mouse Inner Ear, pp. 539-566, *Mouse Development* Ed. J. Rossant y P. Tam. Academic Press.
- Kim, H.S., Kim, J., Jo, Y., Jeon, D. y Cho, Y.S. (2014) Direct Lineage Reprogramming of Mouse Fibroblasts to Functional Midbrain Dopaminergic Neuronal Progenitors. *Stem Cell.Res.*, 12 (1), pp. 60-68.
- Kim, W.Y., Fritsch, B., Serls, A., Bakel, L.A., Huang, E.J., Reichardt, L.F., Barth, D.S. y Lee, J.E. (2001) NeuroD-Null Mice are Deaf due to a Severe Loss of the Inner Ear Sensory Neurons during Development. *Development*, 128 (3), pp. 417-426.
- Koehler, K.R., Mikosz, A.M., Molosh, A.I., Patel, D. y Hashino, E. (2013) Generation of Inner Ear Sensory Epithelia from Pluripotent Stem Cells in 3D Culture. *Nature*, 500 (7461), pp. 217-221.
- Kondo, M., Scherer, D.C., Miyamoto, T., King, A.G., Akashi, K., Sugamura, K. y Weissman, I.L. (2000) Cell-Fate Conversion of Lymphoid-Committed Progenitors by Instructive Actions of Cytokines. *Nature*, 407 (6802), pp. 383-386.
- Kondo, T., Johnson, S.A., Yoder, M.C., Romand, R. y Hashino, E. (2005) Sonic Hedgehog and Retinoic Acid Synergistically Promote Sensory Fate Specification from Bone Marrow-Derived Pluripotent Stem Cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 102 (13), pp. 4789-4794.
- Kong, Q., Wu, M., Wang, Z., Zhang, X., Li, L., Liu, X., Mu, Y. y Liu, Z. (2011) Effect of Trichostatin A and 5-Aza-2'-Deoxycytidine on Transgene Reactivation and Epigenetic Modification in Transgenic Pig Fibroblast Cells. *Mol.Cell.Biochem.*, 355 (1-2), pp. 157-165.
- Koo, S.K., Hill, J.K., Hwang, C.H., Lin, Z.S., Millen, K.J. y Wu, D.K. (2009) Lmx1a Maintains Proper Neurogenic, Sensory, and Non-Sensory Domains in the Mammalian Inner Ear. *Dev.Biol.*, 333 (1), pp. 14-25.
- Korbling, M., Estrov, Z. y Champlin, R. (2003) Adult Stem Cells and Tissue Repair. *Bone Marrow Transplant.*, 32 Suppl 1, pp. S23-4.
- Krabbe, C., Zimmer, J. y Meyer, M. (2005) Neural Transdifferentiation of Mesenchymal Stem Cells--a Critical Review. *APMIS*, 113 (11-12), pp. 831-844.
- Kuroda, Y., Kitada, M., Wakao, S., Nishikawa, K., Tanimura, Y., Makinoshima, H., Goda, M., Akashi, H., Inutsuka, A., Niwa, A., Shigemoto, T., Nabeshima, Y., Nakahata, T., Nabeshima, Y., Fujiyoshi, Y. y Dezawa, M. (2010) Unique Multipotent Cells in Adult Human Mesenchymal Cell Populations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 107 (19), pp. 8639-8643.

- Ladher, R.K., O'Neill, P. y Begbie, J. (2010) From Shared Lineage to Distinct Functions: The Development of the Inner Ear and Epibranchial Placodes. *Development*, 137 (11), pp. 1777-1785.
- Landry, T.G., Wise, A.K., Fallon, J.B. y Shepherd, R.K. (2011) Spiral Ganglion Neuron Survival and Function in the Deafened Cochlea Following Chronic Neurotrophic Treatment. *Hear.Res.*, 282 (1-2), pp. 303-313.
- Lang, H., Ebihara, Y., Schmiedt, R.A., Minamiguchi, H., Zhou, D., Smythe, N., Liu, L., Ogawa, M. y Schulte, B.A. (2006) Contribution of Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells to Adult Mouse Inner Ear: Mesenchymal Cells and Fibrocytes. *J.Comp.Neurol.*, 496 (2), pp. 187-201.
- Lang, H., Schulte, B.A., Goddard, J.C., Hedrick, M., Schulte, J.B., Wei, L. y Schmiedt, R.A. (2008) Transplantation of Mouse Embryonic Stem Cells into the Cochlea of an Auditory-Neuropathy Animal Model: Effects of Timing After Injury. *J.Assoc.Res.Otolaryngol.*, 9 (2), pp. 225-240.
- Lawoko-Kerali, G., Rivolta, M.N. y Holley, M. (2002) Expression of the Transcription Factors GATA3 and Pax2 during Development of the Mammalian Inner Ear. *J.Comp.Neurol.*, 442 (4), pp. 378-391.
- Lawoko-Kerali, G., Rivolta, M.N., Lawlor, P., Cacciabue-Rivolta, D.I., Langton-Hewer, C., van Doorninck, J.H. y Holley, M.C. (2004) GATA3 and NeuroD Distinguish Auditory and Vestibular Neurons during Development of the Mammalian Inner Ear. *Mech.Dev.*, 121 (3), pp. 287-299.
- Le Prell, C.G., Hughes, L.F. y Miller, J.M. (2007) Free Radical Scavengers Vitamins A, C, and E Plus Magnesium Reduce Noise Trauma. *Free Radic.Biol.Med.*, 42 (9), pp. 1454-1463.
- Le Prell, C.G., Gagnon, P.M., Bennett, D.C. y Ohlemiller, K.K. (2011) Nutrient-Enhanced Diet Reduces Noise-Induced Damage to the Inner Ear and Hearing Loss. *Transl.Res.*, 158 (1), pp. 38-53.
- Lee, Y.S., Liu, F. y Segil, N. (2006) A Morphogenetic Wave of p27Kip1 Transcription Directs Cell Cycle Exit during Organ of Corti Development. *Development*, 133 (15), pp. 2817-2826.
- Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Mendez, A., Han, Y. y Pallavi, B. (2007) Control of Cell Fate and Differentiation by Sry-Related High-Mobility-Group Box (Sox) Transcription Factors. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 39 (12), pp. 2195-2214.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B. y McKay, R.D. (1990) CNS Stem Cells Express a New Class of Intermediate Filament Protein. *Cell*, 60 (4), pp. 585-595.
- Li, E. (2002) Chromatin Modification and Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. *Nat.Rev.Genet.*, 3 (9), pp. 662-673.
- Li, H., Liu, H. y Heller, S. (2003a) Pluripotent Stem Cells from the Adult Mouse Inner Ear. *Nat.Med.*, 9 (10), pp. 1293-1299.
- Li, H., Roblin, G., Liu, H. y Heller, S. (2003b) Generation of Hair Cells by Stepwise Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100 (23), pp. 13495-13500.
- Li, H., Liu, H., Corrales, C.E., Risner, J.R., Forrester, J., Holt, J.R., Heller, S. y Edge, A.S. (2009) Differentiation of Neurons from Neural Precursors Generated in Floating Spheres from Embryonic Stem Cells. *BMC Neurosci.*, 10, pp. 122-2202-10-122.
- Lim, H.W., Iwatani, M., Hattori, N., Tanaka, S., Yagi, S. y Shiota, K. (2010) Resistance to 5-Aza-2'-Deoxycytidine in Genic Regions Compared to Non-Genic Repetitive Sequences. *J.Reprod.Dev.*, 56 (1), pp. 86-93.

- Lin, Z., Perez, P., Sun, Z., Liu, J.J., Shin, J.H., Hycr, K.L., Samways, D., Egan, T., Holley, M.C. y Bao, J. (2012) Reprogramming of Single-Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells into Hair Cell-Like Cells. *Otol.Neurotol.*, 33 (9), pp. 1648-1655.
- Liu, J., Sandoval, J., Doh, S.T., Cai, L., Lopez-Rodas, G. y Casaccia, P. (2010) Epigenetic Modifiers are Necessary but Not Sufficient for Reprogramming Non-Myelinating Cells into Myelin Gene-Expressing Cells. *PLoS One*, 5 (9), pp. e13023.
- Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykhosslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K. y Ozawa, K. (2008) Protection Against Aminoglycoside-Induced Ototoxicity by Regulated AAV Vector-Mediated GDNF Gene Transfer into the Cochlea. *Mol.Ther.*, 16 (3), pp. 474-480.
- Liu, Z., Dearman, J.A., Cox, B.C., Walters, B.J., Zhang, L., Ayrault, O., Zindy, F., Gan, L., Roussel, M.F. y Zuo, J. (2012) Age-Dependent in Vivo Conversion of Mouse Cochlear Pillar and Deiters' Cells to Immature Hair Cells by Atoh1 Ectopic Expression. *J.Neurosci.*, 32 (19), pp. 6600-6610.
- Liu, Z., Fang, J., Dearman, J., Zhang, L. y Zuo, J. (2014) In Vivo Generation of Immature Inner Hair Cells in Neonatal Mouse Cochleae by Ectopic Atoh1 Expression. *PLoS One*, 9 (2), pp. e89377.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4), pp. 402-408.
- Logan, P.C., Ponnampalam, A.P., Rahnama, F., Lobie, P.E. y Mitchell, M.D. (2010) The Effect of DNA Methylation Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidine on Human Endometrial Stromal Cells. *Hum.Reprod.*, 25 (11), pp. 2859-2869.
- Lorenz, K., Sicker, M., Schmelzer, E., Rupf, T., Salvetter, J., Schulz-Siegmund, M. y Bader, A. (2008) Multilineage Differentiation Potential of Human Dermal Skin-Derived Fibroblasts. *Exp.Dermatol.*, 17 (11), pp. 925-932.
- Lu, P., Blesch, A. y Tuszyński, M.H. (2004) Induction of Bone Marrow Stromal Cells to Neurons: Differentiation, Transdifferentiation, Or Artifact?. *J.Neurosci.Res.*, 77 (2), pp. 174-191.
- Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J.L. y Anderson, D.J. (1998) Neurogenin1 is Essential for the Determination of Neuronal Precursors for Proximal Cranial Sensory Ganglia. *Neuron*, 20 (3), pp. 469-482.
- Ma, Q., Anderson, D.J. y Fritsch, B. (2000) Neurogenin 1 Null Mutant Ears Develop Fewer, Morphologically Normal Hair Cells in Smaller Sensory Epithelia Devoid of Innervation. *J.Assoc.Res.Otolaryngol.*, 1 (2), pp. 129-143.
- Malgrange, B., Thiry, M., Van De Water, T.R., Nguyen, L., Moonen, G. y Lefebvre, P.P. (2002) Epithelial Supporting Cells can Differentiate into Outer Hair Cells and Deiters' Cells in the Cultured Organ of Corti. *Cell Mol.Life Sci.*, 59 (10), pp. 1744-1757.
- Martinez-Monedero, R., Yi, E., Oshima, K., Glowatzki, E. y Edge, A.S. (2008) Differentiation of Inner Ear Stem Cells to Functional Sensory Neurons. *Dev.Neurobiol.*, 68 (5), pp. 669-684.
- Maruyama, J., Yamagata, T., Ulfendahl, M., Bredberg, G., Altschuler, R.A. y Miller, J.M. (2007) Effects of Antioxidants on Auditory Nerve Function and Survival in Deafened Guinea Pigs. *Neurobiol.Dis.*, 25 (2), pp. 309-318.
- Maruyama, J., Miller, J.M. y Ulfendahl, M. (2008) Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor and Antioxidants Preserve the Electrical Responsiveness of the Spiral Ganglion Neurons After Experimentally Induced Deafness. *Neurobiol.Dis.*, 29 (1), pp. 14-21.

- Matsumoto, M., Nakagawa, T., Kojima, K., Sakamoto, T., Fujiyama, F. y Ito, J. (2008) Potential of Embryonic Stem Cell-Derived Neurons for Synapse Formation with Auditory Hair Cells. *J.Neurosci.Res.*, 86 (14), pp. 3075-3085.
- Matsuoka, A.J., Kondo, T., Miyamoto, R.T. y Hashino, E. (2007) Enhanced Survival of Bone-Marrow-Derived Pluripotent Stem Cells in an Animal Model of Auditory Neuropathy. *Laryngoscope*, 117 (9), pp. 1629-1635.
- Mignone, J.L., Kukekov, V., Chiang, A.S., Steindler, D. y Enikolopov, G. (2004) Neural Stem and Progenitor Cells in Nestin-GFP Transgenic Mice. *J.Comp.Neurol.*, 469 (3), pp. 311-324.
- Miller, J. y Altschuler, R. (2004) Neurotrophic Factor and Electrical Stimulation Promotes Auditory Nerve Survival and Regrowth Following Deafness. *ARO Midwinter meeting*, pp. 90.
- Miller, A.L. (2001) Effects of Chronic Stimulation on Auditory Nerve Survival in Ototoxically Deafened Animals. *Hear.Res.*, 151 (1-2), pp. 1-14.
- Miller, J.M., Le Prell, C.G., Prieskorn, D.M., Wys, N.L. y Altschuler, R.A. (2007) Delayed Neurotrophin Treatment Following Deafness Rescues Spiral Ganglion Cells from Death and Promotes Regrowth of Auditory Nerve Peripheral Processes: Effects of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Fibroblast Growth Factor. *J.Neurosci.Res.*, 85 (9), pp. 1959-1969.
- Millimaki, B.B., Sweet, E.M. y Riley, B.B. (2010) Sox2 is Required for Maintenance and Regeneration, but Not Initial Development, of Hair Cells in the Zebrafish Inner Ear. *Dev.Biol.*, 338 (2), pp. 262-269.
- Minowa, O., Ikeda, K., Sugitani, Y., Oshima, T., Nakai, S., Katori, Y., Suzuki, M., Furukawa, M., Kawase, T., Zheng, Y., Ogura, M., Asada, Y., Watanabe, K., Yamanaka, H., Gotoh, S., Nishi-Takeshima, M., Sugimoto, T., Kikuchi, T., Takasaka, T. y Noda, T. (1999) Altered Cochlear Fibrocytes in a Mouse Model of DFN3 Nonsyndromic Deafness. *Science*, 285 (5432), pp. 1408-1411.
- Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., Ogawa, D., Ikeda, E., Okano, H. y Yamanaka, S. (2009) Variation in the Safety of Induced Pluripotent Stem Cell Lines. *Nat.Biotechnol.*, 27 (8), pp. 743-745.
- Miura, M., Miura, Y., Padilla-Nash, H.M., Molinolo, A.A., Fu, B., Patel, V., Seo, B.M., Sonoyama, W., Zheng, J.J., Baker, C.C., Chen, W., Ried, T. y Shi, S. (2006) Accumulated Chromosomal Instability in Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Leads to Malignant Transformation. *Stem Cells*, 24 (4), pp. 1095-1103.
- Mizutari, K., Fujioka, M., Hosoya, M., Bramhall, N., Okano, H.J., Okano, H. y Edge, A.S. (2013) Notch Inhibition Induces Cochlear Hair Cell Regeneration and Recovery of Hearing After Acoustic Trauma. *Neuron*, 77 (1), pp. 58-69.
- Montesinos, J.J., Flores-Figueroa, E., Castillo-Medina, S., Flores-Guzman, P., Hernandez-Estevez, E., Fajardo-Orduna, G., Orozco, S. y Mayani, H. (2009) Human Mesenchymal Stromal Cells from Adult and Neonatal Sources: Comparative Analysis of their Morphology, Immunophenotype, Differentiation Patterns and Neural Protein Expression. *Cytotherapy*, 11 (2), pp. 163-176.
- Monzack, E.L. y Cunningham, L.L. (2013) Lead Roles for Supporting Actors: Critical Functions of Inner Ear Supporting Cells. *Hear.Res.*, 303, pp. 20-29.
- Moore, D.R. y Shannon, R.V. (2009) Beyond Cochlear Implants: Awakening the Deafened Brain. *Nat.Neurosci.*, 12 (6), pp. 686-691.

- Morsli, H., Choo, D., Ryan, A., Johnson, R. y Wu, D.K. (1998) Development of the Mouse Inner Ear and Origin of its Sensory Organs. *J.Neurosci.*, 18 (9), pp. 3327-3335.
- Mukherjee, S., Manna, S., Pal, D., Mukherjee, P. y Panda, C.K. (2010) Sequential Loss of Cell Cycle Checkpoint Control Contributes to Malignant Transformation of Murine Embryonic Fibroblasts Induced by 20-Methylcholanthrene. *J.Cell.Physiol.*, 224 (1), pp. 49-58.
- Muraglia, A., Cancedda, R. y Quarto, R. (2000) Clonal Mesenchymal Progenitors from Human Bone Marrow Differentiate in Vitro According to a Hierarchical Model. *J.Cell.Sci.*, 113 (Pt 7) (Pt 7), pp. 1161-1166.
- Murata, J., Ikeda, K. y Okano, H. (2012) Notch Signaling and the Developing Inner Ear. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 727, pp. 161-173.
- Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-de la Rosa, L., Cediell, R., Lassaletta, L. y Varela-Nieto, I. (2011) The Role of Insulin-Like Growth Factor-I in the Physiopathology of Hearing. *Front.Mol.Neurosci.*, 4, pp. 11.
- Nadol, J.B., Jr (1990) Degeneration of Cochlear Neurons as seen in the Spiral Ganglion of Man. *Hear.Res.*, 49 (1-3), pp. 141-154.
- Naito, Y., Nakamura, T., Nakagawa, T., Iguchi, F., Endo, T., Fujino, K., Kim, T.S., Hiratsuka, Y., Tamura, T., Kanemaru, S., Shimizu, Y. y Ito, J. (2004) Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells into the Cochlea of Chinchillas. *Neuroreport*, 15 (1), pp. 1-4.
- Narine, K., De Wever, O., Van Valckenborgh, D., Francois, K., Bracke, M., DeSmet, S., Mareel, M. y Van Nooten, G. (2006) Growth Factor Modulation of Fibroblast Proliferation, Differentiation, and Invasion: Implications for Tissue Valve Engineering. *Tissue Eng.*, 12 (10), pp. 2707-2716.
- Nayagam, B.A., Edge, A.S., Needham, K., Hyakumura, T., Leung, J., Nayagam, D.A. y Dottori, M. (2013) An in Vitro Model of Developmental Synaptogenesis using Cocultures of Human Neural Progenitors and Cochlear Explants. *Stem Cells Dev.*, 22 (6), pp. 901-912.
- Nery, A.A., Nascimento, I.C., Glaser, T., Bassaneze, V., Krieger, J.E. y Ulrich, H. (2013) Human Mesenchymal Stem Cells: From Immunophenotyping by Flow Cytometry to Clinical Applications. *Cytometry A.*, 83 (1), pp. 48-61.
- Neves, J., Parada, C., Chamizo, M. y Giraldez, F. (2011) Jagged 1 Regulates the Restriction of Sox2 Expression in the Developing Chicken Inner Ear: A Mechanism for Sensory Organ Specification. *Development*, 138 (4), pp. 735-744.
- Neves, J., Uchikawa, M., Bigas, A. y Giraldez, F. (2012) The Prosensory Function of Sox2 in the Chicken Inner Ear Relies on the Direct Regulation of Atoh1. *PLoS One*, 7 (1), pp. e30871.
- Neves, J., Vachkov, I. y Giraldez, F. (2013) Sox2 Regulation of Hair Cell Development: Incoherence Makes Sense. *Hear.Res.*, 297, pp. 20-29.
- Ni, L., Wen, Y., Peng, X. y Jonakait, G.M. (2001) Antioxidants N-Acetylcysteine (NAC) and 2-Mercaptoethanol (2-ME) Affect the Survival and Differentiative Potential of Cholinergic Precursors from the Embryonic Septal Nuclei and Basal Forebrain: Involvement of Ras Signaling. *Brain Res.Dev.Brain Res.*, 130 (2), pp. 207-216.
- Nicholl, A.J., Kneebone, A., Davies, D., Cacciabue-Rivolta, D.I., Rivolta, M.N., Coffey, P. y Holley, M.C. (2005) Differentiation of an Auditory Neuronal Cell Line Suitable for Cell Transplantation. *Eur.J.Neurosci.*, 22 (2), pp. 343-353.

- Nishimura, K., Nakagawa, T., Ono, K., Ogita, H., Sakamoto, T., Yamamoto, N., Okita, K., Yamanaka, S. y Ito, J. (2009) Transplantation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells into the Cochlea. *Neuroreport*, 20 (14), pp. 1250-1254.
- Nishimura, K., Nakagawa, T., Sakamoto, T. y Ito, J. (2012) Fates of Murine Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Progenitors Following Transplantation into Mouse Cochleae. *Cell Transplant.*, 21 (4), pp. 763-771.
- Novack, C.R., Strominger, N.L., Demarest, R.J. y Ruggiero, D.A. (2005) Auditory and Vestibular Systems, pp. 285-303, *The Human Nervous System. Structure and function* Ed. Anonymous Humana Press.
- Obokata, H., Wakayama, T., Sasai, Y., Kojima, K., Vacanti, M.P., Niwa, H., Yamato, M. y Vacanti, C.A. (2014) Stimulus-Triggered Fate Conversion of Somatic Cells into Pluripotency. *Nature*, 505 (7485), pp. 641-647.
- Ogita, H., Nakagawa, T., Sakamoto, T., Inaoka, T. y Ito, J. (2010) Transplantation of Bone Marrow-Derived Neurospheres into Guinea Pig Cochlea. *Laryngoscope*, 120 (3), pp. 576-581.
- Ogura, F., Wakao, S., Kuroda, Y., Tsuchiyama, K., Bagheri, M., Heneidi, S., Chazenbalk, G., Aiba, S. y Dezawa, M. (2014) Human Adipose Tissue Possesses a Unique Population of Pluripotent Stem Cells with Nontumorigenic and Low Telomerase Activities: Potential Implications in Regenerative Medicine. *Stem Cells Dev.*, 23 (7), pp. 717-728.
- Ohyama, T., Basch, M.L., Mishina, Y., Lyons, K.M., Segil, N. y Groves, A.K. (2010) BMP Signaling is Necessary for Patterning the Sensory and Nonsensory Regions of the Developing Mammalian Cochlea. *J.Neurosci.*, 30 (45), pp. 15044-15051.
- Oiticica, J., Barboza-Junior, L.C., Batissoco, A.C., Lezirovitz, K., Mingroni-Netto, R.C., Haddad, L.A. y Bento, R.F. (2010) Retention of Progenitor Cell Phenotype in Otospheres from Guinea Pig and Mouse Cochlea. *J.Transl.Med.*, 8, pp. 119-5876-8-119.
- Okano, T., Nakagawa, T., Endo, T., Kim, T.S., Kita, T., Tamura, T., Matsumoto, M., Ohno, T., Sakamoto, T., Iguchi, F. y Ito, J. (2005) Engraftment of Embryonic Stem Cell-Derived Neurons into the Cochlear Modiolus. *Neuroreport*, 16 (17), pp. 1919-1922.
- Okano, T. y Kelley, M.W. (2012) Stem Cell Therapy for the Inner Ear: Recent Advances and Future Directions. *Trends Amplif*, 16 (1), pp. 4-18.
- Oliveira, S.L., Pillat, M.M., Cheffer, A., Lameu, C., Schwindt, T.T. y Ulrich, H. (2013) Functions of Neurotrophins and Growth Factors in Neurogenesis and Brain Repair. *Cytometry A.*, 83 (1), pp. 76-89.
- Ono, K., Nakagawa, T., Kojima, K., Matsumoto, M., Kawauchi, T., Hoshino, M. y Ito, J. (2009) Silencing p27 Reverses Post-Mitotic State of Supporting Cells in Neonatal Mouse Cochleae. *Mol.Cell.Neurosci.*, 42 (4), pp. 391-398.
- Oshima, K., Grimm, C.M., Corrales, C.E., Senn, P., Martinez Monedero, R., Geleoc, G.S., Edge, A., Holt, J.R. y Heller, S. (2007) Differential Distribution of Stem Cells in the Auditory and Vestibular Organs of the Inner Ear. *J.Assoc.Res.Otolaryngol.*, 8 (1), pp. 18-31.
- Oshima, K., Shin, K., Diensthuber, M., Peng, A.W., Ricci, A.J. y Heller, S. (2010) Mechanosensitive Hair Cell-Like Cells from Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell*, 141 (4), pp. 704-716.
- Ota, M. y Ito, K. (2003) Induction of Neurogenin-1 Expression by Sonic Hedgehog: Its Role in Development of Trigeminal Sensory Neurons. *Dev.Dyn.*, 227 (4), pp. 544-551.

- Page, R.L., Ambady, S., Holmes, W.F., Vilner, L., Kole, D., Kashpur, O., Huntress, V., Vojtic, I., Whitton, H. y Dominko, T. (2009) Induction of Stem Cell Gene Expression in Adult Human Fibroblasts without Transgenes. *Cloning Stem Cells*, 11 (3), pp. 417-426.
- Palazzo, E., Marconi, A., Truzzi, F., Dallaglio, K., Petrachi, T., Humbert, P., Schnebert, S., Perrier, E., Dumas, M. y Pincelli, C. (2012) Role of Neurotrophins on Dermal Fibroblast Survival and Differentiation. *J.Cell.Physiol.*, 227 (3), pp. 1017-1025.
- Pan, W., Jin, Y., Stanger, B. y Kiernan, A.E. (2010) Notch Signaling is Required for the Generation of Hair Cells and Supporting Cells in the Mammalian Inner Ear. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 107 (36), pp. 15798-15803.
- Pandit, S.R., Sullivan, J.M., Egger, V., Borecki, A.A. y Oleskevich, S. (2011) Functional Effects of Adult Human Olfactory Stem Cells on Early-Onset Sensorineural Hearing Loss. *Stem Cells*, 29 (4), pp. 670-677.
- Pang, Z.P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D.R., Yang, T.Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S., Sudhof, T.C. y Wernig, M. (2011) Induction of Human Neuronal Cells by Defined Transcription Factors. *Nature*, 476 (7359), pp. 220-223.
- Pearl, J.I., Kean, L.S., Davis, M.M. y Wu, J.C. (2012) Pluripotent Stem Cells: Immune to the Immune System?. *Sci.Transl.Med.*, 4 (164), pp. 164ps25.
- Pesce, M. y Scholer, H.R. (2000) Oct-4: Control of Totipotency and Germline Determination. *Mol.Reprod.Dev.*, 55 (4), pp. 452-457.
- Pevny, L.H. y Nicolis, S.K. (2010) Sox2 Roles in Neural Stem Cells. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 42 (3), pp. 421-424.
- Phinney, D.G. y Prockop, D.J. (2007) Concise Review: Mesenchymal stem/multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair--Current Views. *Stem Cells*, 25 (11), pp. 2896-2902.
- Pirvola, U., Ylikoski, J., Palgi, J., Lehtonen, E., Arumae, U. y Saarna, M. (1992) Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3 mRNAs in the Peripheral Target Fields of Developing Inner Ear Ganglia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89 (20), pp. 9915-9919.
- Pirvola, U., Spencer-Dene, B., Xing-Qun, L., Kettunen, P., Thesleff, I., Fritsch, B., Dickson, C. y Ylikoski, J. (2000) FGF/FGFR-2(IIIb) Signaling is Essential for Inner Ear Morphogenesis. *J.Neurosci.*, 20 (16), pp. 6125-6134.
- Pirvola, U. y Ylikoski, J. (2003) Neurotrophic Factors during Inner Ear Development. *Curr.Top.Dev.Biol.*, 57, pp. 207-223.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. y Marshak, D.R. (1999) Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284 (5411), pp. 143-147.
- Poirrier, A.L., Pincemail, J., Van Den Ackerveken, P., Lefebvre, P.P. y Malgrange, B. (2010) Oxidative Stress in the Cochlea: An Update. *Curr.Med.Chem.*, 17 (30), pp. 3591-3604.
- Prockop, D.J. (2007) "Stemness" does Not Explain the Repair of Many Tissues by Mesenchymal stem/multipotent Stromal Cells (MSCs). *Clin.Pharmacol.Ther.*, 82 (3), pp. 241-243.
- Puligilla, C., Dabdoub, A., Brenowitz, S.D. y Kelley, M.W. (2010) Sox2 Induces Neuronal Formation in the Developing Mammalian Cochlea. *J.Neurosci.*, 30 (2), pp. 714-722.

- Qin, H., Zhao, L.D., Sun, J.H., Ren, L.L., Guo, W.W., Liu, H.Z., Zhai, S.Q. y Yang, S.M. (2011) The Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Inner Ear Hair Cell-Like Cells in Vitro. *Acta Otolaryngol.*, 131 (11), pp. 1136-1141.
- Radde-Gallwitz, K., Pan, L., Gan, L., Lin, X., Segil, N. y Chen, P. (2004) Expression of Islet1 Marks the Sensory and Neuronal Lineages in the Mammalian Inner Ear. *J.Comp.Neurol.*, 477 (4), pp. 412-421.
- Raft, S., Koundakjian, E.J., Quinones, H., Jayasena, C.S., Goodrich, L.V., Johnson, J.E., Segil, N. y Groves, A.K. (2007) Cross-Regulation of Ngn1 and Math1 Coordinates the Production of Neurons and Sensory Hair Cells during Inner Ear Development. *Development*, 134 (24), pp. 4405-4415.
- Ramekers, D., Versnel, H., Grolman, W. y Klis, S.F. (2012) Neurotrophins and their Role in the Cochlea. *Hear.Res.*, 288 (1-2), pp. 19-33.
- Raphael, Y. y Altschuler, R.A. (2003) Structure and Innervation of the Cochlea. *Brain Res.Bull.*, 60 (5-6), pp. 397-422.
- Rask-Andersen, H., Bostrom, M., Gerdin, B., Kinnefors, A., Nyberg, G., Engstrand, T., Miller, J.M. y Lindholm, D. (2005) Regeneration of Human Auditory Nerve. in vitro/in Video Demonstration of Neural Progenitor Cells in Adult Human and Guinea Pig Spiral Ganglion. *Hear.Res.*, 203 (1-2), pp. 180-191.
- Raz, Y. y Kelley, M.W. (1999) Retinoic Acid Signaling is Necessary for the Development of the Organ of Corti. *Dev.Biol.*, 213 (1), pp. 180-193.
- Redaelli, S., Bentivegna, A., Foudah, D., Miloso, M., Redondo, J., Riva, G., Baronchelli, S., Dalpra, L. y Tredici, G. (2012) From Cytogenomic to Epigenomic Profiles: Monitoring the Biologic Behavior of in Vitro Cultured Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell.Res.Ther.*, 3 (6), pp. 47.
- Regala, C., Duan, M., Zou, J., Salminen, M. y Olivius, P. (2005) Xenografted Fetal Dorsal Root Ganglion, Embryonic Stem Cell and Adult Neural Stem Cell Survival Following Implantation into the Adult Vestibulocochlear Nerve. *Exp.Neurol.*, 193 (2), pp. 326-333.
- Reyes, J.H., O'Shea, K.S., Wys, N.L., Velkey, J.M., Prieskorn, D.M., Wesolowski, K., Miller, J.M. y Altschuler, R.A. (2008) Glutamatergic Neuronal Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells After Transient Expression of Neurogenin 1 and Treatment with BDNF and GDNF: In Vitro and in Vivo Studies. *J.Neurosci.*, 28 (48), pp. 12622-12631.
- Rezaee, F., Rellick, S.L., Piedimonte, G., Akers, S.M., O'Leary, H.A., Martin, K., Craig, M.D. y Gibson, L.F. (2010) Neurotrophins Regulate Bone Marrow Stromal Cell IL-6 Expression through the MAPK Pathway. *PLoS One*, 5 (3), pp. e9690.
- Riccomagno, M.M., Martinu, L., Mulheisen, M., Wu, D.K. y Epstein, D.J. (2002) Specification of the Mammalian Cochlea is Dependent on Sonic Hedgehog. *Genes Dev.*, 16 (18), pp. 2365-2378.
- Riccomagno, M.M., Takada, S. y Epstein, D.J. (2005) Wnt-Dependent Regulation of Inner Ear Morphogenesis is Balanced by the Opposing and Supporting Roles of Shh. *Genes Dev.*, 19 (13), pp. 1612-1623.
- Ring, K.L., Tong, L.M., Balestra, M.E., Javier, R., Andrews-Zwilling, Y., Li, G., Walker, D., Zhang, W.R., Kreitzer, A.C. y Huang, Y. (2012) Direct Reprogramming of Mouse and Human Fibroblasts into Multipotent Neural Stem Cells with a Single Factor. *Cell.Stem Cell.*, 11 (1), pp. 100-109.
- Rivolta, M.N., Li, H. y Heller, S. (2006) Generation of Inner Ear Cell Types from Embryonic Stem Cells. *Methods Mol.Biol.*, 330, pp. 71-92.

- Romand, R., Dolle, P. y Hashino, E. (2006) Retinoid Signaling in Inner Ear Development. *J.Neurobiol.*, 66 (7), pp. 687-704.
- Ronaghi, M., Nasr, M. y Heller, S. (2012) Concise Review: Inner Ear Stem Cells--an Oxymoron, but Why?. *Stem Cells*, 30 (1), pp. 69-74.
- Ronaghi, M., Nasr, M., Ealy, M., Durruthy-Durruthy, R., Waldhaus, J., Diaz, G.H., Joubert, L.M., Oshima, K. y Heller, S. (2014) Inner Ear Hair Cell-Like Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev.*
- Rooney, G.E., Howard, L., O'Brien, T., Windebank, A.J. y Barry, F.P. (2009) Elevation of cAMP in Mesenchymal Stem Cells Transiently Upregulates Neural Markers rather than Inducing Neural Differentiation. *Stem Cells Dev.*, 18 (3), pp. 387-398.
- Root, L.L. y Shipley, G.D. (2000) Normal Human Fibroblasts Produce Membrane-Bound and Soluble Isoforms of FGFR-1. *Mol.Cell Biol.Res.Commun.*, 3 (2), pp. 87-97.
- Rubel, E.W., Dew, L.A. y Roberson, D.W. (1995) Mammalian Vestibular Hair Cell Regeneration. *Science*, 267 (5198), pp. 701-707.
- Ruggieri, M., Riboldi, G., Brajkovic, S., Bucchia, M., Bresolin, N., Comi, G.P. y Corti, S. (2014) Induced Neural Stem Cells: Methods of Reprogramming and Potential Therapeutic Applications. *Prog.Neurobiol.*, 114, pp. 15-24.
- Sage, C., Huang, M., Vollrath, M.A., Brown, M.C., Hinds, P.W., Corey, D.P., Vetter, D.E. y Chen, Z.Y. (2006) Essential Role of Retinoblastoma Protein in Mammalian Hair Cell Development and Hearing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 103 (19), pp. 7345-7350.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D.R. y Sanberg, P.R. (2000) Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro. *Exp.Neurol.*, 164 (2), pp. 247-256.
- Satoh, T. y Fekete, D.M. (2005) Clonal Analysis of the Relationships between Mechanosensory Cells and the Neurons that Innervate them in the Chicken Ear. *Development*, 132 (7), pp. 1687-1697.
- Savary, E., Hugnot, J.P., Chassigneux, Y., Travo, C., Duperray, C., Van De Water, T. y Zine, A. (2007) Distinct Population of Hair Cell Progenitors can be Isolated from the Postnatal Mouse Cochlea using Side Population Analysis. *Stem Cells*, 25 (2), pp. 332-339.
- Scheper, V., Paasche, G., Miller, J.M., Warnecke, A., Berkingali, N., Lenarz, T. y Stover, T. (2009) Effects of Delayed Treatment with Combined GDNF and Continuous Electrical Stimulation on Spiral Ganglion Cell Survival in Deafened Guinea Pigs. *J.Neurosci.Res.*, 87 (6), pp. 1389-1399.
- Schimmang, T., Tan, J., Muller, M., Zimmermann, U., Rohbock, K., Kopschall, I., Limberger, A., Minichiello, L. y Knipper, M. (2003) Lack of Bdnf and TrkB Signalling in the Postnatal Cochlea Leads to a Spatial Reshaping of Innervation Along the Tonotopic Axis and Hearing Loss. *Development*, 130 (19), pp. 4741-4750.
- Schimmang, T. (2007) Expression and Functions of FGF Ligands during Early Otic Development. *Int.J.Dev.Biol.*, 51 (6-7), pp. 473-481.
- Schwander, M., Kachar, B. y Muller, U. (2010) Review Series: The Cell Biology of Hearing. *J.Cell Biol.*, 190 (1), pp. 9-20.
- Sendtner, M. (2011) Regenerative Medicine: Bespoke Cells for the Human Brain. *Nature*, 476 (7359), pp. 158-159.

- Shearer, K.D., Stoney, P.N., Morgan, P.J. y McCaffery, P.J. (2012) A Vitamin for the Brain. *Trends Neurosci.*, 35 (12), pp. 733-741.
- Shepherd, R.K., Roberts, L.A. y Paolini, A.G. (2004) Long-Term Sensorineural Hearing Loss Induces Functional Changes in the Rat Auditory Nerve. *Eur.J.Neurosci.*, 20 (11), pp. 3131-3140.
- Shepherd, R.K., Coco, A., Epp, S.B. y Crook, J.M. (2005) Chronic Depolarization Enhances the Trophic Effects of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Rescuing Auditory Neurons Following a Sensorineural Hearing Loss. *J.Comp.Neurol.*, 486 (2), pp. 145-158.
- Shepherd, R.K., Coco, A. y Epp, S.B. (2008) Neurotrophins and Electrical Stimulation for Protection and Repair of Spiral Ganglion Neurons Following Sensorineural Hearing Loss. *Hear.Res.*, 242 (1-2), pp. 100-109.
- Shi, F., Corrales, C.E., Liberman, M.C. y Edge, A.S. (2007) BMP4 Induction of Sensory Neurons from Human Embryonic Stem Cells and Reinnervation of Sensory Epithelium. *Eur.J.Neurosci.*, 26 (11), pp. 3016-3023.
- Shi, F., Cheng, Y.F., Wang, X.L. y Edge, A.S. (2010) Beta-Catenin Up-Regulates Atoh1 Expression in Neural Progenitor Cells by Interaction with an Atoh1 3' Enhancer. *J.Biol.Chem.*, 285 (1), pp. 392-400.
- Shi, F., Kempfle, J.S. y Edge, A.S. (2012) Wnt-Responsive Lgr5-Expressing Stem Cells are Hair Cell Progenitors in the Cochlea. *J.Neurosci.*, 32 (28), pp. 9639-9648.
- Shi, F., Hu, L. y Edge, A.S. (2013) Generation of Hair Cells in Neonatal Mice by Beta-Catenin Overexpression in Lgr5-Positive Cochlear Progenitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 110 (34), pp. 13851-13856.
- Shibata, S.B. y Raphael, Y. (2010) Future Approaches for Inner Ear Protection and Repair. *J.Commun.Disord.*, 43 (4), pp. 295-310.
- Shimozaki, K., Nakashima, K., Niwa, H. y Taga, T. (2003) Involvement of Oct3/4 in the Enhancement of Neuronal Differentiation of ES Cells in Neurogenesis-Inducing Cultures. *Development*, 130 (11), pp. 2505-2512.
- Shiraha, H., Gupta, K., Drabik, K. y Wells, A. (2000) Aging Fibroblasts Present Reduced Epidermal Growth Factor (EGF) Responsiveness due to Preferential Loss of EGF Receptors. *J.Biol.Chem.*, 275 (25), pp. 19343-19351.
- Shoji, F., Miller, A.L., Mitchell, A., Yamasoba, T., Altschuler, R.A. y Miller, J.M. (2000a) Differential Protective Effects of Neurotrophins in the Attenuation of Noise-Induced Hair Cell Loss. *Hear.Res.*, 146 (1-2), pp. 134-142.
- Shoji, F., Yamasoba, T., Magal, E., Dolan, D.F., Altschuler, R.A. y Miller, J.M. (2000b) Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor has a Dose Dependent Influence on Noise-Induced Hearing Loss in the Guinea Pig Cochlea. *Hear.Res.*, 142 (1-2), pp. 41-55.
- Shou, J., Zheng, J.L. y Gao, W.Q. (2003) Robust Generation of New Hair Cells in the Mature Mammalian Inner Ear by Adenoviral Expression of Hath1. *Mol.Cell.Neurosci.*, 23 (2), pp. 169-179.
- Sly, D.J., Hampson, A.J., Minter, R.L., Heffer, L.F., Li, J., Millard, R.E., Winata, L., Niasari, A. y O'Leary, S.J. (2012) Brain-Derived Neurotrophic Factor Modulates Auditory Function in the Hearing Cochlea. *J.Assoc.Res.Otolaryngol.*, 13 (1), pp. 1-16.

- Solmesky, L., Lefler, S., Jacob-Hirsch, J., Bulvik, S., Rechavi, G. y Weil, M. (2010) Serum Free Cultured Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells as a Platform to Characterize the Effects of Specific Molecules. *PLoS One*, 5 (9), pp. 10.1371/journal.pone.0012689.
- Song, M., Kim, H., Choi, Y., Kim, K. y Chung, C. (2012) Skeletal Myogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stromal Cells Isolated from Orthodontically Extracted Premolars. *Korean J.Orthod.*, 42 (5), pp. 249-254.
- Steinert, A.F., Rackwitz, L., Gilbert, F., Noth, U. y Tuan, R.S. (2012) Concise Review: The Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells for Musculoskeletal Regeneration: Current Status and Perspectives. *Stem Cells Transl.Med.*, 1 (3), pp. 237-247.
- Stone, J.S. y Cotanche, D.A. (2007) Hair Cell Regeneration in the Avian Auditory Epithelium. *Int.J.Dev.Biol.*, 51 (6-7), pp. 633-647.
- Stover, T., Gong, T.L., Cho, Y., Altschuler, R.A. y Lomax, M.I. (2000) Expression of the GDNF Family Members and their Receptors in the Mature Rat Cochlea. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, 76 (1), pp. 25-35.
- Su, G., Zhao, Y., Wei, J., Han, J., Chen, L., Xiao, Z., Chen, B. y Dai, J. (2013) The Effect of Forced Growth of Cells into 3D Spheres using Low Attachment Surfaces on the Acquisition of Stemness Properties. *Biomaterials*, 34 (13), pp. 3215-3222.
- Sugaya, K. (2003) Potential use of Stem Cells in Neuroreplacement Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Int.Rev.Cytol.*, 228, pp. 1-30.
- Sun, G.W., Fujii, M. y Matsunaga, T. (2012) Functional Interaction between Mesenchymal Stem Cells and Spiral Ligament Fibrocytes. *J.Neurosci.Res.*, 90 (9), pp. 1713-1722.
- Suzuki, M., Yagi, M., Brown, J.N., Miller, A.L., Miller, J.M. y Raphael, Y. (2000) Effect of Transgenic GDNF Expression on Gentamicin-Induced Cochlear and Vestibular Toxicity. *Gene Ther.*, 7 (12), pp. 1046-1054.
- Sweet, E.M., Vemaraju, S. y Riley, B.B. (2011) Sox2 and Fgf Interact with Atoh1 to Promote Sensory Competence Throughout the Zebrafish Inner Ear. *Dev.Biol.*, 358 (1), pp. 113-121.
- Takahashi, K. y Yamanaka, S. (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126 (4), pp. 663-676.
- Tamama, K., Kawasaki, H. y Wells, A. (2010) Epidermal Growth Factor (EGF) Treatment on Multipotential Stromal Cells (MSCs). Possible Enhancement of Therapeutic Potential of MSC. *J.Biomed.Biotechnol.*, 2010, pp. 795385.
- Tamura, S., Okumoto, K., Toyama, R., Shimozawa, N., Tsukamoto, T., Suzuki, Y., Osumi, T., Kondo, N. y Fujiki, Y. (1998) Human PEX1 Cloned by Functional Complementation on a CHO Cell Mutant is Responsible for Peroxisome-Deficient Zellweger Syndrome of Complementation Group I. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95 (8), pp. 4350-4355.
- Tan, B.T., Lee, M.M. y Ruan, R. (2008) Bone-Marrow-Derived Cells that Home to Acoustic Deafened Cochlea Preserved their Hematopoietic Identity. *J.Comp.Neurol.*, 509 (2), pp. 167-179.
- Tang, Y. y Tian, X.C. (2013) JAK-STAT3 and Somatic Cell Reprogramming. *JAKSTAT*, 2 (4), pp. e24935.
- Taniguchi, M., Yamamoto, N., Nakagawa, T., Ogino, E. y Ito, J. (2012) Identification of Tympanic Border Cells as Slow-Cycling Cells in the Cochlea. *PLoS One*, 7 (10), pp. e48544.

- Tarnowski, M. y Sieron, A.L. (2006) Adult Stem Cells and their Ability to Differentiate. *Med.Sci.Monit.*, 12 (8), pp. RA154-63.
- Tessarollo, L., Coppola, V. y Fritsch, B. (2004) NT-3 Replacement with Brain-Derived Neurotrophic Factor Redirects Vestibular Nerve Fibers to the Cochlea. *J.Neurosci.*, 24 (10), pp. 2575-2584.
- Tondreau, T., Lagneaux, L., Dejeneffe, M., Massy, M., Mortier, C., Delforge, A. y Bron, D. (2004) Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Already Express Specific Neural Proteins before any Differentiation. *Differentiation*, 72 (7), pp. 319-326.
- Tsai, S.Y., Bouwman, B.A., Ang, Y.S., Kim, S.J., Lee, D.F., Lemischka, I.R. y Rendl, M. (2011) Single Transcription Factor Reprogramming of Hair Follicle Dermal Papilla Cells to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells*, 29 (6), pp. 964-971.
- Tsou, H.C., Lee, X., Si, S.P. y Peacocke, M. (1994) Regulation of Retinoic Acid Receptor Expression in Dermal Fibroblasts. *Exp.Cell Res.*, 211 (1), pp. 74-81.
- Ulfendahl, M., Hu, Z., Olivius, P., Duan, M. y Wei, D. (2007) A Cell Therapy Approach to Substitute Neural Elements in the Inner Ear. *Physiol.Behav.*, 92 (1-2), pp. 75-79.
- Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L. y Pistello, M. (2013) Viral Vectors: A Look Back and Ahead on Gene Transfer Technology. *New Microbiol.*, 36 (1), pp. 1-22.
- Varela-Nieto, I., Morales-Garcia, J.A., Vigil, P., Diaz-Casares, A., Gorospe, I., Sanchez-Galiano, S., Canon, S., Camarero, G., Contreras, J., Cediell, R. y Leon, Y. (2004) Trophic Effects of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) in the Inner Ear. *Hear.Res.*, 196 (1-2), pp. 19-25.
- Vazquez-Echeverria, C., Dominguez-Frutos, E., Charnay, P., Schimmang, T. y Pujades, C. (2008) Analysis of Mouse Kreisler Mutants Reveals New Roles of Hindbrain-Derived Signals in the Establishment of the Otic Neurogenic Domain. *Dev.Biol.*, 322 (1), pp. 167-178.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Sudhof, T.C. y Wernig, M. (2010) Direct Conversion of Fibroblasts to Functional Neurons by Defined Factors. *Nature*, 463 (7284), pp. 1035-1041.
- Vierbuchen, T. y Wernig, M. (2011) Direct Lineage Conversions: Unnatural but Useful?. *Nat.Biotechnol.*, 29 (10), pp. 892-907.
- Wada, R., Muraoka, N., Inagawa, K., Yamakawa, H., Miyamoto, K., Sadahiro, T., Umei, T., Kaneda, R., Suzuki, T., Kamiya, K., Tohyama, S., Yuasa, S., Kokaji, K., Aeba, R., Yozu, R., Yamagishi, H., Kitamura, T., Fukuda, K. y Ieda, M. (2013) Induction of Human Cardiomyocyte-Like Cells from Fibroblasts by Defined Factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 110 (31), pp. 12667-12672.
- Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V. y Ho, A.D. (2008) Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. *PLoS One*, 3 (5), pp. e2213.
- Wang, Y.A., Kamarova, Y., Shen, K.C., Jiang, Z., Hahn, M.J., Wang, Y. y Brooks, S.C. (2005) DNA Methyltransferase-3a Interacts with p53 and Represses p53-Mediated Gene Expression. *Cancer.Biol.Ther.*, 4 (10), pp. 1138-1143.
- Wang, Z., Sugano, E., Isago, H., Hiroi, T., Tamai, M. y Tomita, H. (2011) Differentiation of Neuronal Cells from NIH/3T3 Fibroblasts Under Defined Conditions. *Dev.Growth Differ.*, 53 (3), pp. 357-365.
- Wangemann, P. (2006) Supporting Sensory Transduction: Cochlear Fluid Homeostasis and the Endocochlear Potential. *J.Physiol.*, 576 (Pt 1), pp. 11-21.

- Warchol, M.E. (2011) Sensory Regeneration in the Vertebrate Inner Ear: Differences at the Levels of Cells and Species. *Hear.Res.*, 273 (1-2), pp. 72-79.
- Warnecke, A., Sasse, S., Wenzel, G.I., Hoffmann, A., Gross, G., Paasche, G., Scheper, V., Reich, U., Esser, K.H., Lenarz, T., Stover, T. y Wissel, K. (2012) Stable Release of BDNF from the Fibroblast Cell Line NIH3T3 Grown on Silicone Elastomers Enhances Survival of Spiral Ganglion Cells in Vitro and in Vivo. *Hear.Res.*, 289 (1-2), pp. 86-97.
- Weber, T., Corbett, M.K., Chow, L.M., Valentine, M.B., Baker, S.J. y Zuo, J. (2008) Rapid Cell-Cycle Reentry and Cell Death After Acute Inactivation of the Retinoblastoma Gene Product in Postnatal Cochlear Hair Cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 105 (2), pp. 781-785.
- Wei, D., Jin, Z., Jarlebark, L., Scarfone, E. y Ulfendahl, M. (2007) Survival, Synaptogenesis, and Regeneration of Adult Mouse Spiral Ganglion Neurons in Vitro. *Dev.Neurobiol.*, 67 (1), pp. 108-122.
- Wei, D., Levic, S., Nie, L., Gao, W.Q., Petit, C., Jones, E.G. y Yamoah, E.N. (2008) Cells of Adult Brain Germinal Zone have Properties Akin to Hair Cells and can be used to Replace Inner Ear Sensory Cells After Damage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 105 (52), pp. 21000-21005.
- Weintraub, H., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Adam, M.A., Lassar, A.B. y Miller, A.D. (1989) Activation of Muscle-Specific Genes in Pigment, Nerve, Fat, Liver, and Fibroblast Cell Lines by Forced Expression of MyoD. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 86 (14), pp. 5434-5438.
- White, P.M., Doetzlhofer, A., Lee, Y.S., Groves, A.K. y Segil, N. (2006) Mammalian Cochlear Supporting Cells can Divide and Trans-Differentiate into Hair Cells. *Nature*, 441 (7096), pp. 984-987.
- White, P.M., Stone, J.S., Groves, A.K. y Segil, N. (2012) EGFR Signaling is Required for Regenerative Proliferation in the Cochlea: Conservation in Birds and Mammals. *Dev.Biol.*, 363 (1), pp. 191-200.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A. y Gough, N.M. (1988) Myeloid Leukaemia Inhibitory Factor Maintains the Developmental Potential of Embryonic Stem Cells. *Nature*, 336 (6200), pp. 684-687.
- Wislet-Gendebien, S., Laudet, E., Neirinckx, V. y Rogister, B. (2012) Adult Bone Marrow: Which Stem Cells for Cellular Therapy Protocols in Neurodegenerative Disorders?. *J.Biomed.Biotechnol.*, 2012, pp. 601560.
- Wong, E.Y., Ahmed, M. y Xu, P.X. (2013) EYA1-SIX1 Complex in Neurosensory Cell Fate Induction in the Mammalian Inner Ear. *Hear.Res.*, 297, pp. 13-19.
- Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. y Black, I.B. (2000) Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neurons. *J.Neurosci.Res.*, 61 (4), pp. 364-370.
- Woods, C., Montcouquiol, M. y Kelley, M.W. (2004) Math1 Regulates Development of the Sensory Epithelium in the Mammalian Cochlea. *Nat.Neurosci.*, 7 (12), pp. 1310-1318.
- Wright, T.J. y Mansour, S.L. (2003) Fgf3 and Fgf10 are Required for Mouse Otic Placode Induction. *Development*, 130 (15), pp. 3379-3390.
- Wu, D.K. y Kelley, M.W. (2012) Molecular Mechanisms of Inner Ear Development. *Cold Spring Harb Perspect.Biol.*, 4 (8), pp. a008409.
- Xiang, M., Gao, W.Q., Hasson, T. y Shin, J.J. (1998) Requirement for Brn-3c in Maturation and Survival, but Not in Fate Determination of Inner Ear Hair Cells. *Development*, 125 (20), pp. 3935-3946.

- Yamagata, T., Miller, J.M., Ulfendahl, M., Olivius, N.P., Altschuler, R.A., Pyykko, I. y Bredberg, G. (2004) Delayed Neurotrophic Treatment Preserves Nerve Survival and Electrophysiological Responsiveness in Neomycin-Deafened Guinea Pigs. *J.Neurosci.Res.*, 78 (1), pp. 75-86.
- Yamamoto, N., Tanigaki, K., Tsuji, M., Yabe, D., Ito, J. y Honjo, T. (2006) Inhibition of Notch/RBP-J Signaling Induces Hair Cell Formation in Neonate Mouse Cochleas. *J.Mol.Med.(Berl)*, 84 (1), pp. 37-45.
- Yamashita, D., Jiang, H.Y., Le Prell, C.G., Schacht, J. y Miller, J.M. (2005) Post-Exposure Treatment Attenuates Noise-Induced Hearing Loss. *Neuroscience*, 134 (2), pp. 633-642.
- Yang, C., Zhou, L., Gao, X., Chen, B., Tu, J., Sun, H., Liu, X., He, J., Liu, J. y Yuan, Q. (2011a) Neuroprotective Effects of Bone Marrow Stem Cells Overexpressing Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor on Rats with Intracerebral Hemorrhage and Neurons Exposed to hypoxia/reoxygenation. *Neurosurgery*, 68 (3), pp. 691-704.
- Yang, H., Xie, X., Deng, M., Chen, X. y Gan, L. (2010) Generation and Characterization of Atoh1-Cre Knock-in Mouse Line. *Genesis*, 48 (6), pp. 407-413.
- Yang, S.M., Chen, W., Guo, W.W., Jia, S., Sun, J.H., Liu, H.Z., Young, W.Y. y He, D.Z. (2012) Regeneration of Stereocilia of Hair Cells by Forced Atoh1 Expression in the Adult Mammalian Cochlea. *PLoS One*, 7 (9), pp. e46355.
- Yang, T., Kersigo, J., Jahan, I., Pan, N. y Fritzsche, B. (2011b) The Molecular Basis of Making Spiral Ganglion Neurons and Connecting them to Hair Cells of the Organ of Corti. *Hear.Res.*, 278 (1-2), pp. 21-33.
- Yeboor, V., Liu, V., Espiritu, C., Paul, A., Oka, K., Kojima, H. y Chan, L. (2009) Neurogenin3 is Sufficient for Transdetermination of Hepatic Progenitor Cells into Neo-Islets in Vivo but Not Transdifferentiation of Hepatocytes. *Dev.Cell.*, 16 (3), pp. 358-373.
- Ylikoski, J., Pirvola, U., Moshnyakov, M., Palgi, J., Arumae, U. y Saarma, M. (1993) Expression Patterns of Neurotrophin and their Receptor mRNAs in the Rat Inner Ear. *Hear.Res.*, 65 (1-2), pp. 69-78.
- Yoo, A.S., Sun, A.X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R.E., Tsien, R.W. y Crabtree, G.R. (2011) MicroRNA-Mediated Conversion of Human Fibroblasts to Neurons. *Nature*, 476 (7359), pp. 228-231.
- Yoshida, T., Hakuba, N., Morizane, I., Fujita, K., Cao, F., Zhu, P., Uchida, N., Kameda, K., Sakanaka, M., Gyo, K. y Hata, R. (2007) Hematopoietic Stem Cells Prevent Hair Cell Death After Transient Cochlear Ischemia through Paracrine Effects. *Neuroscience*, 145 (3), pp. 923-930.
- Yu, B., He, Z.Y., You, P., Han, Q.W., Xiang, D., Chen, F., Wang, M.J., Liu, C.C., Lin, X.W., Borjigin, U., Zi, X.Y., Li, J.X., Zhu, H.Y., Li, W.L., Han, C.S., Wangensteen, K.J., Shi, Y., Hui, L.J., Wang, X. y Hu, Y.P. (2013) Reprogramming Fibroblasts into Bipotential Hepatic Stem Cells by Defined Factors. *Cell.Stem Cell.*, 13 (3), pp. 328-340.
- Yuan, X., Wan, H., Zhao, X., Zhu, S., Zhou, Q. y Ding, S. (2011) Brief Report: Combined Chemical Treatment Enables Oct4-Induced Reprogramming from Mouse Embryonic Fibroblasts. *Stem Cells*, 29 (3), pp. 549-553.
- Zahnert, T. (2011) The Differential Diagnosis of Hearing Loss. *Dtsch.Arztbl Int.*, 108 (25), pp. 433-43; quiz 444.
- Zaim, M., Karaman, S., Cetin, G. y Isik, S. (2012) Donor Age and Long-Term Culture Affect Differentiation and Proliferation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Ann.Hematol.*, 91 (8), pp. 1175-1186.

- Zavan, B., Vindigni, V., Gardin, C., D'Avella, D., Della Puppa, A., Abatangelo, G. y Cortivo, R. (2010) Neural Potential of Adipose Stem Cells. *Discov.Med.*, 10 (50), pp. 37-43.
- Zeng, F.G., Rebscher, S., Harrison, W., Sun, X. y Feng, H. (2008) Cochlear Implants: System Design, Integration, and Evaluation. *IEEE Rev.Biomed.Eng.*, 1, pp. 115-142.
- Zhai, S., Shi, L., Wang, B.E., Zheng, G., Song, W., Hu, Y. y Gao, W.Q. (2005) Isolation and Culture of Hair Cell Progenitors from Postnatal Rat Cochleae. *J.Neurobiol.*, 65 (3), pp. 282-293.
- Zhang, X.M., Li, Q.M., Su, D.J., Wang, N., Shan, Z.Y., Jin, L.H. y Lei, L. (2010) RA Induces the Neural-Like Cells Generated from Epigenetic Modified NIH/3T3 Cells. *Mol.Biol.Rep.*, 37 (3), pp. 1197-1202.
- Zhao, L.D., Li, L., Wu, N., Li, D.K., Ren, L.L., Guo, W.W., Sun, J.H., Liu, H.Z., Chen, Z.T., Xing, G.Q. y Yang, S.M. (2013) Migration and Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells Transplanted into Mature Cochlea of Rats with Aminoglycoside-Induced Hearing Loss. *Acta Otolaryngol.*, 133 (2), pp. 136-143.
- Zhao, T., Zhang, Z.N., Rong, Z. y Xu, Y. (2011) Immunogenicity of Induced Pluripotent Stem Cells. *Nature*, 474 (7350), pp. 212-215.
- Zheng, J.L. y Gao, W.Q. (2000) Overexpression of Math1 Induces Robust Production of Extra Hair Cells in Postnatal Rat Inner Ears. *Nat.Neurosci.*, 3 (6), pp. 580-586.
- Zheng, Y., Rayner, M., Feng, L., Hu, X., Zheng, X., Bearth, E. y Lin, J. (2008) EGF Mediates Survival of Rat Cochlear Sensory Cells Via an NF-kappaB Dependent Mechanism in Vitro. *Open Neurosci.J.*, 2, pp. 9-15.
- Zhou, Q. y Tripathi, P. (2012) How to Remake a Fibroblast into a Neural Stem Cell. *Cell.Stem Cell.*, 10 (4), pp. 347-348.
- Zhu, S., Li, W., Zhou, H., Wei, W., Ambasadhan, R., Lin, T., Kim, J., Zhang, K. y Ding, S. (2010) Reprogramming of Human Primary Somatic Cells by OCT4 and Chemical Compounds. *Cell.Stem Cell.*, 7 (6), pp. 651-655.
- Zine, A., Van De Water, T.R. y de Ribaupierre, F. (2000) Notch Signaling Regulates the Pattern of Auditory Hair Cell Differentiation in Mammals. *Development*, 127 (15), pp. 3373-3383.
- Zou, D., Erickson, C., Kim, E.H., Jin, D., Fritsch, B. y Xu, P.X. (2008) Eya1 Gene Dosage Critically Affects the Development of Sensory Epithelia in the Mammalian Inner Ear. *Hum.Mol.Genet.*, 17 (21), pp. 3340-3356.
- Zou, Q., Yan, Q., Zhong, J., Wang, K., Sun, H., Yi, X. y Lai, L. (2014) Direct Conversion of Human Fibroblasts into Neuronal Restricted Progenitors. *J.Biol.Chem.*, 289 (8), pp. 5250-5260.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. y Hedrick, M.H. (2002) Human Adipose Tissue is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol.Biol.Cell*, 13 (12), pp. 4279-4295.



ANEXO

Review

Cell- and gene-therapy approaches to inner ear repair

M.M. Conde de Felipe, A. Feijoo Redondo, J. García-Sancho, T. Schimmang and M.B. Durán Alonso

Department of Molecular Genetics of Disease, Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), CSIC and University of Valladolid, Valladolid, Spain

Summary. Sensorineural hearing loss is the most common sensory disorder in humans. It is primarily due to the degeneration of highly specialised mechanosensory cells in the cochlea, the so-called hair cells. Hearing problems can also be caused or further aggravated by the death of auditory sensory neurons that convey the information from the hair cells to the brain stem. Despite the discovery of stem/progenitor cells in the mammalian cochlea, no regeneration of either damaged hair cells or auditory neurons has been observed in mammals, in contrast to what is seen in avians and non-mammalian vertebrates. The reasons for this divergence have not yet been elucidated, although loss of stem cells and/or loss of their phenotypic plasticity in adult mammals have been put forward as possible explanations. Given the high incidence of this disorder and its economic and social implications, a considerable number of research lines have been set up aimed towards the regeneration of cochlear sensory cell types. This review summarizes the various routes that have been explored, ranging from the genetic modification of endogenous cells remaining in the inner ear in order to promote their transdifferentiation, to the implantation of exogenous stem or progenitor cells and their subsequent differentiation within the host tissue. Prophylactic treatments to fight against progressive sensory cell degeneration in the inner ear are also discussed.

Key words: Cochlea, Hair cells, Auditory neurons, Hearing loss

Introduction

Worldwide, 500 million people are estimated to be affected by some form of hearing loss, and the World Health Organization has estimated that this number will rise to 900 million by 2050. This makes hearing impairment the most common sensory disorder in humans, with serious social and economic implications. In the majority of the cases, the cause for hearing loss is directly or indirectly linked to degeneration and death of specialized mechanosensory hair cells (HCs). These cells translate the incoming sound waves into electrical signals that are then carried to the brain via their associated auditory neurons (spiral ganglion neurons, SGNs), bipolar neurons that extend one process peripherally (to the HC in the sensory epithelium) and one process centrally (to auditory centres in the brain). HC loss may result from excessive exposure to loud stimuli, bacterial and viral infections, ototoxic drugs, and mechanical trauma, with aging being an additional risk factor. Furthermore, over a hundred genetic loci have by now been identified that either cause deafness or convey susceptibility to some environmental factors that affect hearing (Hilgert et al., 2009; Dror and Avraham, 2010). Work carried out using animal models has shown that SGN degeneration may occur as a primary event, but it most often follows HC death, probably due to the lack of electric stimulation and/or some trophic factor normally provided to them by the HCs.

In the mammalian cochlea, HCs and SGNs are only produced during the fetal stages and the capacity to replace any of these sensory cells following damage is lost soon after birth. This is in contrast to what is seen in avians and non-mammalian vertebrates, capable of regenerating HCs throughout life (Brignull et al., 2009). Studies in birds have shown that non-sensory supporting cells (SCs) adjacent to damaged HCs may transdifferentiate into new HCs. This regeneration process can occur either directly, in the absence of mitosis, or after re-entering the cell cycle (Roberson et

al., 2004; Stone and Cotanche, 2007; Brignull et al., 2009). Very importantly, afferent neurons establish functional synaptic contacts with the new HCs, resulting in significant functional recovery (Birmingham-McDonogh and Rubel, 2003). On the other hand, although Kelley et al. (1995) demonstrated a limited capacity for regeneration of HCs in embryonic mouse cochleae, cochlear SCs in the adult appear unable to reconstitute degenerated HCs (Yamasoba and Kondo, 2006). Instead, their apical borders expand to fill the lesion site and form a “scar”, with no transdifferentiation into a HC phenotype taking place.

The reasons for the lack of regenerative capacity of the adult mammalian cochlea are unknown. A few possible explanations have been put forward. Warchol (2011) has proposed that it may be the result of a trade-off between phenotypic plasticity of the SC and sensitive high-frequency hearing, with a concomitant reduction in the number of HCs and further specialization of cochlear SCs into morphologically different subtypes. The complex cytoarchitecture observed in the mammalian cochlea may have resulted in the development of mechanisms that restrict the ability of SCs to divide and transdifferentiate following HC loss. In general it is considered that the regenerative ability of the sensory organ (so-called Organ of Corti in mammals, OC) is closely linked to the proliferative capacity of its SCs. SCs in the mature OC in mammals are post-mitotic cells and it has been hypothesized that their proliferative ability is perhaps lost due to the absence of certain mitogen receptors in these cells or the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors such as p27, and/or changes in the actin cytoskeleton (White et al., 2006; Burns et al., 2008; Warchol, 2011). It has also been argued that pluripotent stem cells present in regenerating organs such as skin are absent in the mature cochlea. While stem-like cells have been isolated from the vestibular organs of mature mice (Li et al., 2003a) and even from the cochlea of neonatal mice (Oshima et al., 2009), tissues where a limited amount of regeneration occurs, this type of cell has not been identified in the cochleae of adult mice (Oshima et al., 2007).

Hearing loss: Therapeutical approaches

At present, the only available treatments for patients suffering from severe hearing loss are based on sound amplification (hearing aids) and/or cochlear implants (CIs). Cochlear implants are electronic devices that bypass the degenerated HCs and directly stimulate the remaining auditory neurons. Although SGNs have been reported to survive for many years in the absence of most or all the HCs, progressive degeneration of these neurons takes place and evidence from animal studies indicates that this degeneration may compromise the efficacy of CIs (Shepherd et al., 2004). Therefore, the success of CIs relies on the preservation of healthy sensory neurons that transmit the signal to the brain.

Although still far from the clinic, different avenues

are being explored in order to tackle the problem of hearing loss, the two main objectives being the regeneration of missing cell types and the maintenance of remaining cochlear cells. Studies pursuing either of these aims have been carried out using cell or gene therapy, and/or the application of trophic factors. Critical factors to be considered when contemplating possible therapeutic approaches are the type of cell(s) damaged, the cause and extent of damage, and the overall state of the host tissue, influenced by parameters such as the time passed since the otic injury.

Regeneration of missing cell types

There are two possible routes aimed to regenerate damaged HCs or SGNs. One consists in differentiating other cell types into the sought-for phenotype or an earlier progenitor and subsequently transplanting these cells into the inner ear. Alternatively, already existing endogenous cells may be stimulated to become replacement cells. A number of excellent reviews have been recently published on this subject (Brigande and Heller, 2009; Groves, 2010; Jonkamonwiwat et al., 2010; Shibata and Raphael, 2010).

Cell therapy approaches: Implantation of exogenous cells

Considerations on the host cell type to be replaced and the status of the host tissue

When evaluating the use of exogenous cells to replace damaged HCs a number of important problems emerge, such as: (a) the difficulty to access the auditory epithelium in humans, which would imply invasive methods for the administration of exogenous cells, (b) the exposure of the implanted cells to a hostile environment in the form of the endolymph, an extracellular fluid with high potassium content that is necessary for the correct functioning of the cochlea, and, primarily, (c) the challenge of trying to insert exogenous cells into such a highly organized structure as the OC. Studies have shown the critical importance of maintaining the correct numbers as well as the organization of both HCs and SCs for the proper functioning of the OC. Furthermore, the cells in this epithelium are linked by tight junctions that prevent mixing between the endolymph and the perilymph (Kim and Raphael, 2007), but also complicate the insertion and functional integration of exogenous cells into the epithelium. In contrast, replacing damaged SGNs requires considerably less surgical invasion and precise integration of the transplanted cells *in situ*. It has already been shown that transplants of exogenous embryonic stem cells (ESCs) or ESC-derived neural progenitors into the modiolus results in survival and migration of these cells and their differentiation into neurons that extend processes towards appropriate targets in the periphery (i.e. HCs) and centrally, to the brain (Okano et

Approaches to inner ear repair

al., 2005; Corrales et al., 2006; Sekiya et al., 2006; Shi et al., 2007). Importantly, differentiation of implanted ESCs into excitatory glutamatergic neurons has already been shown *in vivo* (Reyes et al., 2008). While acquisition of this phenotype is the *sine qua non* of auditory nerve replacement, it is possible that other features of auditory neurons (e.g. specific ion channels) do not need to be faithfully replicated in order to transmit some information from the HCs via the SGN to the cochlear nucleus. Overall, these results hold promise for an improved treatment of patients who either suffer from primary neuronal degeneration or use CIs. Since degeneration of SGNs following HC damage occurs over several years after HC loss (Groves, 2010), a reasonably large time window for therapy is offered.

The state of the host tissue is a critical factor to be considered when contemplating any therapeutical approach. Of note, increased survival and differentiation of transplanted cells has been shown in damaged inner ears, compared to uninjured controls (Ulfendahl et al., 2007; Matsuoka et al., 2007). For example, Hu et al. (2005c) reported higher survival rates of adult NSCs implanted into the scala tympani (ST) of neomycin-treated guinea pigs, compared to those implanted in normal-hearing animals. Okano and colleagues (2005) saw that approximately twice the number of transplanted cells survived in injured ears compared to normal ears. These data point to the release of some factor(s) from the injured inner ear that enhances both survival and differentiation of the exogenous cells. Regarding the replacement of missing SGNs, damage clearly leads to increased survival and migration of implanted cells. This is thought to result not only from an augmented production of trophic and chemotactic factors produced by the host tissue, but also from an increase in the space available for the implant, left behind by the degenerated SGN bodies and auditory nerves (Sekiya et al., 2006; Ogita et al., 2010).

Various groups have also demonstrated that the timing of the transplant following injury plays a critical role in the survival and engraftment of the donor cells. Overall, studies have shown that the number of engrafted cells decreases as the latency between damage and exogenous cell injection increases (Parker et al., 2007). Lang and co-workers (2008) confirmed that there is an optimal time window for engraftment and survival of ESCs during the early post-injury period (within 1-3 days after injury). This effect of timing of transplantation of the exogenous cells following injury to the inner ear is thought to be due to increased metabolism in the early post-injury cochlear micro-environment, with the concomitant production and release of factors that are otherwise not present in the healthy cochlea. In agreement with this hypothesis is the observation by Tan and colleagues (2008) that infiltration of labelled bone marrow (BM)-derived cells into the damaged cochlea during the first week after deafening coincides with a transient increase in the expression of stromal-derived factor 1 (SDF-1).

Considerations on the cell types to be used as donor cells

Regarding the cell type to be used for implants, a set of different variables must again be considered. Cells are required that can survive and migrate to appropriate locations once they are implanted. Survival of implanted cells has in general been reported to be very low (Hu et al., 2004, 2005c; Ulfendahl et al., 2007). Some variability has been observed among different cell types, and cell differentiation status prior to implantation appears to also play a part. It is widely accepted that differentiated donor cell types are more likely to elicit an adverse immune response than undifferentiated ESCs, since these latter do not express human leukocyte antigen (HLA) proteins. On the other hand, different cell types have been used as donor cells in transplantation studies in the cochlea and no adverse immune reactions have been reported, leading to claims that this organ is an immunoprivileged site that will allow xenotransplantation (Hildebrand et al., 2005; Regala et al., 2005; Ulfendahl et al., 2007; Reyes et al., 2008).

The implanted cells must also be capable of differentiating into the desired phenotype(s) as well as integrating and establishing adequate functional connections within the tissue. This will likely depend on both the local environment and the ability of the implanted cells to receive and respond to the signals sent by the host tissue. Various degrees of integration of the implanted cells into the host tissue and subsequent differentiation of these cells have been reported (Corrales et al., 2006; Altschuler et al., 2008). Some groups have observed the localization of donor cells to target areas but in the absence of any sign of differentiation or integration (Hildebrand et al., 2005). However a few studies have demonstrated the establishment of new functional connections between the donor cells and the host tissue. Martínez-Monedero et al. (2006) confirmed the ability of denervated HCs, explanted from post-natal cochleae, to attract new processes from neurons growing in their proximity, as well as the formation of synapsin-expressing terminal swellings at the contact points between neurons and HCs. Formation of neurite projections from differentiating donor cells implanted into the cochlear nerve trunk toward the denervated OC was also shown *in vivo* (Corrales et al., 2006). However, formation of functional synapses has not been demonstrated yet, and electrophysiological data are generally lacking.

Besides these considerations, a human source of exogenous cells is required that allows the systematic production of clinical-grade cells for transplants under well-controlled conditions, amenable to standardization and scaling-up (Rivolta, 2010). To date, the majority of studies have been carried out using stem-like cells of various origins. Nevertheless, these are still relatively heterogeneous cell populations and in some cases their availability implies going back to primary tissues as their source. Consequently, efforts are currently being made

by some groups to render the use of conditionally immortal cell lines a safe option for possible therapies (Pollock et al., 2006; Sekiya et al., 2007; Stevanato et al., 2009). Safe and effective transplants of such cells have been carried out in animals, with no reports of tumour formation (Nicholl et al., 2005; Pollock et al., 2006; Sekiya et al., 2007). In fact, some of these cell lines have already been produced under good manufacturing practice (GMP) conditions required for clinical applications, and tested for the treatment of disorders such as stroke (Pollock et al., 2006; Stevanato et al., 2009).

Route of implantation

Besides the cell type to be replaced and the source of exogenous cells to be implanted, one must also consider the route of implantation to be used (Jonkamonwiwat et al., 2010). Minimal damage to the cochlear architecture, together with implantation into locations that are as close as possible to the target sites and that allow a widespread distribution of the donor cells throughout the auditory organ are desired features. Integrity of the membranes that seal the endolymphatic and perilymphatic chambers is critical for normal hearing and damage to these membranes must therefore be avoided or minimized.

A considerable number of studies have been carried out that delivered the donor cells into the fluid-filled compartments of the cochlea, mostly into the easily accessible ST. This latter approach results in widespread distribution of the implanted cells while minimizing mechanical trauma to the cochlear cytoarchitecture. However, the flow of perilymph and concomitant dispersal of donor cells into the cerebrospinal fluid has been suggested as one of the likely reasons for the decline in the number of surviving cells observed at the injection site (Hildebrand et al., 2005; Coleman et al., 2006). In addition, injections of donor cells in the ST has yielded very low densities of exogenous cells in target areas such as Rosenthal's Canal (RC), where the spiral ganglion cells are located, making this delivery route too inefficient for SGN replacement therapy (Coleman et al., 2006; Matsuoka et al., 2006; Altschuler et al., 2008). Consequently, direct injection of donor cells into the auditory nerve has been very often adopted as an alternative route, as it requires minimal surgical trauma and results in extensive migration of the exogenous cells, not only along the entire nerve but also to the more distal scala media, where the HCs reside (Sekiya et al., 2006; Lang et al., 2008).

The route of implantation and subsequent distribution patterns of the injected cells are thought to play a role in the survival of donor cells. Overall, it appears that cells implanted intra-neurally survive better than those transplanted peri-neurally (Sekiya et al., 2006). As mentioned before, in a number of studies the donor cells were transplanted into the ST, with very low survival rates. An example of this is the work carried out by Ulfendahl et al. (2007) using ESCs. The authors

hypothesized that although the ST is an easily accessible location, it probably lacks essential factors required for the survival of transplanted cells. Importantly, survival of the ESCs was greatly enhanced when these cells were implanted together with small pieces of E13-E14 dorsal root ganglion (DRG) tissue (Hu et al., 2005a), pointing to the lack of some factor(s) in the adult cochlea that might be critical for the survival of the exogenous cells. Additionally, different groups (Hildebrand et al., 2005; Lang et al., 2008) have shown that the survival of implanted cells is higher in the perilymph than in the endolymph.

Some studies have demonstrated that the location of the implanted cells within the tissue also affects their differentiation. Parker and colleagues (2007) observed that NSCs transplanted into hearing-damaged mice differentially regulated their gene and protein expression depending on their location within the OC, demonstrating an influence of the cochlear micro-environment on NSC differentiation. Different morphology of neuralized ESCs depending on their location within the host tissue was also reported by Sekiya and co-workers in the inner ears of deafened rats (2006). Carrying out transplants of neuralized ESCs into the cochleae of deafened gerbils, Lang et al. (2008) showed that a small number of donor cells that were localised within the RC had differentiated into cells that expressed neurofilament-200, a marker of mature neurons, while no signs of neuronal differentiation were found outside this region. These are encouraging observations in support of cell therapy approaches for the treatment of hearing loss, as they indicate that the mature mammalian cochlea, despite its inability to regenerate lost cells, may retain the signals necessary to drive differentiation of stem cells towards cochlear cell phenotypes.

Cell types used for cell therapy in the inner ear

Having outlined some of the most important issues to be addressed when considering a cell therapy approach for treating hearing loss, we will now proceed to summarize the main findings obtained with the various types of cells tested.

(a) *Embryonic stem cells (ESCs)*. In a series of studies undifferentiated ESCs have been directly injected into the cochlea. One argument in favour of this approach is the plasticity of these cells, which might translate into a better response to the different micro-environmental cues the implanted ESCs will encounter within the various cochlear compartments; this would open the door to a possible regeneration of several cellular phenotypes, derived from the same transplant (Shi et al., 2007). Another advantage of using undifferentiated ESCs is their low immunogenicity, which makes a host immune response less likely.

Mouse ESCs transplanted into injured vestibulo-cochlear nerves of adult rats and guinea pigs survived up

to at least 9 weeks (Hu et al., 2004; Regala et al., 2005) and a fraction of these cells differentiated into either glial or neuronal lineages. Importantly, implanted cells were detected not only at the site of injection but also within the brain stem. When ESCs were implanted into the ST (Ulfendahl et al., 2007), surviving cells were identified close to the spiral ganglion region and along the nerve fibers projecting to OC, as well as in the scala vestibuli, indicating migration towards functionally relevant locations. Nevertheless, the survival rate of the transplanted cells was very low (1.1%-1.5%). Cell survival and neuronal differentiation of ESCs injected in the cochlea was greatly enhanced when the stem cells were implanted together with small pieces of embryonic mouse DRG tissue (Hu et al., 2005a). Moreover, formation of neurite-like projections from β III-tubulin-expressing donor cells towards peripheral SGN processes was only observed in the presence of the DRG co-graft. However, no differentiation of the ESCs to myosin VIIa-positive cells (a protein typically expressed by HCs) took place.

Altschuler et al. (2008) took the studies on survival and differentiation of ESCs implanted into the cochlea one step further and reported that continuous intrascalar administration of the neurotrophic factor (NF) glial-derived neurotrophic factor (GDNF) following injection of mouse ESCs into the cochleae of hearing-damaged guinea pigs resulted in increased survival of the implanted cells and a much higher rate of neuronal differentiation, compared to implants that did not receive GDNF. Moreover, the ESC-derived neurons were mostly of an excitatory glutamatergic phenotype (indicated by the expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1/2), and thus appropriate for functional replacement of auditory neurons. Most of the processes extended by the ESC-derived neurons were directed towards the OC or towards remaining SGNs in the modiolus. Unfortunately, no functional studies were conducted.

The data obtained from the aforementioned studies clearly indicate that successful differentiation and long-term integration of implanted ESCs will likely require either the co-grafting of some other tissue, or the simultaneous application of appropriate NFs. Alternatively, ESCs can be pre-differentiated *in vitro* in order to promote their final progression towards the desired phenotypes following implantation. One of the clear advantages of these latter methods, compared to the implants of undifferentiated ESC, is the diminished risk of tumour formation *in vivo*. The appearance of teratomas is always a major concern when injecting undifferentiated ESCs (Erdo et al., 2003; Sell, 2004), although it has not been reported by any of the groups cited above (Hu et al., 2005a; Regala et al., 2005; Altschuler et al., 2008). Other advantages are the fact that, unlike ESCs, ESC-derived populations may not be totally dependent on the cochlear environment for their survival and correct differentiation. Additionally, pre-differentiation may allow the selection of a more

homogenous and appropriate population of cells for implants. Since lineage analysis studies have provided evidence that SGNs and HCs are derived from a common neural precursor cell, a very frequently adopted approach has been the differentiation of ESCs to neuroectodermal progenitors prior to transplantation (Hildebrand et al., 2005; Coleman et al., 2007; Lang et al., 2008). These cells, albeit committed to the neural lineage, can still integrate into inner ear tissue and respond to various signals present within the cochlear environment (Corrales et al., 2006). Survival of these cells after implantation into either the ST (Coleman et al., 2006) or the auditory nerve (Sekiya et al., 2006) has already been demonstrated. Regarding their differentiation, divergent results have been obtained using various animal models (Hildebrand et al., 2005; Sekiya et al., 2006). Hildebrand and co-workers (2005) failed to detect any further differentiation of ESCs that were partially pre-differentiated to the neuroectodermal lineage following their implantation into deafened guinea pigs, in spite of long survival times and localization close to the damaged OC. In contrast, Corrales and colleagues (2006) reported progressive neuronal differentiation of ESC-derived mouse neural progenitor cells after injection into the cochlear nerve of immunosuppressed gerbils, with formation of abundant neuronal processes that traversed RC and grew towards the HCs in the OC. The observed projection pattern appeared to indicate that the newly formed neurites followed the former pathways of degenerated SGNs, responding to cues probably sent to them from the denervated OC. Moreover, these neurons expressed peripherin, a protein expressed in sensory neurons. Unfortunately, the authors could not carry out any test to assess functional recovery in the implanted animals, due to the formation of thick scar tissue at the site of surgery. Promising results were obtained by Okano and colleagues (2005), who implanted mouse ESC-derived neural progenitors into the cochlear modiolus of guinea pigs. This group confirmed survival and neural differentiation of the donor cells, which were shown to extend neurite projections toward peripheral and central auditory targets. Furthermore, auditory brain stem response (ABR) measurements indicated the potential of the transplanted cells for functional recovery of the damaged cochleae, although no direct evidence was presented for the establishment of synapses. Later on, Matsumoto and co-workers (2008) demonstrated the potential of ESC-derived neurons to form synaptic contacts with auditory HCs.

An alternative to driving ESCs into the neuroectodermal lineage prior to transplantation into the inner ear is to specifically pre-differentiate ESCs *in vitro* into the sought-after cellular type, i.e. auditory neurons or HCs. Coleman et al. (2007) co-cultured ESC-derived neural progenitors (grown in the form of floating aggregates termed embryoid bodies) with HC explants and observed that a proportion of the ESCs differentiated into neurofilament-68-protein-positive bipolar neuron-

like cells, analogous to mammalian auditory neurons grown *in vitro*. However although neuronal processes were observed, the authors did not observe any significant growth of these processes toward the HC explants. An interesting study carried out by Shi and colleagues (2007) demonstrated that, although human ESCs (hESCs) could be induced to differentiate into neurons, specification of sensory neurons required the addition of BMP-4 to hESC-derived neural progenitor cultures. The addition of BMP-4 to the cultures led to significant sensory neuron differentiation, characterized by the expression of peripherin, GATA3, neurogenin 1 (*ngn1*), *Brn3a*, *TrkB* and *TrkC*. The newly obtained neurons were shown to make contacts with HCs in denervated mouse OC explants and expressed synapsin, suggesting synapse formation. The same observation was made *in vivo* using a gerbil model: hESC-derived neurons engrafted in the auditory nerve trunk expressed peripherin, and 60 days after implantation had sent out abundant neurites that grew both peripherally toward the cochlea and centrally toward the brain stem. Unfortunately, the authors could not demonstrate synapse formation between the transplanted cells and the endogenous HCs.

Regarding *in vitro* differentiation of ESCs into HCs, work carried out by Heller and his group (Li et al., 2003b; Oshima et al., 2010) established a series of culture conditions that resulted in the expression of markers typical of HCs (e.g. *Math1*, *Brn3c*, Myosin VIIa) or SCs (*Jagged-1*, *p27*) in a proportion of ESC-derived neural progenitors. Importantly, further differentiation of these cells was accomplished by either co-culturing them with stromal cells derived from the chicken utricle or *in vivo*, by engrafting them into developing chick otic vesicles. Under these conditions, the authors observed formation of hair-bundle-like protrusions that stained for *espin* and displayed electrophysiological responses similar to those obtained from immature HCs.

An interesting alternative to differentiating ESCs towards either auditory neurons or HCs prior to their implantation into a host tissue has been presented by Reyes and colleagues (2008). Making use of the already available knowledge on the cues necessary for SGN differentiation *in vivo*, this group employed a mouse ESC line that carries a tet-inducible *ngn1* gene and showed that transient expression of this gene promoted the neuronal differentiation of cultured ESCs. Subsequent treatment with brain derived neurotrophic factor (BDNF) and GDNF resulted in 75% of these cells exhibiting a glutamatergic phenotype after 5 days *in vitro*. This inducible system allowed the authors to implant undifferentiated ESCs into deafened guinea pig cochleae and induce them to become neurons by forcing them to transiently express *ngn1*. The approach resulted in high rates of neuronal differentiation of the implanted ESCs. Upon subsequent infusion of BDNF and GDNF a high proportion (approx. 79%) of the ESC-derived neurons acquired a glutamatergic phenotype. However,

no electrophysiological data were presented.

As an alternative to the differentiation of ESCs into neurons, Olivius and colleagues transplanted embryonic DRG neurons into the cochlea (Hu et al., 2004; Regala et al., 2005; Ulfendahl et al., 2007). They showed survival and migration of the implanted cells to the spiral ganglion, along the nerve fibers projecting to the OC and towards the brain stem. The rate of cell survival was very low, although a clear improvement was observed following the application of nerve growth factor (NGF) (Hu et al., 2005b) or a combination of BDNF and ciliary neurotrophic factor (CNTF). Moreover, in the presence of NGF, the DRG cells formed extensive neurite projections that in some cases appeared to contact the host SGN, although no functional interaction between the donor tissue and the host neurons was demonstrated in this work.

(b) *Adult or tissue-derived (somatic) stem cells*. Several types of stem or progenitor populations are found in the adult organism that may serve as an alternative to the use of ESCs. The former cell types have been attributed a more limited ability for multi-lineage differentiation compared to ESCs. Nevertheless, they offer important advantages such as the possibility of autologous transplants, thereby avoiding problems of immune rejection, and the fact that they can be isolated from the adult organism without facing ethical conflicts raised by the use of ESCs. Below we summarize the efforts made towards achieving the regeneration of inner ear sensory cell types using different sources of adult stem/progenitor cells.

(b1) *Neural stem cells*. Despite the ability of ESCs to give rise to a plethora of cellular phenotypes, ESCs implanted into the cochlea of experimental animals most commonly differentiate into glial cells rather than into neurons (Altschuler et al., 2008; Lang et al., 2008). A number of groups have therefore employed neural stem cells (NSCs) instead of ESCs in an attempt to facilitate the differentiation of the transplanted cells into the auditory sensory lineage. The ability of NSCs to give rise to SGN-like neurons was demonstrated *in vitro* by Wei et al. (2008), who also reported the formation of functional synapses of these cells with HCs and deafferented SGNs. *In vivo*, NSCs have been shown to differentiate into neural, glial and HC-like phenotypes (Tateya et al., 2003; Hu et al., 2005c; Parker et al., 2007). Hu and colleagues (2005c) infused adult mouse NSCs into the ST of guinea pig cochleae and reported that survival and neuronal differentiation appeared to be enhanced within injured inner ears, as compared to normal controls (Hu et al., 2005c); nevertheless, overall survival was very poor in both groups (Ito et al., 2001; Hu et al., 2005c). The authors reported migration of the injected cells along the auditory nerve tract to locations near functionally important structures, such as the OC and the spiral ganglion. However, no contact was observed between the implanted cells and the host tissue (Ulfendahl et al., 2007). Differently from the results

obtained by Hu et al. (2005c), Parker and co-workers (2007) implanted a mouse clonal NSC line into sound-damaged mouse and guinea pig cochleae and reported the differentiation of these cells into a wide range of phenotypes, depending on their localization within the cochlea. Two to six weeks after implantation, a proportion of these cells was found in the spiral ganglion area and appeared to be differentiating into satellite cells, Schwann cells, and even SGNs. Very importantly, some of these cells also labelled for synapsin, suggesting a possible competence for synaptic transmission. Altogether, these data point towards an influence of the microenvironment of the cochlea on the differentiation of the implanted cells.

In another set of experiments Hu and colleagues (2005c) transduced NSCs with neurogenin2 (*ngn2*) to further promote their differentiation towards a neuronal phenotype. They observed better survival rates of *ngn2*-expressing NSCs implanted into normal hearing guinea pig cochleae, compared to control NSCs, although the numbers of surviving cells were very low in both groups. Neuronal differentiation was also enhanced by *ngn-2* transduction upon which NSC-derived β III-tubulin-expressing cells were identified in all inner ears that contained surviving NSCs. On the other hand, embryonic NSCs transduced with the *Atoh1* gene gave rise to both neurons and HCs, following their implantation into normal guinea pig cochleae (Han et al., 2010).

(b2) Bone marrow stem cells. Mesenchymal and hematopoietic stem cells. Initially isolated from BM and later on from other tissues such as muscle, synovial membranes, peripheral blood, umbilical cord blood and adipose tissue, mesenchymal stem cells (MSCs) are a heterogeneous population of stem/progenitor cells with pluripotent capacity to differentiate into cell types of all three embryonic layers (Krabbe et al., 2005). They are more easily harvested and expanded *ex vivo* than NSCs. Importantly, they have been extensively used in clinical applications, so their safety is known.

There have been a considerable number of reports on the neural differentiation of MSCs (Sánchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000; Deng et al., 2001). Interpretation of these data must nonetheless be carried out with caution, as it has been shown in some instances that rapid phenotypic changes of treated MSCs towards a neuronal morphology are often the result of a cytotoxic effect (Jin et al., 2003; Lu et al., 2004). Furthermore, expression of neuronal or glial proteins (e.g. β III-tubulin, MAP-2, GFAP) has been demonstrated in standard MSC cultures, in the absence of any specific induction protocol (Tondreau et al., 2004). In addition, cell fusion phenomena have been observed between transplanted MSCs and host tissue. Consequently, confirmation that a transdifferentiation process of MSCs towards neural lineages has taken place requires not only that the possibility of cell fusion has been excluded, but also that morphological, immunocytochemical and electrophysiological studies are carried out (Jin et al., 2003;

Krabbe et al., 2005).

The use of MSCs as donor cells for transplantations is further complicated by the fact that it is not yet clear which cell population is responsible for the observed cases of MSC transdifferentiation (Song and Sánchez-Ramos, 2003). There is some evidence for the presence of a set of quiescent primordial stem cells in adult tissues such as the BM and the brain that can differentiate into mesodermal, neuroectodermal and endodermal cell types, and thus might lead to an assumption of transdifferentiation of the cell cultures they are contaminating (Jiang et al., 2002b; Krabbe et al., 2005). These stem cells have been termed multipotent adult progenitor cells (MAPCs) (Jiang et al., 2002a). In a recent publication, Kuroda and colleagues (2010) have also reported the isolation of a type of human MSC that can give rise to cells corresponding to the three germ layers. These cells are present at very low frequencies in primary cultures of BM aspirates and have been named multilineage differentiating stress enduring (Muse) cells, as their numbers increase during passaging of BM cultures and exposure to stress conditions. An alternative hypothesis that has been proposed is that adult tissues might contain mixed populations of progenitor cells derived from distinct embryonic germ layers.

Regarding the transplants of BM-derived stem cells into the cochlea, survival and migration of these cells have been demonstrated (Naito et al., 2004; Matsuoka et al., 2007) and there are some reports on the differentiation of injected MSCs into neuronal-like cells *in vivo* (Naito et al., 2004). In order to investigate the potential for transdifferentiation of BM-derived cells in the cochlea, Tan et al. (2008) isolated these cells from GFP-transgenic donor mice and engrafted them into lethally irradiated mice. Shortly after acoustic trauma, prominent GFP-positive cell infiltration was observed in the cochlea, outside the sensory epithelial regions. This infiltration was most intense during the first week after deafening, coinciding with an up-regulation of SDF-1. However, most of the infiltrated BM-derived cells were identified as macrophages and GFP-positive cells did not exhibit any cochlear characteristics. No sign of ABR threshold recovery was observed up to 8 weeks after deafening. The main conclusion from this work was that, although acoustic damage resulted in a clear increase of the homing ability of the BM-derived cells to the cochlea, compared to control cochleae, these cells did not transdifferentiate into any cochlear cell type and did not contribute to its repair. As possible explanations for these results, the authors suggested that the damaged cochlea might not be sending out the necessary cues needed to attract pluripotent cells from the BM-derived cell pool and/or it might not provide the regenerative signals required for BM-derived cells to transdifferentiate into appropriate cell types. Similar results were obtained by Lang and co-workers (2006), who confirmed homing of BM-derived cells to the inner ear of irradiated mice, outside the epithelial regions; although some implanted cells expressed proteins typical

of specialized fibrocytes involved in ion transport, the authors did not observe transdifferentiation of any donor cell into either HCs or neurons.

Overall, MSCs have been shown to survive in and migrate to multiple sites within the cochlea following implantation (Matsuoka et al., 2007). However, the rates of neuronal differentiation of these cells are reportedly very low, both in normal and in hearing-damaged animal models. In light of these results, Ogita et al. (2010) adopted a method for the neural induction of BM-MSCs isolated from adult guinea pigs prior to their transfer into the modiolus of adult guinea pigs. Neuronal differentiation of the MSCs was observed in $18.6 \pm 6.4\%$ and $24.1 \pm 5.3\%$ of the transplants in the normal and damaged cochleae, respectively. However, no difference was found between transplanted and control animals in the number of surviving SGNs following ouabain treatment, indicating that the transplanted cells did not promote the survival of host SGNs. This was consistent with the ABR results, showing that no significant functional recovery of the damaged cochleae had occurred. This result differed from the recovery of ABR thresholds observed by the same group when using mouse ESC-derived neural progenitors (Okano et al., 2005). It is possible that the MSCs did not differentiate into the appropriate neuronal subtype (glutamatergic), and thus lacked the characteristics of auditory neurons. The ability of MSCs to differentiate into glutamatergic neurons was demonstrated *in vitro* by Kondo and colleagues (2005). These authors observed that, although a marked up-regulation of neuronal markers was observed in mouse BM-MSCs exposed to bFGF/Forskolin, expression of sensory neuronal markers was only detected when the cells were also treated with a combination of Shh and RA, two molecules that are secreted in the vicinity of peripheral sensory ganglia during embryogenesis. Co-culture experiments with pre-natal mouse OC explants revealed that the BM-MSC-derived neurons extended processes towards HCs.

Not only have BM-MSCs been shown to differentiate into glutamatergic neurons *in vitro*, but also into HC-like cells, as reported by Jeon and colleagues (2007). This group used a combination of growth factors to drive mouse BM-MSCs into a neurosensory progenitor phenotype. As observed by Heller's group (Li et al., 2003b) with ESCs, further differentiation of the progenitors into a mature HC phenotype (e.g. expression of markers such as myosin VIIa, espin, and presence of protrusions resembling stereociliary bundles) was observed when these cells were either co-cultured with embryonic day 3 (E3) chick otocyst cells or injected *ex vivo* into E3 chick otocysts. Alternatively, further maturation of the progenitors was achieved by forced expression of the transcription factor *Atoh1*, required for HC formation in the inner ear.

(b3) Olfactory bulb precursor cells. The olfactory neuroepithelium is the only tissue in the body where damaged or dead neurons are replaced throughout life, and this is due to the presence of multipotent stem cells

(Roisen et al., 2001; Othman et al., 2005). These cells can be easily and abundantly obtained, making this tissue a very important source of stem cells for autologous transplantation. Following culture of mouse olfactory precursor cells in the presence of conditioned medium from adult mouse cochlear cultures or in co-culture with these cells, Doyle and colleagues (2007) reported differentiation of a proportion of these precursors into cells that expressed proteins found in HCs (i.e. myosin VIIa, espin, calretinin, prestin). These results pointed to the presence of soluble factors in the cochlear cultures capable of inducing differentiation of non-auditory cells.

(b4) Ependymal cells. A population of proliferative cells that exhibit morphological and functional characteristics similar to those of HCs was isolated by Wei and co-workers (2008) from the ependymal layer of the lateral brain ventricle of adult rodents and humans. These cells expressed various HC proteins (e.g. myosin VIIa, myosin VI, the HC synaptic protein ribeye) and large-conductance FM1-43 permeable channels, possessed stereociliary and kinociliary bundles, and were capable of establishing functional synapses with primary SGNs *in vitro*. Interestingly, these cells incorporated well into the sensory epithelia of explanted cochleae from which HCs had been eliminated. The authors thus proposed ependymal cells as candidates to take over functional roles of HCs in the damaged inner ear.

(b5) Inner ear stem cells. Stem cells of the inner ear have been isolated from the vestibular organs of mice (Li et al., 2003a; Oshima et al., 2007), from the mouse OC (Oshima et al., 2007; Savary et al., 2007, 2008) and from the spiral ganglion (Rask-Andersen et al., 2005; Oshima et al., 2007), applying a sphere-formation assay routinely used with CNS stem cells (Martínez-Monedero et al., 2007). Li and colleagues (2003a) showed that inner ear stem cells isolated from the adult mouse utricle could give rise to cells from the three germ layers. Moreover they could also differentiate into auditory neurons and HC-like cells that expressed multiple HC markers, presented hair-bundle-like protrusions, and expressed functional ion channels similar to those of embryonic HCs. Martínez-Monedero and co-workers (2008) demonstrated that this differentiation could occur spontaneously *in vitro*, in the absence of any added growth factor. Inner ear stem cells gave rise to HC-like and glial cells, as well as to auditory-like neurons that responded to glutamate, fired action potentials and sent out processes towards explants of denervated OCs, where they formed contacts with HCs. Very relevant is also the finding by Rask-Andersen and colleagues (2005) who described a stem/progenitor cell population present in adult human and guinea pig spiral ganglia. These cells formed nestin-expressing spheres *in vitro* and could differentiate into neurons and glial cells. The newly emerged neurons expressed TrkB and TrkC, receptors for the NFs BDNF and neurotrophin-3 (NT-3). These data support the notion that inner ear stem cells keep some kind of memory of their tissue of origin, and

seem to follow an innate program to differentiate towards the corresponding auditory phenotypes. Oshima and co-workers (2007) pointed out intrinsic differences in the potential of stem cells isolated from distinct inner ear tissues to give rise to auditory phenotypes. Accordingly, spiral ganglion-derived spheres appear to give rise mostly to neurons and glial cell types, while spheres derived from the OC or vestibular sensory epithelia most frequently give rise to HCs.

An interesting population of auditory progenitors was identified by Rivolta and his group (Chen et al., 2007, 2009) in cochleae from 9-11-week-old human fetuses (human fetal auditory stem cells or hFASCs). In contrast to some of the progenitors described above (Rask-Andersen et al., 2005; Savary et al., 2007), these cells were capable of undergoing long-term *in vitro* expansion (i.e. for at least up to 1 year). Furthermore, hFASCs could differentiate into HC-like and sensory neuron-like cells that exhibited functional and electrophysiological properties similar to those of developing cochlear HCs and auditory neurons *in vivo*; cells expressing SC markers were also obtained from hFASCs.

The presence of stem cells in the post-natal inner ear appears contradictory with the observed lack of regeneration in the mature cochlea following otic damage. However, lower numbers of sphere-forming cells in early postnatal cochleae compared to embryonic tissue have been reported by Savary and co-workers (2008), and Oshima and colleagues (2007) recently demonstrated that there is a radical loss of stem cells in the mammalian cochlea during postnatal maturation of the auditory system. While cochlear tissues isolated from mice not older than 3 weeks of age harbour sphere-forming cells, this capacity appears to be practically absent in the cochlea of older mice. This seems to be due to either death of these stem/progenitor types or to a loss of their stem cell features. Regarding this latter possibility, in the young mammalian cochlea it is not yet clear which cell population stem cells are derived from. Zhai and co-workers (2005) isolated a population of HC progenitors from the lesser epithelial ridge (LER) of neonatal rats. This tissue is juxtaposed to the outer hair cells and, together with the medially located greater epithelial ridge (GER), it has been proposed as a potential source for HC progenitors, as both of these tissues may give rise to HCs when forced to express *Atoh1* (Zheng and Gao, 2000; Shou et al., 2003; Zhai et al., 2005). Zhai and colleagues (2005) demonstrated that isolated LER cells grown as spheres in the presence of EGF proliferated and could differentiate into HC-like and SC-like cells when co-cultured with utricular mesenchymal cells, in a pattern reminiscent of the sensory epithelium *in vivo*. In another set of experiments, Malgrange and colleagues (2002) detected nestin expression in the GER region and below the IHC of rats between embryonic day 19 (E19) and postnatal day 7 (P7); they observed that *in vitro* non-adherent culture of nestin-positive cells isolated from the newborn

rat OC led to their differentiation into HC-like and SC-like cells. Interestingly, nearly one third of the HC-like cells present after 2 days of suspension culture were produced following cell division, as indicated by myosin VIIa/BrdU double labeling.

It has also been hypothesized that HC progenitor cells in the early postnatal period might in fact be SCs, as it has been shown that SCs isolated from neonatal mice can divide and transdifferentiate into HC-like cells *in vitro* (White et al., 2006). Interestingly, an *Abcg2*-expressing side population (SP) of progenitor cells has been identified within the population of SCs in the P3 mouse cochlea and can be isolated by FACS sorting (Savary et al., 2007). These cells also express another stem cell marker, *Musashi1*, proliferate and give rise to HCs and SCs *in vitro*. Of note, they have a very limited capacity for self-renewal (i.e. only two passages), in contrast to stem cells isolated from the vestibular system, where a limited amount of HC regeneration has been observed. Intrinsic changes in the ability of SCs to give rise to HCs over time have also been reported. White and co-workers (2006) demonstrated that SCs isolated from P14 mouse cochleae failed to down-regulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27, compared to cultures of SCs isolated from neonatal mice. This inability to re-enter the cell cycle was associated with lower numbers of cells transdifferentiating into HCs. In addition to a loss of phenotypic plasticity of progenitor cells during maturation of the mammalian cochlea, the observed lack of regeneration of lost cell types in the injured auditory system might also be related to the presence of *in vivo* mechanisms that are inhibitory for cell proliferation. Data from different groups (White et al., 2006; Savary et al., 2007) point to the existence of pools of progenitor cells present in the OC of post-natal animals that are capable of proliferating under the appropriate *in vitro* culture conditions following their isolation from the original tissue.

Regeneration by endogenous cell types

As already mentioned above, one of the main hurdles when approaching inner ear cell therapy is the correct integration of the transplanted cells into the host tissue. Transdifferentiation of endogenous inner ear cell types might overcome this problem (Shibata and Raphael, 2010). Studies on avians and other non-mammalian systems (Stone and Cotanche, 2007; Cotanche, 2008; Yu et al., 2010), and the similarities found with embryonic and neonatal mammalian auditory organs (Fekete and Wu, 2002; Daudet and Lewis, 2005) have led to the hypothesis that de-differentiation of SCs, non-sensory cells that are adjacent to HCs and that share a common precursor with them, might be a potential route to the replacement of HCs. While continued expression of the cell cycle inhibitor p27 in HCs and SCs of the mature avian sensory organ does not appear to inhibit regeneration (Cotanche and Kaiser, 2010),

failure of the adult mammalian SCs to re-enter the cell cycle has been attributed, among other reasons, to their inability to suppress this inhibitor (White et al., 2006; Ono et al., 2009). Therefore, some of the attempts to obtain new HCs have focused on the down-regulation of this and other inhibitors such as retinoblastoma (Rb), which also plays a role in maintaining the postmitotic state of SCs and HCs (Sage et al., 2005; Laine et al., 2007). Indeed, inactivation of these proliferation inhibitors in mammalian SCs has led to cell cycle re-entry of some SC populations (Minoda et al., 2007; Ono et al., 2009; Yu et al., 2010). Moreover, while some groups have not observed transdifferentiation of the cycling SCs into HCs, others have reported the production of excess SCs as well as supernumerary HCs (Chen et al., 2003; Sage et al., 2005, 2006; Weber et al., 2008) following mitosis. However, this abnormal proliferation of SCs ultimately resulted in markedly increased apoptotic rates of the newly generated cells which in turn led to a disruption of the sensory epithelium and subsequent hearing loss (Sage et al., 2005; Laine et al., 2007; Weber et al., 2008; Ono et al., 2009; Groves, 2010). Similarly, inactivation of Rb in postmitotic HCs was shown to result in cell cycle re-entry, although these cells died at different stages before mitosis was complete (Weber et al., 2008).

Failure of SCs that have re-entered the cell cycle to give rise to HCs has led to the hypothesis that additional factors are required. A main candidate is Math1/Atoh1, encoding a basic helix-loop-helix transcription factor and considered to be a master gene for the specification of the HC lineage (Woods et al., 2004; Jeon et al., 2007; Han et al., 2010). Absence of Atoh1 in knock-out mice results in the loss of HCs in the sensory epithelium and disrupted differentiation of cochlear SCs (Bermingham et al., 1999; Woods et al., 2004). On the other hand, it has been reported that over-expression of this gene may lead to the formation of supernumerary HC-like cells (Zheng and Gao, 2000; Zheng et al., 2000; Gubbels et al., 2008) both *in vitro* and *in vivo*, and this may occur in the absence of proliferation (Shou et al., 2003). These cells have been shown to express HC proteins such as myosin VIIa and calretinin and display HC morphology and stereociliary bundles (Zheng et al., 2000; Kawamoto et al., 2003; Shou et al., 2003; Izumikawa et al., 2005). In some cases, the newly emerged HCs exhibited electrophysiological properties similar to those of already existing HCs and some appeared to attract neurofilament-bearing processes from either the OC or the cochlear nucleus (Kawamoto et al., 2003; Gubbels et al., 2008). Furthermore, Izumikawa and co-workers (2005) reported reduced ABR thresholds in the ears of hearing-damaged adult guinea pigs that had been transduced with an Atoh1-GFP construct, compared to non-inoculated control ears. This was associated with the appearance of a substantial number of mature HC-like cells in the deafened cochlea. The same group observed that, while novel HCs detected within the OC exhibited normal HC-like morphology and orientation, these

features were not maintained in neighbouring ectopic HCs. In fact, some of these cells displayed a mixed phenotype between HCs and SCs, pointing to transdifferentiation of SCs to HCs following misexpression of Atoh1 (Izumikawa et al., 2005). As mentioned above, other non-sensory inner ear cell types have been shown to give rise to new HCs following Atoh1 over-expression; this is the case for cells present in the GER and LER (Zheng et al., 2000; Shou et al., 2003).

With regards to transdifferentiation of non-sensory cells to HCs via their genetic manipulation it is very important to bear in mind the status of the damaged tissue before its repair (Izumikawa et al., 2005). SCs in damaged cochleae undergo a series of marked morphological changes, expanding and forming scars that prevent the perilymph and endolymph from mixing (Oesterle and Campbell, 2009). Extensive otic injury can ultimately result in the absence of differentiated SCs, which are replaced by a simple epithelium with cuboidal or flat appearance; forced expression of Atoh1 in this epithelium does not lead to any morphological changes and HCs are not regenerated, indicating that the presence of differentiated SCs is a prerequisite for Atoh1-mediated transdifferentiation (Izumikawa et al., 2008).

Together with Atoh1, the Notch signalling pathway also plays a key role in regulating the numbers of HCs that form in the OC. It has been shown that inhibition of this pathway in the mammalian inner ear leads to the formation of supernumerary HCs derived from either the transdifferentiation of SCs into HCs and/or the differentiation of sensory progenitor cells still present in early postnatal cochlear tissue (Zine et al., 2000; Kiernan et al., 2005; Yamamoto et al., 2006; Doetzlhofer et al., 2009; Groves, 2010). Nevertheless, this effect gradually diminishes during development in mammals (Zine et al., 2000) and it is practically absent in adults. This is thought to result from changes in the expression of Notch pathway components (Hori et al., 2007; Batts et al., 2009; Groves, 2010). Work carried out by Ito's group (Hori et al., 2007) has revealed very low or absent Notch1 and Jagged1 expression in the cochlea of adult guinea pigs, in contrast with the higher expression levels found in the GER and SCs of embryonic auditory epithelia. In addition, and in agreement with the results obtained by Batts and co-workers (2009), Hori and colleagues (2007) observed up-regulation of both genes in the inner sulcus region of the auditory epithelium following ototoxic treatment of adult animals. Notch inhibition in these animals led to the formation of ectopic HCs, in contrast to its effects on the cochleae of normal-hearing control animals. Damage prior to Notch inhibition was therefore required for ectopic HC formation to take place. Importantly, a time window was identified in mammals when interference with Notch pathway activation may lead to an increase in HC production in damaged auditory epithelia. This appears to be dependent on the species as well as on the severity of the lesion (Oesterle et al., 2008; Batts et al., 2009).

Promoting the survival of cell types that remain in the cochlea following otic injury

Cell therapy approaches: Introduction of exogenous cells

A very important aspect of inner ear therapy consists in promoting the survival of cell types that remain following otic injury. This is especially critical in the case of SGNs, given the requirement for a certain population size of healthy SGNs that ensure the efficacy of cochlear implants in hearing-damaged patients. Several NFs have been identified that can promote regeneration and enhance the function of surviving cells (see below). Maintenance of SGNs in the damaged inner ear may require long-term administration of these factors; however, the osmotic pumps employed for intracochlear infusion of NFs have a finite life-span (Gillespie et al., 2003; Shepherd et al., 2008). Repeated replacement of these pumps conveys the serious risk of infection within the cochlea, which makes these devices unsuitable for clinical applications. On the other hand, use of viral vectors to deliver therapeutic molecules may yield high and sustained expression of the gene of interest (Liu et al., 2005; Konishi et al., 2008), but carries the risk of potential toxicity. *Ex vivo* gene manipulation of appropriate cell types and their subsequent use as a source of NFs following their transplantation into the inner ear has emerged as an alternative therapeutic option. Various cell types have already been tested, such as HSCs, NSCs, fibroblasts and Schwann cells; the latter are especially interesting, since they are amenable to genetic manipulation, can be easily obtained and used autologously. Importantly, and differently from the setting when differentiation of exogenous cells into specific inner ear cell types is sought-after, the implantation of donor cells that act as delivery vectors for the production of trophic factors should not require precise morphological integration of these cells into the host tissue (Sekiya et al., 2006). Additional support for the use of cell/gene therapy versus the direct infusion of relevant trophic factors is underlined by studies such as that carried out by Pettingill and colleagues (2008), who demonstrated that Schwann cells genetically modified to over-express BDNF elicited a greater effect on the survival of rat SGNs *in vitro*, compared to the direct application of recombinant BDNF. These results indicate that Schwann cells produce some additional factor(s) that acted synergistically with the secreted BDNF.

Okano and colleagues (2006) demonstrated for the first time the possibility of using genetically modified cells as vectors for the local and sustained delivery of therapeutic agents into the cochlea. Prior to transplantation, this group transfected the fibroblast cell line NIH3T3 with the BDNF gene, whose product had previously been shown to efficiently protect HCs and SGNs from various ototoxic insults. Okano and co-workers confirmed survival and settlement of the engineered cells in the perilymphatic space of the

cochlea and vestibule and a significant increase in BDNF protein levels in the inner ear. Subsequent work by Pettingill and co-workers (2008) demonstrated that rat Schwann cells genetically modified to over-express BDNF or NT-3 enhanced rat SGN survival *in vitro* compared to both control Schwann cells or recombinant neurotrophin proteins.

Interestingly, it has been observed that besides genetically modified cells, also normal, unmodified cells such as stem cells of various types, e.g. HSCs, BM-MSCs or NSCs may contribute to the survival and function of remaining inner ear cell types (Krabbe et al., 2005; Yoshida et al., 2007; Whitlon et al., 2009). In this regard, the beneficial effects observed following transplantation of MSCs into injured tissue may be at least partially mediated by their production of trophic and protective factors (Krabbe et al., 2005; Caddick et al., 2006). In line with this argument are also the data by Yoshida and colleagues (2007), who reported that treatment with HSCs ameliorated progressive HC damage caused by transient cochlear ischemia in gerbils and prevented a shift in ABR thresholds. While no transdifferentiation of the implanted cells into cochlear cells or fusion events were observed, HSC injection appeared to up-regulate the expression of GDNF in the OC following ischemia.

Hakuba and co-workers (2005) observed that injection of NSCs into the inner ear of gerbils that had suffered cochlear ischemia resulted in a markedly reduced injury-induced ABR threshold shift and decreased inner HC damage, compared to the non-transplanted side. These effects were also considered to be the result of increased production of NFs or cytokines by the implanted cells. In an *in vitro* study, Chen and colleagues (2010) showed increased proliferation of auditory cell cultures grown in NSC-conditioned medium, compared to controls, and correlated this effect with higher concentrations of leukemia inhibitory factor (LIF) in the NSC-conditioned medium, leading to activation of the LIF/JAK/STAT signalling pathway. LIF had already been previously shown to improve survival of SGNs (Marzella et al., 1999; Whitlon et al., 2006). Regarding the use of NSCs for repair of inner ear damage, it is also worth taking into account the observations made by Ourednik and colleagues (2002) in the CNS. They observed that transplanted NSCs appeared to have an inherent ability to migrate to damaged areas and, rather than differentiating into “replacement” cells, rescue the damaged host neurons from undergoing permanent functional impairment. They attributed this positive effect of undifferentiated NSCs to the secretion of important trophic and/or neuroprotective factors, such as GDNF. On the other hand, work carried out by Ito and co-workers (Iguchi et al., 2003) showed that a population of NSCs injected into mouse inner ears spontaneously differentiated into glial cells, and started expressing GDNF and BDNF, thereby contributing to SGN survival.

In addition to the production of trophic factors,

implanted cells may also exert beneficial effects on remaining auditory cell types through other means, such as the secretion of extracellular matrix proteins and the expression of cell adhesion molecules on their surface. Whitlon et al. (2006) reported improved survival of SGNs that had been co-cultured with Schwann cells, as compared to controls, and attributed this positive outcome not only to the production of NFs by the glial cells (Hansen et al., 2001) but also to the establishment of direct cell-cell contacts. The Schwann cells appeared to provide a favourable microenvironment for the regeneration of auditory neurons and served as a substrate for neuronal attachment and growth (Whitlon et al., 2009). Similar observations have been recently made with olfactory ensheathing cells (OECs): conditioned medium from these cells promoted the survival and proliferation of cultured SGNs (Liu et al., 2010; Yu et al., 2010), in agreement with the reports on the ability of these cells to secrete NFs such as NGF, BDNF, NT-3 and GDNF. Nevertheless, survival of the plated SGNs was most markedly enhanced when the neurons were cultured in direct contact with the OECs themselves (Liu et al., 2010). Interestingly, expression of adhesion molecules implicated in neuronal survival (e.g. NCAM) was detected in OECs (Liu et al., 2010).

Protection via administration of survival factors

As mentioned above, maintenance of a certain population of functional SGNs is necessary for CIs to exert a beneficial effect following HC loss. SGN development and survival is dependent on the presence of various NFs as well as neural activity (Schimmang et al., 2003; Alam et al., 2007; Hildebrand et al., 2008; Shepherd et al., 2008), which are provided to a large extent by HCs and SCs within the OC. While HC degeneration is mostly irreversible by the time it is detected, SGN loss is usually a slow process in humans, offering a reasonably wide therapeutic window. Regarding HC loss, factors such as GDNF and NT-3, as well as anti-oxidants have been identified (Shoji et al., 2000a,b; Hakuba et al., 2003; Liu et al., 2008) that could exert a prophylactic effect on the survival and function of HCs if administered prior to otic damage. Application of these factors may be useful for some groups of patients who require aminoglycoside treatment (e.g. gentamicin) and are at risk of developing hearing loss (Talaska et al., 2006; Bitner-Glindzicz et al., 2010; Prayle and Smyth, 2010). Regarding the protection/regeneration of SGNs, administration of NFs, electrical stimulation and anti-oxidative treatment are the approaches most extensively studied (Pettingill et al., 2007; Shepherd et al., 2008). It has been demonstrated that expression of NF receptors is maintained in SGNs of deafened animals (Gillespie et al., 2004; Hurley et al., 2004) and NF administration has resulted in improved survival of auditory neurons (Meen et al., 2009). Of note, improved SGN survival was also obtained with some NF combinations in studies where the

administration of the treatment was delayed to a timepoint when degenerative and apoptotic processes were already ongoing (Yamagata et al., 2004; Miller et al., 2007; Pettingill et al., 2007). In addition to improved survival, some studies have reported enhanced resprouting of auditory peripheral processes (Altschuler et al., 1999; Wise et al., 2005). A considerable amount of work has been done on the delivery of BDNF and/or NT-3 into hearing-damaged animal models, using osmotic pumps or alginate beads (Gillespie et al., 2004; Yamagata et al., 2004; Noushi et al., 2005; Richardson et al., 2005; Wise et al., 2005). Other factors that have been administered are NGF, GDNF, CNTF, LIF, transforming growth factor- β (TGF- β), and fibroblast growth factor (FGF), alone or in different combinations (Marzella et al., 1999; Shoji et al., 2000b; Shinohara et al., 2002; Gillespie et al., 2004; Gillespie and Shepherd, 2005; Miller et al., 2007). Some studies used viral vectors for NF expression (Yagi et al., 2000; Kanzaki et al., 2002; Nakaizumi et al., 2004), since it has been shown that long-term administration of these compounds is necessary in order to obtain a significant effect on SGN survival (Gillespie et al., 2003; Richardson et al., 2005). Very recent work has focused on the specific targeting of nanoparticles to SGNs, using organotypic explant cultures of the inner ear (Roy et al., 2010). This might be a new therapeutic option for the selective delivery of NFs that should reduce the risk of non-specific effects of the administered factors on other cell types. Unregulated NF administration might lead to errors in the re-innervation patterns of the surviving SGNs, since it is known that NFs not only exert an effect on neuron survival but also on axon guidance (Tessarollo et al., 2004).

Following the same trend as other studies on NF administration, intracochlear infusion of GDNF or a combination of BDNF and CNTF (Shinohara et al., 2002) has been shown to enhance SGN survival in damaged inner ears (Gillespie and Shepherd, 2005; Fransson et al., 2010). Importantly, these two studies associated increased SGN survival rates to significantly lower ABR thresholds, compared to non-treated damaged controls. Interestingly, while there have been some reports on an accelerated loss of SGNs following BDNF treatment withdrawal (Gillespie et al., 2003; Shepherd et al., 2008), Ulfendahl and co-workers (Maruyama et al., 2008; Fransson et al., 2010) reported that the beneficial effects of GDNF administration on SGN survival were maintained for at least two to four weeks after the treatment had ceased. Although differential effects of GDNF and BDNF and/or the production of endogenous survival factors after a certain period of time following otic injury could explain this divergence, it must also be mentioned that the data on the effects following BDNF withdrawal do not appear to be consistent (Miller et al., 2006; Agerberg et al., 2009).

Chronic electrical stimulation (ES) has been demonstrated to enhance the effects of NFs on SGN survival (Miller and Altschuler, 2004; Shepherd et al.,

2005). Work done by Shepherd and colleagues (2005) revealed that while chronic ES of damaged guinea pig cochleae did not enhance SGN survival compared to non-treated controls, co-treatment with both ES and BDNF led to increased SGN survival and reduced ABR thresholds when compared both to deafened controls and also to cochleae that had only received BDNF. These results pointed to a synergistic interaction between both treatment regimes. Interestingly, it was shown that, following an initial period of ES and BDNF co-treatment, ES could on its own sustain SGN survival, overcoming the requirement for continuous BDNF administration (Shepherd et al., 2008). Highly relevant for the possible application of NF therapy to humans is the observation that combined ES/NT therapy protects SGNs from degenerating and preserves functional responses even when the application of the treatment is delayed (Yamagata et al., 2004; Song et al., 2008; Scheper et al., 2009) and significant neurodegeneration has already taken place.

Another therapeutic approach consisted in the application of anti-oxidants, based on the observation that otic damage of different etiologies leads to formation of reactive oxygen species that ultimately results in apoptotic or necrotic processes (Henderson et al., 2006; Poirrier et al., 2010). In this context, Maruyama and colleagues (2007) demonstrated that anti-oxidant treatment increased both survival and electrical responsiveness of SGNs in hearing-damaged animals.

Conclusions

The majority of sensorineural hearing loss cases are due to the degeneration of the mechanotransducing cells in the inner ear, the hair cells. Their loss is irreversible and any therapeutical approach based on the implantation of exogenous cells into the cochlea will face the formidable task of integrating these cells into the highly organized and complex cytoarchitecture of the Organ of Corti. Therefore, it is likely that current efforts directed to the *ex vivo* differentiation of exogenous cells into HC-like cells will find their most immediate use in drug testing and expression profiling studies. The latter studies will be crucial for the improvement of the current HC differentiation protocols and, especially, the establishment of future therapies, as they should shed light on the factors that control HC specification and differentiation *in vitro*, processes that have not yet been well characterized. At present it appears that the best approach towards HC replacement strategies would be based on the differentiation of endogenous inner ear cells towards the sensory lineage, as shown by the promising results obtained by Izumikawa and colleagues (2005) following *Atoh1* overexpression in hearing-damaged cochleae. Some evidence exists pointing to the capacity of some supporting cell (SC) populations to act as the sought-for stem-like cells in the inner ear (Savary et al., 2007); the loss of their plasticity in the adult organism has been linked to changes in their phenotype and/or changes in the surrounding tissue. Induced

alterations in some of their properties, such as their cytoskeletal arrangement or their quiescent status, via Rho inhibitors (Meyers and Corwin, 2007; Burns et al., 2008) and/or cyclin-dependent kinase inhibitors, could perhaps potentiate the effects observed upon ectopic expression of genes such as *Atoh1*.

Cell therapy approaches might be more easily applied to protocols aimed at either promoting the survival of cochlear cell types or replacing degenerated auditory neurons, processes that will likely not require such a highly precise integration of the donor cells into the host tissue. A wide range of cell types have already been evaluated for their possible use in cell-based therapies. Most of them were not human in their origin and therefore very extensive characterisation of possible human cell sources will still be required prior to their use in the clinic. In this regard, results obtained in our lab using human MSCs suggest that, compared to murine MSCs, there may exist important differences between their *in vitro* responses to differentiation cues aimed at driving them towards auditory sensory lineages. On the other hand, current work on induced pluripotent stem cells (Takahashi and Yamada, 2006; Takahashi et al., 2006, 2007; Tsuji et al., 2010) is yielding promising results in the auditory system (Nishimura et al., 2009; Oshima et al., 2010); these cells might represent a compromise between critical parameters such as ease of isolation and expansion, phenotypic plasticity and availability for autologous transplantation.

Acknowledgements. This work was supported by a grant from the MICINN (PLE2009-0098), Ciberneted, Tercel and Red de Terapia Celular de Castilla y León.

References

- Agterberg M.J., Versnel H., van Dijk L.M., de Groot J.C. and Klis S.F. (2009). Enhanced survival of spiral ganglion cells after cessation of treatment with brain-derived neurotrophic factor in deafened guinea pigs. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 10, 355-367.
- Alam S.A., Robinson B.K., Huang J. and Green S.H. (2007). Prosurvival and proapoptotic intracellular signaling in rat spiral ganglion neurons *in vivo* after the loss of hair cells. *J. Comp. Neurol.* 503, 832-852.
- Altschuler R.A., Cho Y., Ylikoski J., Pirvola U., Magal E. and Miller J.M. (1999). Rescue and regrowth of sensory nerves following deafferentation by neurotrophic factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 884, 305-311.
- Altschuler R.A., O'Shea K.S. and Miller J.M. (2008). Stem cell transplantation for auditory nerve replacement. *Hear. Res.* 242, 110-116.
- Batts S.A., Shoemaker C.R. and Raphael Y. (2009). Notch signaling and Hes labeling in the normal and drug-damaged organ of Corti. *Hear. Res.* 249, 15-22.
- Bermingham N.A., Hassan B.A., Price S.D., Vollrath M.A., Ben-Arie N., Eatock R.A., Bellen H.J., Lysakowski A. and Zoghbi H.Y. (1999). *Math1*: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284, 1837-1841.
- Bermingham-McDonogh O. and Rubel E.W. (2003). Hair cell regeneration: winging our way towards a sound future. *Curr. Opin.*

- Neurobiol. 13, 119-126.
- Bitner-Grindzicz M., Osei-Lah V., Colvin I., Sirimanna T., Lucas D., Mac Ardle B., Webb D., Shankar A., Kingston J., Jenkins L. and Rahman S. (2010). Aminoglycoside-induced deafness during treatment of acute leukaemia. *Arch. Dis. Child.* 95, 153-155.
- Brigande J.V. and Heller S. (2009). Quo vadis, hair cell regeneration? *Nat. Neurosci.* 12, 679-685.
- Brignull H.R., Raible D.W. and Stone J.S. (2009). Feathers and fins: non-mammalian models for hair cell regeneration. *Brain Res.* 1277, 12-23.
- Burns J., Christophel J.J., Collado M.S., Magnus C., Carfrae M. and Corwin J.T. (2008). Reinforcement of cell junctions correlates with the absence of hair cell regeneration in mammals and its occurrence in birds. *J. Comp. Neurol.* 511, 396-414.
- Caddick J., Kingham P.J., Gardiner N.J., Wiberg M. and Terenghi G. (2006). Phenotypic and functional characteristics of mesenchymal stem cells differentiated along a Schwann cell lineage. *Glia* 54, 840-849.
- Chen H.C., Ma H.I., Sytwu H.K., Wang H.W., Chen C.C., Liu S.C., Chen C.H., Chen H.K. and Wang C.H. (2010). Neural stem cells secrete factors that promote auditory cell proliferation via a leukemia inhibitory factor signaling pathway. *J. Neurosci. Res.* 88, 3308-3318.
- Chen P., Zindy F., Abdala C., Liu F., Li X., Roussel M.F. and Segil N. (2003). Progressive hearing loss in mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor Ink4d. *Nat. Cell Biol.* 5, 422-426.
- Chen W., Cacciabue-Rivolta D.I., Moore H.D. and Rivolta M.N. (2007). The human fetal cochlea can be a source for auditory progenitors/stem cells isolation. *Hear. Res.* 233, 23-29.
- Chen W., Johnson S.L., Marcotti W., Andrews P.W., Moore H.D. and Rivolta M.N. (2009). Human fetal auditory stem cells can be expanded in vitro and differentiate into functional auditory neurons and hair cell-like cells. *Stem Cells* 27, 1196-1204.
- Coleman B., Fallon J.B., Pettingill L.N., de Silva M.G. and Shepherd R.K. (2007). Auditory hair cell explant co-cultures promote the differentiation of stem cells into bipolar neurons. *Exp. Cell Res.* 313, 232-243.
- Coleman B., Hardman J., Coco A., Epp S., de Silva M., Crook J. and Shepherd R. (2006). Fate of embryonic stem cells transplanted into the deafened mammalian cochlea. *Cell Transplant.* 15, 369-380.
- Corrales C.E., Pan L., Li H., Liberman M.C., Heller S. and Edge A.S. (2006). Engraftment and differentiation of embryonic stem cell-derived neural progenitor cells in the cochlear nerve trunk: growth of processes into the organ of Corti. *J. Neurobiol.* 66, 1489-1500.
- Cotanche D.A. (2008). Genetic and pharmacological intervention for treatment/prevention of hearing loss. *J. Commun. Disord.* 41, 421-443.
- Cotanche D.A. and Kaiser C.L. (2010). Hair cell fate decisions in cochlear development and regeneration. *Hear. Res.* 266, 18-25.
- Daudet N. and Lewis J. (2005). Two contrasting roles for Notch activity in chick inner ear development: specification of prosensory patches and lateral inhibition of hair-cell differentiation. *Development* 132, 541-551.
- Deng W., Obrocka M., Fischer I. and Prockop D.J. (2001). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 148-152.
- Doetzlhofer A., Basch M.L., Ohyama T., Gessler M., Groves A.K. and Segil N. (2009). Hey2 regulation by FGF provides a Notch-independent mechanism for maintaining pillar cell fate in the organ of Corti. *Dev. Cell.* 16, 58-69.
- Doyle K.L., Kazda A., Hort Y., McKay S.M. and Oleskevich S. (2007). Differentiation of adult mouse olfactory precursor cells into hair cells in vitro. *Stem Cells* 25, 621-627.
- Dror A.A. and Avraham K.B. (2010). Hearing impairment: a panoply of genes and functions. *Neuron* 68, 293-308.
- Erdo F., Buhrlé C., Blunk J., Hoehn M., Xia Y., Fleischmann B., Focking M., Kustermann E., Kolossov E., Hescheler J., Hossmann K.A. and Trapp T. (2003). Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 780-785.
- Fekete D.M. and Wu D.K. (2002). Revisiting cell fate specification in the inner ear. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 35-42.
- Fransson A., Maruyama J., Miller J.M. and Ulfendahl M. (2010). Post-treatment effects of local GDNF administration to the inner ears of deafened guinea pigs. *J. Neurotrauma* 27, 1745-1751.
- Gillespie L.N. and Shepherd R.K. (2005). Clinical application of neurotrophic factors: the potential for primary auditory neuron protection. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2123-2133.
- Gillespie L.N., Clark G.M., Bartlett P.F. and Marzella P.L. (2003). BDNF-induced survival of auditory neurons in vivo: Cessation of treatment leads to accelerated loss of survival effects. *J. Neurosci. Res.* 71, 785-790.
- Gillespie L.N., Clark G.M. and Marzella P.L. (2004). Delayed neurotrophin treatment supports auditory neuron survival in deaf guinea pigs. *Neuroreport* 15, 1121-1125.
- Groves A.K. (2010). The challenge of hair cell regeneration. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 235, 434-446.
- Gubbels S.P., Woessner D.W., Mitchell J.C., Ricci A.J. and Brigande J.V. (2008). Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer. *Nature* 455, 537-541.
- Hakuba N., Hata R., Morizane I., Feng G., Shimizu Y., Fujita K., Yoshida T., Sakanaka M. and Gyo K. (2005). Neural stem cells suppress the hearing threshold shift caused by cochlear ischemia. *Neuroreport* 16, 1545-1549.
- Hakuba N., Watabe K., Hyodo J., Ohashi T., Eto Y., Taniguchi M., Yang L., Tanaka J., Hata R. and Gyo K. (2003). Adenovirus-mediated overexpression of a gene prevents hearing loss and progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. *Gene Ther.* 10, 426-433.
- Han Z., Yang J.M., Chi F.L., Cong N., Huang Y.B., Gao Z. and Li W. (2010). Survival and fate of transplanted embryonic neural stem cells by Atoh1 gene transfer in guinea pigs cochlea. *Neuroreport* 21, 490-496.
- Hansen M.R., Vijapurkar U., Koland J.G. and Green S.H. (2001). Reciprocal signaling between spiral ganglion neurons and Schwann cells involves neuregulin and neurotrophins. *Hear. Res.* 161, 87-98.
- Henderson D., Bielefeld E.C., Harris K.C. and Hu B.H. (2006). The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear.* 27, 1-19.
- Hildebrand M.S., Dahl H.H., Hardman J., Coleman B., Shepherd R.K. and de Silva M.G. (2005). Survival of partially differentiated mouse embryonic stem cells in the scala media of the guinea pig cochlea. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 6, 341-354.
- Hildebrand M.S., Newton S.S., Gubbels S.P., Sheffield A.M., Kochhar A., de Silva M.G., Dahl H.H., Rose S.D., Behlke M.A. and Smith R.J. (2008). Advances in molecular and cellular therapies for hearing loss. *Mol. Ther.* 16, 224-236.
- Hilgert N., Smith R.J. and Van Camp G. (2009). Function and expression pattern of nonsyndromic deafness genes. *Curr. Mol. Med.* 9, 546-564.
- Hori R., Nakagawa T., Sakamoto T., Matsuoka Y., Takebayashi S. and

Approaches to inner ear repair

- Ito J. (2007). Pharmacological inhibition of Notch signaling in the mature guinea pig cochlea. *Neuroreport* 18, 1911-1914.
- Hu Z., Ulfendahl M. and Olivius N.P. (2004). Central migration of neuronal tissue and embryonic stem cells following transplantation along the adult auditory nerve. *Brain Res.* 1026, 68-73.
- Hu Z., Andang M., Ni D. and Ulfendahl M. (2005a). Neural cograft stimulates the survival and differentiation of embryonic stem cells in the adult mammalian auditory system. *Brain Res.* 1051, 137-144.
- Hu Z., Ulfendahl M. and Olivius N.P. (2005b). NGF stimulates extensive neurite outgrowth from implanted dorsal root ganglion neurons following transplantation into the adult rat inner ear. *Neurobiol. Dis.* 18, 184-192.
- Hu Z., Wei D., Johansson C.B., Holmstrom N., Duan M., Frisen J. and Ulfendahl M. (2005c). Survival and neural differentiation of adult neural stem cells transplanted into the mature inner ear. *Exp. Cell Res.* 302, 40-47.
- Hurley F.M., Costello D.J. and Sullivan A.M. (2004). Neuroprotective effects of delayed administration of growth/differentiation factor-5 in the partial lesion model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 185, 281-289.
- Iguchi F., Nakagawa T., Tateya I., Kim T.S., Endo T., Taniguchi Z., Naito Y. and Ito J. (2003). Trophic support of mouse inner ear by neural stem cell transplantation. *Neuroreport* 14, 77-80.
- Ito J., Kojima K. and Kawaguchi S. (2001). Survival of neural stem cells in the cochlea. *Acta Otolaryngol.* 121, 140-142.
- Izumikawa M., Minoda R., Kawamoto K., Abrashkin K.A., Swiderski D.L., Dolan D.F., Brough D.E. and Raphael Y. (2005). Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat. Med.* 11, 271-276.
- Izumikawa M., Batts S.A., Miyazawa T., Swiderski D.L. and Raphael Y. (2008). Response of the flat cochlear epithelium to forced expression of Atoh1. *Hear. Res.* 240, 52-56.
- Jeon S.J., Oshima K., Heller S. and Edge A.S. (2007). Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors in vitro for inner ear hair cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 59-68.
- Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A. and Verfaillie C.M. (2002a). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Jiang Y., Vaessen B., Lenvik T., Blackstad M., Reyes M. and Verfaillie C.M. (2002b). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* 30, 896-904.
- Jin K., Mao X.O., Batteur S., Sun Y. and Greenberg D.A. (2003). Induction of neuronal markers in bone marrow cells: differential effects of growth factors and patterns of intracellular expression. *Exp. Neurol.* 184, 78-89.
- Jongkamonwiwat N., Zine A. and Rivolta M.N. (2010). Stem cell based therapy in the inner ear: appropriate donor cell types and routes for transplantation. *Curr. Drug Targets* 11, 888-897.
- Kanzaki S., Stover T., Kawamoto K., Prieskorn D.M., Altschuler R.A., Miller J.M. and Raphael Y. (2002). Glial cell line-derived neurotrophic factor and chronic electrical stimulation prevent VIII cranial nerve degeneration following denervation. *J. Comp. Neurol.* 454, 350-360.
- Kawamoto K., Ishimoto S., Minoda R., Brough D.E. and Raphael Y. (2003). Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. *J. Neurosci.* 23, 4395-4400.
- Kelley M.W., Talreja D.R. and Corwin J.T. (1995). Replacement of hair cells after laser microbeam irradiation in cultured organs of corti from embryonic and neonatal mice. *J. Neurosci.* 15, 3013-3026.
- Kiernan A.E., Cordes R., Kopan R., Gossler A. and Gridley T. (2005). The Notch ligands DLL1 and JAG2 act synergistically to regulate hair cell development in the mammalian inner ear. *Development* 132, 4353-4362.
- Kim Y.H. and Raphael Y. (2007). Cell division and maintenance of epithelial integrity in the deafened auditory epithelium. *Cell. Cycle* 6, 612-619.
- Kondo T., Johnson S.A., Yoder M.C., Romand R. and Hashino E. (2005). Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 4789-4794.
- Konishi M., Kawamoto K., Izumikawa M., Kuriyama H. and Yamashita T. (2008). Gene transfer into guinea pig cochlea using adeno-associated virus vectors. *J. Gene Med.* 10, 610-618.
- Krabbe C., Zimmer J. and Meyer M. (2005). Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. *APMIS* 113, 831-844.
- Kuroda Y., Kitada M., Wakao S., Nishikawa K., Tanimura Y., Makinoshima H., Goda M., Akashi H., Inutsuka A., Niwa A., Shigemoto T., Nabeshima Y., Nakahata T., Nabeshima Y., Fujiyoshi Y. and Dezawa M. (2010). Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 8639-8643.
- Laine H., Doetzlhofer A., Mantela J., Ylikoski J., Laiho M., Roussel M.F., Segil N. and Pirvola U. (2007). p19(Ink4d) and p21(Cip1) collaborate to maintain the postmitotic state of auditory hair cells, their codeletion leading to DNA damage and p53-mediated apoptosis. *J. Neurosci.* 27, 1434-1444.
- Lang H., Ebihara Y., Schmiedt R.A., Minamiguchi H., Zhou D., Smythe N., Liu L., Ogawa M. and Schulte B.A. (2006). Contribution of bone marrow hematopoietic stem cells to adult mouse inner ear: mesenchymal cells and fibrocytes. *J. Comp. Neurol.* 496, 187-201.
- Lang H., Schulte B.A., Goddard J.C., Hedrick M., Schulte J.B., Wei L. and Schmiedt R.A. (2008). Transplantation of mouse embryonic stem cells into the cochlea of an auditory-neuropathy animal model: effects of timing after injury. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 9, 225-240.
- Li H., Liu H. and Heller S. (2003a). Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat. Med.* 9, 1293-1299.
- Li H., Roblin G., Liu H. and Heller S. (2003b). Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13495-13500.
- Liu Q., Ye J., Yu H., Li H., Dai C., Gu Y., Zhu Y. and Zhang Z. (2010). Survival-enhancing of spiral ganglion cells under influence of olfactory ensheathing cells by direct cellular contact. *Neurosci. Lett.* 478, 37-41.
- Liu Y., Okada T., Sheykhosslami K., Shimazaki K., Nomoto T., Muramatsu S., Kanazawa T., Takeuchi K., Ajalli R., Mizukami H., Kume A., Ichimura K. and Ozawa K. (2005). Specific and efficient transduction of Cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol. Ther.* 12, 725-733.
- Liu Y., Okada T., Shimazaki K., Sheykhosslami K., Nomoto T., Muramatsu S., Mizukami H., Kume A., Xiao S., Ichimura K. and Ozawa K. (2008). Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. *Mol. Ther.* 16, 474-480.
- Lu P., Blesch A. and Tuszynski M.H. (2004). Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J. Neurosci. Res.* 77, 174-191.
- Malgrange B., Belachew S., Thiry M., Nguyen L., Rogister B., Alvarez

- M.L., Rigo J.M., Van De Water T.R., Moonen G. and Lefebvre P.P. (2002). Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture. *Mech. Dev.* 112, 79-88.
- Martinez-Monedero R., Corrales C.E., Cuajungco M.P., Heller S. and Edge A.S. (2006). Reinnervation of hair cells by auditory neurons after selective removal of spiral ganglion neurons. *J. Neurobiol.* 66, 319-331.
- Martinez-Monedero R., Oshima K., Heller S. and Edge A.S. (2007). The potential role of endogenous stem cells in regeneration of the inner ear. *Hear. Res.* 227, 48-52.
- Martinez-Monedero R., Yi E., Oshima K., Glowatzki E. and Edge A.S. (2008). Differentiation of inner ear stem cells to functional sensory neurons. *Dev. Neurobiol.* 68, 669-684.
- Maruyama J., Yamagata T., Ulfendahl M., Bredberg G., Altschuler R.A. and Miller J.M. (2007). Effects of antioxidants on auditory nerve function and survival in deafened guinea pigs. *Neurobiol. Dis.* 25, 309-318.
- Maruyama J., Miller J.M. and Ulfendahl M. (2008). Glial cell line-derived neurotrophic factor and antioxidants preserve the electrical responsiveness of the spiral ganglion neurons after experimentally induced deafness. *Neurobiol. Dis.* 29, 14-21.
- Marzella P.L., Gillespie L.N., Clark G.M., Bartlett P.F. and Kilpatrick T.J. (1999). The neurotrophins act synergistically with LIF and members of the TGF-beta superfamily to promote the survival of spiral ganglia neurons in vitro. *Hear. Res.* 138, 73-80.
- Matsumoto M., Nakagawa T., Kojima K., Sakamoto T., Fujiyama F. and Ito J. (2008). Potential of embryonic stem cell-derived neurons for synapse formation with auditory hair cells. *J. Neurosci. Res.* 86, 3075-3085.
- Matsuoka A.J., Kondo T., Miyamoto R.T. and Hashino E. (2006). In vivo and in vitro characterization of bone marrow-derived stem cells in the cochlea. *Laryngoscope* 116, 1363-1367.
- Matsuoka A.J., Kondo T., Miyamoto R.T. and Hashino E. (2007). Enhanced survival of bone-marrow-derived pluripotent stem cells in an animal model of auditory neuropathy. *Laryngoscope* 117, 1629-1635.
- Meen E., Blakley B. and Qudus T. (2009). Brain-derived nerve growth factor in the treatment of sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 119, 1590-1593.
- Meyers J.R. and Corwin J.T. (2007). Shape change controls supporting cell proliferation in lesioned mammalian balance epithelium. *J. Neurosci.* 27, 4313-4325.
- Miller J. and Altschuler R. (2004). Neurotrophic factor and electrical stimulation promotes auditory nerve survival and regrowth following deafness. *ARO Midwinter meeting*, 90.
- Miller J., Prieskorn D., Lee S., Kim J., Mitchell A. and Altschuler R. (2006). Auditory nerve survival remains enhanced four weeks following cessation of treatment with glial cell-line derived neurotrophic factor. *ARO Midwinter meeting*, Abstract 891.
- Miller J.M., Le Prell C.G., Prieskorn D.M., Wys N.L. and Altschuler R.A. (2007). Delayed neurotrophin treatment following deafness rescues spiral ganglion cells from death and promotes regrowth of auditory nerve peripheral processes: effects of brain-derived neurotrophic factor and fibroblast growth factor. *J. Neurosci. Res.* 85, 1959-1969.
- Minoda R., Izumikawa M., Kawamoto K., Zhang H. and Raphael Y. (2007). Manipulating cell cycle regulation in the mature cochlea. *Hear. Res.* 232, 44-51.
- Naito Y., Nakamura T., Nakagawa T., Iguchi F., Endo T., Fujino K., Kim T.S., Hiratsuka Y., Tamura T., Kanemaru S., Shimizu Y. and Ito J. (2004). Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport* 15, 1-4.
- Nakaizumi T., Kawamoto K., Minoda R. and Raphael Y. (2004). Adenovirus-mediated expression of brain-derived neurotrophic factor protects spiral ganglion neurons from ototoxic damage. *Audiol. Neurootol.* 9, 135-143.
- Nicholl A.J., Kneebone A., Davies D., Cacciabue-Rivolta D.I., Rivolta M.N., Coffey P. and Holley M.C. (2005). Differentiation of an auditory neuronal cell line suitable for cell transplantation. *Eur. J. Neurosci.* 22, 343-353.
- Nishimura K., Nakagawa T., Ono K., Ogita H., Sakamoto T., Yamamoto N., Okita K., Yamanaka S. and Ito J. (2009). Transplantation of mouse induced pluripotent stem cells into the cochlea. *Neuroreport* 20, 1250-1254.
- Noushi F., Richardson R.T., Hardman J., Clark G. and O'Leary S. (2005). Delivery of neurotrophin-3 to the cochlea using alginate beads. *Otol. Neurotol.* 26, 528-533.
- Oesterle E.C. and Campbell S. (2009). Supporting cell characteristics in long-deafened aged mouse ears. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 10, 525-544.
- Oesterle E.C., Campbell S., Taylor R.R., Forge A. and Hume C.R. (2008). Sox2 and JAGGED1 expression in normal and drug-damaged adult mouse inner ear. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 9, 65-89.
- Ogita H., Nakagawa T., Sakamoto T., Inaoka T. and Ito J. (2010). Transplantation of bone marrow-derived neurospheres into guinea pig cochlea. *Laryngoscope* 120, 576-581.
- Okano T., Nakagawa T., Endo T., Kim T.S., Kita T., Tamura T., Matsumoto M., Ohno T., Sakamoto T., Iguchi F. and Ito J. (2005). Engraftment of embryonic stem cell-derived neurons into the cochlear modiolus. *Neuroreport* 16, 1919-1922.
- Okano T., Nakagawa T., Kita T., Endo T. and Ito J. (2006). Cell-gene delivery of brain-derived neurotrophic factor to the mouse inner ear. *Mol. Ther.* 14, 866-871.
- Ono K., Nakagawa T., Kojima K., Matsumoto M., Kawauchi T., Hoshino M. and Ito J. (2009). Silencing p27 reverses post-mitotic state of supporting cells in neonatal mouse cochleae. *Mol. Cell. Neurosci.* 42, 391-398.
- Oshima K., Grimm C.M., Corrales C.E., Senn P., Martinez Monedero R., Geleoc G.S., Edge A., Holt J.R. and Heller S. (2007). Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 8, 18-31.
- Oshima K., Senn P. and Heller S. (2009). Isolation of sphere-forming stem cells from the mouse inner ear. *Methods Mol. Biol.* 493, 141-162.
- Oshima K., Shin K., Diensthuber M., Peng A.W., Ricci A.J. and Heller S. (2010). Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell* 141, 704-716.
- Othman M., Lu C., Klueber K., Winstead W. and Roisen F. (2005). Clonal analysis of adult human olfactory neurosphere forming cells. *Biotech. Histochem.* 80, 189-200.
- Ourednik J., Ourednik V., Lynch W.P., Schachner M. and Snyder E.Y. (2002). Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons. *Nat. Biotechnol.* 20, 1103-1110.
- Parker M.A., Corliss D.A., Gray B., Anderson J.K., Bobbin R.P., Snyder E.Y. and Cotanche D.A. (2007). Neural stem cells injected into the sound-damaged cochlea migrate throughout the cochlea and express markers of hair cells, supporting cells, and spiral ganglion cells. *Hear. Res.* 232, 29-43.
- Pettingill L.N., Richardson R.T., Wise A.K., O'Leary S.J. and Shepherd R.K. (2007). Neurotrophic factors and neural prostheses: potential

Approaches to inner ear repair

- clinical applications based upon findings in the auditory system. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 54, 1138-1148.
- Pettingill L.N., Minter R.L. and Shepherd R.K. (2008). Schwann cells genetically modified to express neurotrophins promote spiral ganglion neuron survival in vitro. *Neuroscience* 152, 821-828.
- Poirrier A.L., Pincemail J., Van Den Ackerveken P., Lefebvre P.P. and Malgrange B. (2010). Oxidative stress in the cochlea: an update. *Curr. Med. Chem.* 17, 3591-3604.
- Pollock K., Stroemer P., Patel S., Stevanato L., Hope A., Miljan E., Dong Z., Hodges H., Price J. and Sinden J.D. (2006). A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp. Neurol.* 199, 143-155.
- Prayle A. and Smyth A.R. (2010). Aminoglycoside use in cystic fibrosis: therapeutic strategies and toxicity. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 16, 604-610.
- Puligilla C. and Kelley M.W. (2009). Building the world's best hearing aid; regulation of cell fate in the cochlea. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 368-373.
- Rask-Andersen H., Bostrom M., Gerdin B., Kinnefors A., Nyberg G., Engstrand T., Miller J.M. and Lindholm D. (2005). Regeneration of human auditory nerve. In vitro/in vivo demonstration of neural progenitor cells in adult human and guinea pig spiral ganglion. *Hear. Res.* 203, 180-191.
- Regala C., Duan M., Zou J., Salminen M. and Olivius P. (2005). Xenografted fetal dorsal root ganglion, embryonic stem cell and adult neural stem cell survival following implantation into the adult vestibulocochlear nerve. *Exp. Neurol.* 193, 326-333.
- Reyes J.H., O'Shea K.S., Wys N.L., Velkey J.M., Prieskorn D.M., Wesolowski K., Miller J.M. and Altschuler R.A. (2008). Glutamatergic neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells after transient expression of neurogenin 1 and treatment with BDNF and GDNF: in vitro and in vivo studies. *J. Neurosci.* 28, 12622-12631.
- Richardson R.T., O'Leary S., Wise A., Hardman J. and Clark G. (2005). A single dose of neurotrophin-3 to the cochlea surrounds spiral ganglion neurons and provides trophic support. *Hear. Res.* 204, 37-47.
- Rivolta M.N. (2010). Stem cells and cell lines from the human auditory organ: applications, hurdles and bottlenecks in the development of regenerative therapies for deafness. *Drug Discov. Today* 15, 283-286.
- Roberson D.W., Alosi J.A. and Cotanche D.A. (2004). Direct transdifferentiation gives rise to the earliest new hair cells in regenerating avian auditory epithelium. *J. Neurosci. Res.* 78, 461-471.
- Roisen F.J., Klueber K.M., Lu C.L., Hatcher L.M., Dozier A., Shields C.B. and Maguire S. (2001). Adult human olfactory stem cells. *Brain Res.* 890, 11-22.
- Roy S., Johnston A.H., Newman T.A., Glueckert R., Dudas J., Bitsche M., Corbacella E., Rieger G., Martini A. and Schrott-Fischer A. (2010). Cell-specific targeting in the mouse inner ear using nanoparticles conjugated with a neurotrophin-derived peptide ligand: potential tool for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 390, 214-224.
- Sage C., Huang M., Karimi K., Gutierrez G., Vollrath M.A., Zhang D.S., Garcia-Anoveros J., Hinds P.W., Corwin J.T., Corey D.P. and Chen Z.Y. (2005). Proliferation of functional hair cells in vivo in the absence of the retinoblastoma protein. *Science* 307, 1114-1118.
- Sage C., Huang M., Vollrath M.A., Brown M.C., Hinds P.W., Corey D.P., Vetter D.E. and Chen Z.Y. (2006). Essential role of retinoblastoma protein in mammalian hair cell development and hearing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 7345-7350.
- Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Stedeford T., Willing A., Freeman T.B., Saporta S., Janssen W., Patel N., Cooper D.R. and Sanberg P.R. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* 164, 247-256.
- Savary E., Hugnot J.P., Chassigneux Y., Travo C., Duperray C., Van De Water T. and Zine A. (2007). Distinct population of hair cell progenitors can be isolated from the postnatal mouse cochlea using side population analysis. *Stem Cells* 25, 332-339.
- Savary E., Sabourin J.C., Santo J., Hugnot J.P., Chabbert C., Van De Water T., Uziel A. and Zine A. (2008). Cochlear stem/progenitor cells from a postnatal cochlea respond to Jagged1 and demonstrate that notch signaling promotes sphere formation and sensory potential. *Mech. Dev.* 125, 674-686.
- Scheper V., Paasche G., Miller J.M., Warnecke A., Berkingali N., Lenarz T. and Stover T. (2009). Effects of delayed treatment with combined GDNF and continuous electrical stimulation on spiral ganglion cell survival in deafened guinea pigs. *J. Neurosci. Res.* 87, 1389-1399.
- Schimmang T., Tan J., Muller M., Zimmermann U., Rohbock K., Kopschall I., Limberger A., Minichiello L. and Knipper M. (2003). Lack of Bdnf and TrkB signalling in the postnatal cochlea leads to a spatial reshaping of innervation along the tonotopic axis and hearing loss. *Development* 130, 4741-4750.
- Sekiya T., Holley M.C., Kojima K., Matsumoto M., Helyer R. and Ito J. (2007). Transplantation of conditionally immortal auditory neuroblasts to the auditory nerve. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2307-2318.
- Sekiya T., Kojima K., Matsumoto M., Kim T.S., Tamura T. and Ito J. (2006). Cell transplantation to the auditory nerve and cochlear duct. *Exp. Neurol.* 198, 12-24.
- Sell S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 51, 1-28.
- Shepherd R.K., Roberts L.A. and Paolini A.G. (2004). Long-term sensorineural hearing loss induces functional changes in the rat auditory nerve. *Eur. J. Neurosci.* 20, 3131-3140.
- Shepherd R.K., Coco A., Epp S.B. and Crook J.M. (2005). Chronic depolarization enhances the trophic effects of brain-derived neurotrophic factor in rescuing auditory neurons following a sensorineural hearing loss. *J. Comp. Neurol.* 486, 145-158.
- Shepherd R.K., Coco A. and Epp S.B. (2008). Neurotrophins and electrical stimulation for protection and repair of spiral ganglion neurons following sensorineural hearing loss. *Hear. Res.* 242, 100-109.
- Shi F., Corrales C.E., Liberman M.C. and Edge A.S. (2007). BMP4 induction of sensory neurons from human embryonic stem cells and reinnervation of sensory epithelium. *Eur. J. Neurosci.* 26, 3016-3023.
- Shibata S.B. and Raphael Y. (2010). Future approaches for inner ear protection and repair. *J. Commun. Disord.* 43, 295-310.
- Shinohara T., Bredberg G., Ulfendahl M., Pyykko I., Olivius N.P., Kaksonen R., Lindstrom B., Altschuler R. and Miller J.M. (2002). Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1657-1660.
- Shoji F., Miller A.L., Mitchell A., Yamasoba T., Altschuler R.A. and Miller J.M. (2000a). Differential protective effects of neurotrophins in the attenuation of noise-induced hair cell loss. *Hear. Res.* 146, 134-142.
- Shoji F., Yamasoba T., Magal E., Dolan D.F., Altschuler R.A. and Miller J.M. (2000b). Glial cell line-derived neurotrophic factor has a dose dependent influence on noise-induced hearing loss in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 142, 41-55.
- Shou J., Zheng J.L. and Gao W.Q. (2003). Robust generation of new

- hair cells in the mature mammalian inner ear by adenoviral expression of *Hath1*. *Mol. Cell. Neurosci.* 23, 169-179.
- Song B.N., Li Y.X. and Han D.M. (2008). Effects of delayed brain-derived neurotrophic factor application on cochlear pathology and auditory physiology in rats. *Chin. Med. J. (Engl)* 121, 1189-1196.
- Song S. and Sanchez-Ramos J. (2003). Brain as the Sea of Marrow. *Exp. Neurol.* 184, 54-60.
- Stevanato L., Corteling R.L., Stroemer P., Hope A., Heward J., Miljan E.A. and Sinden J.D. (2009). c-MycERTAM transgene silencing in a genetically modified human neural stem cell line implanted into MCAo rodent brain. *BMC Neurosci.* 10, 86.
- Stone J.S. and Cotanche D.A. (2007). Hair cell regeneration in the avian auditory epithelium. *Int. J. Dev. Biol.* 51, 633-647.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K. and Yamanaka S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Takahashi K. and Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Talaska A.E., Schacht J. and Fischel-Ghodsian N. (2006). Molecular and genetic aspects of aminoglycoside-induced hearing loss. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 3, 119-124.
- Tan B.T., Lee M.M. and Ruan R. (2008). Bone-marrow-derived cells that home to acoustic deafened cochlea preserved their hematopoietic identity. *J. Comp. Neurol.* 509, 167-179.
- Tateya I., Nakagawa T., Iguchi F., Kim T.S., Endo T., Yamada S., Kageyama R., Naito Y. and Ito J. (2003). Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. *Neuroreport* 14, 1677-1681.
- Tessarollo L., Coppola V. and Fritsch B. (2004). NT-3 replacement with brain-derived neurotrophic factor redirects vestibular nerve fibers to the cochlea. *J. Neurosci.* 24, 2575-2584.
- Tondreau T., Lagneaux L., Dejenneff M., Massy M., Mortier C., Delforge A. and Bron D. (2004). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 72, 319-326.
- Tsuji O., Miura K., Okada Y., Fujiyoshi K., Mukaino M., Nagoshi N., Kitamura K., Kumagai G., Nishino M., Tomisato S., Higashi H., Nagai T., Katoh H., Kohda K., Matsuzaki Y., Yuzaki M., Ikeda E., Toyama Y., Nakamura M., Yamanaka S. and Okano H. (2010). Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 12704-12709.
- Ulfendahl M., Hu Z., Olivius P., Duan M. and Wei D. (2007). A cell therapy approach to substitute neural elements in the inner ear. *Physiol. Behav.* 92, 75-79.
- Warchol M.E. (2011). Sensory regeneration in the vertebrate inner ear: Differences at the levels of cells and species. *Hear. Res.* 273, 72-79.
- Weber T., Corbett M.K., Chow L.M., Valentine M.B., Baker S.J. and Zuo J. (2008). Rapid cell-cycle reentry and cell death after acute inactivation of the retinoblastoma gene product in postnatal cochlear hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 781-785.
- Wei D., Levic S., Nie L., Gao W.Q., Petit C., Jones E.G. and Yamoah E.N. (2008). Cells of adult brain germinal zone have properties akin to hair cells and can be used to replace inner ear sensory cells after damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 21000-21005.
- White P.M., Doetzlhofer A., Lee Y.S., Groves A.K. and Segil N. (2006). Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. *Nature* 441, 984-987.
- Whitlon D.S., Ketels K.V., Coulson M.T., Williams T., Grover M., Edpao W. and Richter C.P. (2006). Survival and morphology of auditory neurons in dissociated cultures of newborn mouse spiral ganglion. *Neuroscience* 138, 653-662.
- Whitlon D.S., Tieu D., Grover M., Reilly B. and Coulson M.T. (2009). Spontaneous association of glial cells with regrowing neurites in mixed cultures of dissociated spiral ganglia. *Neuroscience* 161, 227-235.
- Wise A.K., Richardson R., Hardman J., Clark G. and O'leary S. (2005). Resprouting and survival of guinea pig cochlear neurons in response to the administration of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *J. Comp. Neurol.* 487, 147-165.
- Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J. and Black I.B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61, 364-370.
- Woods C., Montcouquiol M. and Kelley M.W. (2004). *Math1* regulates development of the sensory epithelium in the mammalian cochlea. *Nat. Neurosci.* 7, 1310-1318.
- Yagi M., Kanzaki S., Kawamoto K., Shin B., Shah P.P., Magal E., Sheng J. and Raphael Y. (2000). Spiral ganglion neurons are protected from degeneration by GDNF gene therapy. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 1, 315-325.
- Yamagata T., Miller J.M., Ulfendahl M., Olivius N.P., Altschuler R.A., Pyykko I. and Bredberg G. (2004). Delayed neurotrophic treatment preserves nerve survival and electrophysiological responsiveness in neomycin-deafened guinea pigs. *J. Neurosci. Res.* 78, 75-86.
- Yamamoto N., Tanigaki K., Tsuji M., Yabe D., Ito J. and Honjo T. (2006). Inhibition of Notch/RBP-J signaling induces hair cell formation in neonate mouse cochleas. *J. Mol. Med.* 84, 37-45.
- Yamasoba T. and Kondo K. (2006). Supporting cell proliferation after hair cell injury in mature guinea pig cochlea in vivo. *Cell Tissue Res.* 325, 23-31.
- Yoshida T., Hakuba N., Morizane I., Fujita K., Cao F., Zhu P., Uchida N., Kameda K., Sakanaka M., Gyo K. and Hata R. (2007). Hematopoietic stem cells prevent hair cell death after transient cochlear ischemia through paracrine effects. *Neuroscience* 145, 923-930.
- Yu Y., Weber T., Yamashita T., Liu Z., Valentine M.B., Cox B.C. and Zuo J. (2010). In vivo proliferation of postmitotic cochlear supporting cells by acute ablation of the retinoblastoma protein in neonatal mice. *J. Neurosci.* 30, 5927-5936.
- Zhai S., Shi L., Wang B.E., Zheng G., Song W., Hu Y. and Gao W.Q. (2005). Isolation and culture of hair cell progenitors from postnatal rat cochleae. *J. Neurobiol.* 65, 282-293.
- Zheng J.L. and Gao W.Q. (2000). Overexpression of *Math1* induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nat. Neurosci.* 3, 580-586.
- Zheng J.L., Shou J., Guillemot F., Kageyama R. and Gao W.Q. (2000). *Hes1* is a negative regulator of inner ear hair cell differentiation. *Development* 127, 4551-4560.
- Zine A., Van De Water T.R. and de Ribaupierre F. (2000). Notch signaling regulates the pattern of auditory hair cell differentiation in mammals. *Development* 127, 3373-3383.



For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Generation of inner ear sensory cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells

Aim: Hearing loss is the most common sensory disorder in humans, its main cause being the loss of cochlear hair cells. We studied the potential of human mesenchymal stem cells (hMSCs) to differentiate towards hair cells and auditory neurons. **Materials & methods:** hMSCs were first differentiated to neural progenitors and subsequently to hair cell- or auditory neuron-like cells using *in vitro* culture methods. **Results:** Differentiation of hMSCs to an intermediate neural progenitor stage was critical for obtaining inner ear sensory lineages. hMSCs generated hair cell-like cells only when neural progenitors derived from nonadherent hMSC cultures grown in serum-free medium were exposed to EGF and retinoic acid. Auditory neuron-like cells were obtained when treated with retinoic acid, and in the presence of defined growth factor combinations containing Sonic Hedgehog. **Conclusion:** The results show the potential of hMSCs to give rise to inner ear sensory cells.

KEYWORDS: auditory neuron ■ differentiation ■ hair cell ■ human mesenchymal stem cell

Hearing loss is considered the most prevalent sensory impairment worldwide. It affects nearly 600 million people, approximately 10% of the world's population, with approximately a third of them suffering moderate-to-profound hearing loss in both ears [1]. This situation brings along a series of important social and economic implications.

Sensorineural hearing loss (SNHL) results from a dysfunction in the inner ear and its most frequent cause is the damage of the hair cells (HCs), which are the mechanosensory cells of the auditory organ, the cochlea. They transduce the mechanical perturbations induced by the sound waves into synaptic potentials that activate the second relay of the auditory pathway, the auditory neurons (ANs; or spiral ganglion neurons [SGNs]). ANs propagate the incoming signal to the brainstem and thereby to the brain. SNHL may also be caused by AN degeneration developed as either a primary event, or secondary to HC loss [2–4]. Besides some hearing aids and sound amplification devices, the only effective treatment currently available for patients is the cochlear implant, which is an electronic device that bypasses the degenerated HCs and directly stimulates the ANs [5–7]. However, one major limitation to the use of the cochlear implant system is that it requires a healthy population of ANs for its correct performance. On the other hand, unlike in birds and lower vertebrates, the degeneration of HCs and ANs in mammals is irreversible [8–10]. Expansion of remaining healthy

cells to replace damaged ones does not take place, as both HCs and ANs are post-mitotic, making a cell therapy approach a direct and clear option to design treatments for SNHL. Other lines of research aim at the transdifferentiation of nonsensory inner ear cell types towards HCs via their genetic manipulation. The most interesting results have come out from experiments where *Atoh-1*, considered as a master gene for the specification of the HC lineage, has been overexpressed in nonsensory inner ear cells, giving rise to new HCs [11–15]. Importantly, emergence of new HCs has been correlated to a certain degree of functional recovery, in terms of improved hearing and restoration of balance [11,13,14].

Regarding cell-based treatments, current work focuses on the utilization of exogenous cells and their differentiation towards the missing cell types, since cells with stem/progenitor properties appear to be no longer present in the mammalian cochlea 3 weeks after birth [16,17]. A wide range of stem/multipotent progenitor cells have been tested for their potential to differentiate towards inner ear sensory cells *in vitro* and/or *in vivo* [18–20]. Several groups have shown the possibility to differentiate mouse embryonic stem cells (mESCs) to HC- [21,22] and AN-like cells [23–26]. The phenotypic plasticity of ESCs is, nevertheless, marred by ethical issues on the derivation and use of human ESCs and other important concerns, such as the possibility of eliciting immune reactions as they commence differentiation, and the risk of tumor

M Beatriz Durán Alonso^{*†1}, Ana Feijoo-Redondo^{*†1}, Magnolia Conde de Felipe¹, Estela Carnicero², Ana Sánchez García¹, Javier García-Sancho¹, Marcelo N Rivolta³, Fernando Giráldez⁴ & Thomas Schimmang¹

¹Instituto de Biología y Genética Molecular, Universidad de Valladolid y Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Sanz y Forés 3, E-47003, Valladolid, Spain

²Departamento de Anatomía y Radiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, Valladolid, Spain

³Centre for Stem Cell Biology & Department of Biomedical Sciences, University of Sheffield, Sheffield, S102TN, UK

⁴Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, 2 Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, PRBB, Barcelona 08003, Spain

*Author for correspondence: Tel.: +34 983184818

Fax: +34 983184800
mbduran@ibgm.uva.es

[†]Authors contributed equally

formation [27–29]. Research has also been carried out on adult stem cells, such as neural stem cells (NSCs). Although NSCs have low survival rates following their transplantation into deaf animal models [30,31], these cells exhibit some degree of differentiation towards both SGN and HC lineages upon prior genetic manipulation [31,32].

Mesenchymal stem cells (MSCs) represent another type of adult stem cell of potential use for cell repair. MSCs are stem/multipotent progenitor cells with a considerable *ex vivo* expansion potential, and they are relatively easy to obtain from the bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. These features allow their usage for autologous cell therapy while avoiding the risk of immune reactions. MSCs have been extensively used in clinical applications and, therefore, their safety has been tested. Although these cells were initially considered as progenitor cells for the cell lineages present in their tissues of origin, it is now believed that their differentiation potential may span across the three embryonic layers [33–35]. These considerations make MSCs very interesting candidates for regenerative cell-based therapy approaches.

The literature on the differentiation of MSCs towards inner ear sensory types is very scarce. Work carried out *in vivo* has focused on the differentiation of these cells towards neurons, and shown the expression of neuronal proteins such as β III-tubulin or NF-H in MSCs transplanted into the cochlea [36–38]. *In vitro* work has shown the differentiation of mouse MSCs (mMSCs) to glutamatergic sensory neurons [39], and of rodent MSCs to HC-like cells [40,41], but no information is yet available on human MSCs.

We decided to investigate in detail the potential of bone marrow-derived human MSCs (hMSCs) to give rise to HCs and ANs *in vitro*. The design of protocols and the application of various treatment regimes led us to identify specific growth conditions that result in the expression of various combinations of genes that are characteristic of HCs or ANs. To our knowledge, this is the first report on the potential of hMSCs to give rise to HC- and AN-like cells *in vitro* following their culture in the presence of specific growth factor combinations. The accompanying paper by Boddy *et al.* describes complementary results using conditioned media from human fetal stem cells to generate inner ear progenitor cells [42].

Materials & methods

■ Cell culture

Primary cultures of hMSCs were bought from Lonza and grown in low-glucose DMEM

(Sigma-Aldrich) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; Lonza), 1% penicillin–streptomycin (P/S) and 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 1% nonessential amino acids and 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich), and grown at 37°C, in 5% CO₂. The cells were trypsinized and passaged every 5–7 days and seeded at approximately 6000 cells/cm². Differentiation work was carried out on cultures at passages p5–p9. hMSCs from at least two different donors were used for each set of experiments. Lot numbers of hMSCs used for this work are 7F3675, 7F3914, 6F4085 and 1F3422. hMSCs were analyzed attending both to their expression of surface markers, by flow cytometry, and to their differentiation capacity. Flow cytometric analysis was carried out using a Gallios™ Flow Cytometer (Beckman Coulter) (SUPPLEMENTARY FIGURE 1, see online www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/rme.12.65). The cells were labeled with either fluorescein isothiocyanate (FITC)-, phycoerythrin (PE)- or phycoerythrin (PE)- or phycoerythrin (PE)-conjugated antibodies. Surface markers tested were: FITC-CD45, PE-CD73, PE-CD166, PCy5-CD90 (BD Pharmingen), FITC-CD105 (Immunostep) and PCy5-CD34 (Beckman Coulter). Mouse IgG isotypes conjugated with the appropriate fluorochromes were used as controls. Data were analyzed using Kaluza® Analysis Software (Beckman Coulter). Regarding their capacity to differentiate into cells of different lineages, hMSCs were driven to differentiate into adipocytes and osteocytes (SUPPLEMENTARY FIGURE 2). Briefly, adipogenic differentiation was carried out in the presence of dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine, insulin and indomethacin; accumulation of lipid-rich vacuoles within the cells was apparent following oil red-O staining of the cultures that were counterstained with Mayer's hematoxylin solution. Osteogenic differentiation was carried out in medium containing dexamethasone, ascorbic acid and glycerophosphate; von Kossa staining was used to detect the formation of calcium deposits.

Chick utricle stromal cells were obtained from chick embryos at embryonic day 10. The sensory epithelium was removed using a 30 G needle (Microlance™ 3, Becton-Dickinson) and stromal tissue was transferred to DMEM/F12 (Invitrogen) at 4°C, washed in HBSS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ (Invitrogen) for 2 min and incubated with 0.5 mg/ml thermolysin for 25 min at 37°C. Following dissociation, stromal tissue was centrifuged for 2 min at 800 rpm, resuspended in DMEM/F12 supplemented with 5% FBS,

dissociated gently and plated on dishes treated with poly-D-lysine (100 µg/ml; Sigma-Aldrich). Cells were cultured in high-glucose DMEM, with added 10% FBS and 1% P/S. Once the cells reached confluency, they were passaged at 7000 cells/cm². Cultures at p4–p6 were inactivated with 10 µg/ml mitomycin C for 3 h at 37°C. After this time, cells were washed, trypsinized and replated at 40,000 cells/cm² on gelatin-coated dishes. These cultures were used the following day to establish cocultures with hMSC-derived neural progenitors (NPs).

■ Induction of neural marker expression

Several culture regimes were applied to hMSCs in order to induce the expression of NP markers in these cultures. Two different methods were tested on hMSCs grown as monolayer cultures, while two other protocols consisted in the growth of hMSCs as nonadherent, spherical cultures (FIGURE 1).

When working with hMSC monolayers, the neural induction treatments were commenced once the cells had grown to subconfluency. Below is a description of both methods:

- hMSCs were cultured for 24 h in high-glucose DMEM with added 10% FBS, 1% P/S and 2 mM L-glutamine, and supplemented with 1 µM β-mercaptoethanol (β-ME). Subsequently, cells were grown for 72 h in the same medium, this time supplemented with 35 ng/ml retinoic acid (RA; Sigma-Aldrich) instead of β-ME;
- hMSCs were cultured in serum-free medium (SFM) consisting of DMEM/F12, with added 1% P/S, 1% N2 supplement and 2% B27 supplement (Invitrogen). Cells were grown in this medium for 12–15 days. During the first 5 days, 30 ng/ml of NT-3 (R&D Systems) and 10 ng/ml of bFGF (R&D Systems) were added to the medium. bFGF was then substituted by BDNF (R&D Systems) and the cells were cultured in the presence of 30 ng/ml NT-3 plus 10 ng/ml BDNF for the remaining 7–10 days.

Two protocols were based on the formation of hMSC-derived spheres. This was accomplished by seeding the cells on agarose-coated tissue culture dishes, so that the hMSCs could not attach to the surface of the plate. The first protocol consisted of plating 6×10^5 hMSCs in SFM with an additional 20 ng/ml of EGF (R&D Systems) and 20 ng/ml bFGF, which were then left to form spheres for a period of 3 days. In the second method, 5×10^5 hMSCs

were plated in high-glucose DMEM with additional 10% FBS, 1% P/S and 2 mM glutamine, supplemented with 1 µM RA; cells were left to form spheres for 5 days.

■ Induction of HC marker expression

hMSC-derived spheres grown in SFM were collected by brief centrifugation and plated on tissue culture plates coated with 10 µg/ml fibronectin (Sigma-Aldrich). The cultures were grown for an additional 2 weeks in SFM containing 20 ng/ml EGF and 1 µM RA. The culture medium was changed every 2–3 days.

■ Induction of AN marker expression

hMSC-derived NP cultures that had been obtained following treatment of hMSC monolayers with β-ME and RA were grown for 1 week in SFM supplemented with 400 ng/ml of Sonic Hedgehog (SHH; PreproTech Inc.), 0.5 µM RA, 10 ng/ml NT-3 and 10 ng/ml BDNF. The medium was then changed to SFM containing 25 ng/ml bFGF for another week, followed by culture of the cells in SFM supplemented with 20 ng/ml bFGF, 10 ng/ml NT-3 and 10 ng/ml BDNF for an additional week. Media were changed every 2–3 days.

hMSC-derived spheres grown in the presence of FBS and RA were left to attach to fibronectin-coated tissue culture plates and were kept in SFM with added 25 ng/ml bFGF for 3 days. The medium was subsequently changed to SFM supplemented with 20 ng/ml bFGF plus 500 ng/ml SHH and the cultures were grown following the protocol described by Chen *et al.* [43].

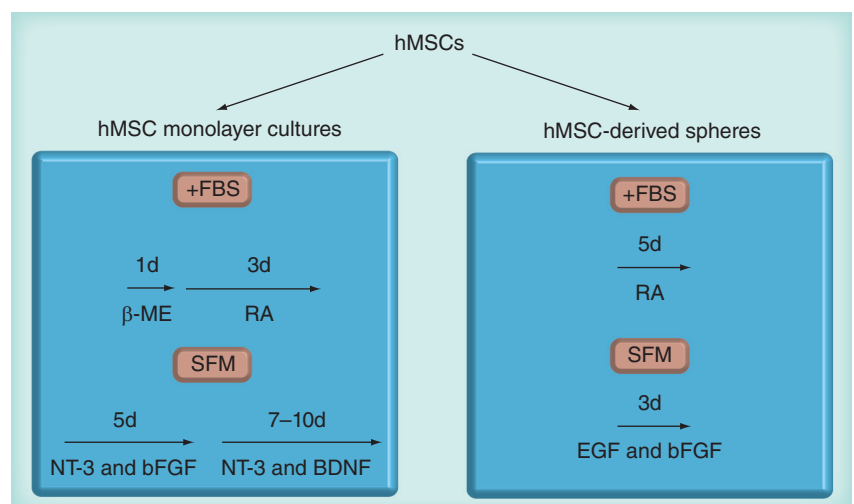


Figure 1. Treatment conditions for the induction of neural progenitor markers in human mesenchymal stem cell cultures.

β-ME: β-mercaptoethanol; d: Day; FBS: Fetal bovine serum; hMSC: Human mesenchymal stem cell; RA: Retinoic acid; SFM: Serum-free medium.

■ Cocultures of hMSC-derived NPs with chick stromal cells

hMSC-derived NPs obtained by either treating hMSC monolayers with NT-3, bFGF and BDNF (as described in [40]) or by growing hMSCs as spheres in SFM with added EGF and bFGF, were seeded on a monolayer of mitomycin-treated chick utricle stromal cells plated the previous day on gelatin-coated dishes. In the case of hMSC monolayers, the cells were plated at approximately 7500 cells/cm² and the cocultures were maintained in SFM for 1–2 weeks. In the case of hMSC-derived spheres, spheres were collected by brief centrifugation and plated at the same density as differentiating single hMSC-derived sphere cultures, and kept in SFM containing 20 ng/ml EGF and 1 μM RA for 2 weeks.

■ Cocultures of hMSC-derived NPs with whole mouse cochlear explants

hMSC-derived spheres were collected by brief centrifugation and placed in close proximity to an explant of mouse cochlear epithelium (isolated between postnatal days 1–10), plated a few hours before on poly-L-lysine/fibronectin-coated coverslips. Plating on polyornithine/laminin-coated coverslips did not promote NF-200 expression. Cultures were kept for 1 week in SFM with additional 1 μM RA, 10 ng/ml NT-3 and 10 ng/ml BDNF, before immunocytochemical analysis. No effect of the age of the mice employed for these experiments on the induction of NF-200 expression was observed.

■ Immunostaining

Immunocytochemical analyses were carried out on cultures grown on 35-mm tissue culture dishes coated with fibronectin or, alternatively, on glass coverslips coated with poly-L-lysine (20 μg/ml; Sigma-Aldrich) and fibronectin (10 μg/ml).

Cells were fixed at room temperature in 4% paraformaldehyde (Merck) for 10–15 min. Blocking of nonspecific binding sites and cell permeabilization were carried out in PBT1 solution (phosphate-buffered saline [PBS] containing 0.1% Triton X-100, 1% BSA and 5% FBS). Prior to the addition of the primary antibody, cultures were kept in PBT1 for 15 min. The primary antibody was then added (diluted in PBT1) and left to incubate for 1 h at room temperature. Primary antibodies used in this work were: monoclonal mouse antibody against nestin (R&D Systems; used at a 1:250 dilution), polyclonal rabbit antibodies against Myosin VIIa (Proteus; 1:250), Atoh-1 (Affinity

Bioreagents; 1:1000), calretinin (Swant; 1:2000), and NF-200 from (Sigma-Aldrich; 1:2000). Following incubation with the primary antibody, the cultures underwent a series of PBS washes carried out at room temperature, before the secondary antibody was added and diluted in PBT2 solution (PBS containing 0.1% Triton X-100 and 1% BSA). Secondary antibodies used were Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit IgG, both from Molecular Probes, Invitrogen. Nuclear DNA was counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich). Samples were viewed under a fluorescence microscope (Eclipse 90i, Nikon). Cell counts of labeled cells were performed on random fields imaged under a 40-times objective and selected across the entire culture (i.e., on average, counting was serially carried out on one out of every five fields). Results are indicated as mean percentage of labeled cells/total number of cells.

Analysis of nestin expression in hMSC-derived spheres was carried out by immunohistochemistry. Spheres were fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde, left in 30% sucrose overnight, embedded and frozen in Tissue-Tek OCT compound (Sakura) and sectioned (Cryostat HM550, Microm). Sections were permeabilized for 15 min in PBS containing 0.1% Triton X-100, treated for 1 h with 10% goat serum, and incubated at 4°C overnight with the primary antibody.

■ Quantitative reverse transcription PCR analyses

Isolation of total RNA from cell cultures was performed using Trizol Reagent (Invitrogen), following the manufacturer's protocol. RNA samples were quantified on a spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop®, Thermo Fisher Scientific). In total, 2 μg of RNA were used to synthesize cDNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). cDNA samples were amplified on a Chromo4™ (MJResearch, Bio-Rad Laboratories Inc.), using the GoTaq® Hot Start Polymerase system (Promega) and TaqMan® (Eurofins MWG Operon) probes. The thermocycling conditions consisted of an initial denaturation step of 2 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 30 s and 60°C for 1 min. Primers and probes for each of the genes studied in this work are detailed in TABLE 1. Data were analyzed using the Opticon Monitor™ Software version 2.03 (Bio-Rad Laboratories Inc.). Relative levels of

mRNA expression were calculated according to the $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ method [44], using GAPDH as the housekeeping gene.

■ Statistical analysis

Student's t-tests were conducted to analyze the differences in mRNA expression detected by quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) analyses. Differences between control and treatment groups were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

■ Induction of neural genes in hMSC cultures

Inner ear HCs and SGNs derive from a common NP [45,46]. With this in mind, the first aim of our work was to obtain this type of progenitor. For this purpose, we cultured hMSCs under various neuralizing growth conditions that are summarized in FIGURE 1. In one set of experiments, subconfluent hMSC monolayer cultures were sequentially treated with β -ME and RA, in the presence of FBS. This treatment has been successfully used by Caddick *et al.* to differentiate rat MSCs towards Schwann cells [47]. β -ME is a potent disulfide bond reducer, while RA is the active form of vitamin A, which is important for neural development. RA not only induces neural differentiation of ESCs [48,49], but in hMSCs it also induces the expression of genes of the ectodermal lineage and it downregulates mesodermal genes [50,51]. Alternatively to culturing hMSCs in the presence of β -ME and RA, we also grew hMSC monolayers in SFM containing a combination of NT-3, bFGF and BDNF, as used by Edge *et al.* to obtain NPs from mMSCs (FIGURE 1) [40].

In another set of experiments, hMSCs were grown as nonadherent cultures, in the form of spheres, either in the presence of serum and

RA, or in SFM containing EGF and bFGF (FIGURE 1). The growth of MSCs as spheres and in the absence of serum has already been described as an efficient method to differentiate MSCs towards NPs capable of further differentiation [33,37,41,52]. Finally, hMSC-derived spheres grown in medium containing FBS and RA were also used. This procedure is based on a modified version of the protocol described by Fraichard *et al.*, to differentiate mESC into neural cells [53]. In order to evaluate the effects of each treatment, we looked for changes in the expression of *Nestin* and *Sox-2*. *Nestin* encodes for an intermediate filament protein characteristic of neural stem/progenitor cells [54,55] and it is consistently associated with differentiation of MSCs towards neural precursor lineages [33,56,57]. *Sox-2* is a transcription factor of the SRY-related HMG box family that is expressed in NPs, otic progenitors and NSCs, and is involved in neural commitment and self-renewal [58–60]. qRT-PCR analyses demonstrated increased *Nestin* and *Sox-2* mRNA levels in hMSC cultures grown under all the conditions described above (FIGURE 2B). There were no significant differences between the SFM-grown hMSC-derived spheres and those grown in the presence of serum. Immunocytochemical analysis revealed that monolayer cultures treated with SFM or FBS contained $60.0 \pm 10.95\%$ and $38.6 \pm 7.06\%$ of nestin-positive cells, and $33.06 \pm 2.1\%$ and $61.56 \pm 4.84\%$ of Sox-2-positive cells, respectively (FIGURE 2A); $23.15 \pm 3.39\%$ of the cells grown in SFM and $21.91 \pm 2.63\%$ of the cells grown in the presence of FBS expressed both proteins. In addition to *Nestin* and *Sox-2* expression, we also looked at the expression of the genes *Musashi-1* and *Oct-4* in SFM-grown hMSC-derived spheres. *Musashi-1* is a NSC marker [61] and *Oct-4* is

Table 1. List of the genes analyzed, indicating the sequences of both PCR primers and the FAMTM-labeled probe.

Gene	Forward primer	Reverse primer	Probe (FAM TM)
<i>GAPDH</i>	ACACCCACTCCTCCACCTTTG	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA	CTGGCATTGCCCTCAACGACCA
<i>Sox2</i>	GCAAGATGGCCAGGAGAA	CGCTTAGCCTCGTCGATGA	TGCACAACCTCGGAGATCAGCAAGC
<i>Nestin</i>	AAGAAGAGGATCTAAACAGGAAGGAA	CCCAGAGACTTCAGGGTTTCTTT	TCCAGGACTCCCAGGTTCTTTTGG
<i>Atoh-1</i>	GCAATGTTATCCCGTCGTTC	CTCGGACAAGGCGTTGATGT	TGAGACCCTGCAGATGGCCCAAAT
<i>Myosin VIIa</i>	CCCATTCTGGAAGCATTG	ACTTTCCGAAACGGCTTGAG	ATGCCAAGACCATCCGCAATGACA
<i>Calretinin</i>	CCTGCTGAAGAAGGCGAACC	GGACAGGCAGGAGTCGGGACA	GCCGTACGATGAGCCCAAGCTCCAGGA
<i>Brn3c</i>	TTCTCCAGTCTGCACTCTGG	TGCTCATGGTATGGTTAGGTGG	TCTCCACGGCAAGAACCATCC
<i>Isl1</i>	GCTGGCGACCCGCTCAGTC	GCGGGTGGTCTTCTCCGGC	CAGCCCTGCGGCCCCACGTCCAC
<i>Neurogenin1</i>	TTTCTCTCCCAAGCCTGC	ATCTATTGCTGCTGACTAGG	TGTTTCATTCTTACCACTAGGC
<i>GATA3</i>	CAGAAGGCAGGGAGTGTGTGA	TCTGTCCGTTCAATTTGTGATAGAG	CACTGTGGCGGCGAGATGGC

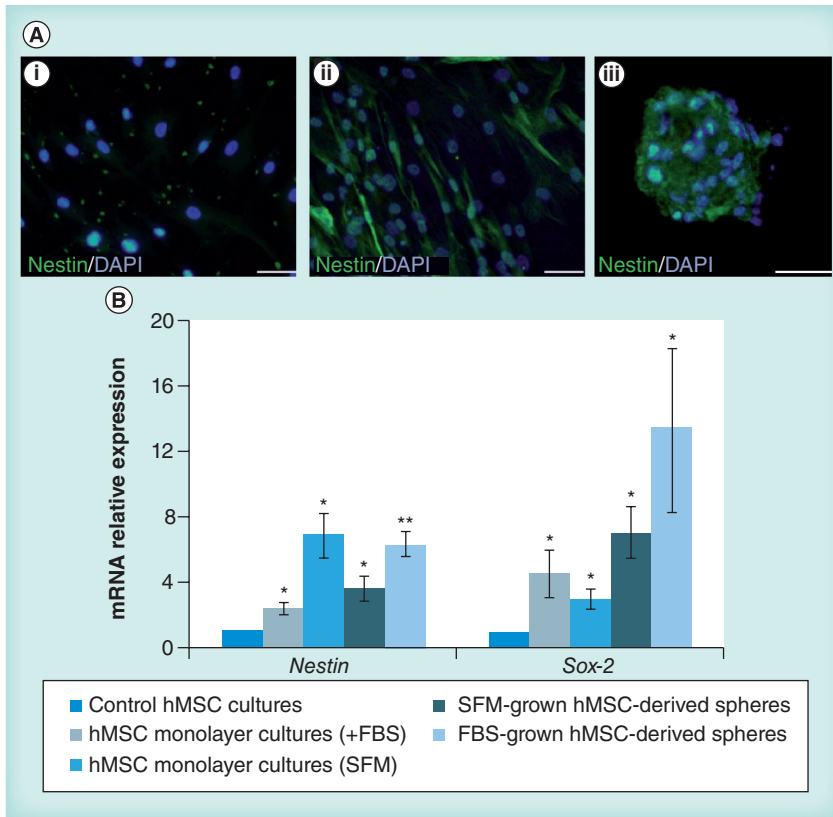


Figure 2. Induction of neural marker expression in human mesenchymal stem cell cultures. (A) Examples of nestin protein expression in hMSC cultures, as detected by immunocytochemistry: (i) hMSC control cultures; (ii) hMSC cultures grown as a monolayer in SFM; (iii) hMSC-derived spheres grown in SFM. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bars: 50 μ m. (B) Quantitative reverse transcription PCR data showing increased *Nestin* and *Sox-2* mRNA expression in treated hMSC cultures, as compared with hMSC control cultures. Data were normalized to expression levels in hMSC control cultures. Student's t-test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$. DAPI: 4',6'-diamidino-2-phenylindole; FBS: Fetal bovine serum; hMSC: Human mesenchymal stem cell; SFM: Serum-free medium.

a marker for pluripotent cells [62]. In agreement with previous results [40], *Musashi-1* and *Oct-4* expression also increased in our cultures (SUPPLEMENTARY FIGURE 3A). In summary, progenitor cells with neural characteristics can be obtained from hMSCs with a reasonable yield by using several different procedures.

■ Induction of HC markers in hMSC-derived NPs

In order to obtain HCs, cultures of hMSCs that were induced to express nestin and Sox-2 were further treated with growth factors. We initially tested different combinations of EGF, IGF-1 and bFGF, all of them known to be important for the development of inner ear progenitors. These factors promote differentiation of HC-like cells from mESCs and inner ear stem cells [16,21], and from rodent bone marrow MSC cultures [40,41]. However, these factors were unable to

induce the expression of HC proteins in hMSC cultures (data not shown). The failure of differentiation of hMSCs under the above conditions suggests that there may be species-specific requirements of hMSCs. We therefore decided to turn to a human model, the human fetal auditory stem cells (hFASCs) recently described by Rivolta and coworkers [43,63]. These cells can be isolated from the cochleae of 9–11-week-old fetuses and they show the potential to give rise to auditory-like neurons and HC-like cells *in vitro*. Differentiation to HC-like cells is achieved by growing them in SFM containing EGF and RA [43]. Therefore, we cultured the hMSC-derived NPs in SFM containing 20 ng/ml EGF and 1 μ M RA (FIGURE 3A). The application of this medium resulted in the induction of the expression of HC markers, although only in SFM-grown hMSC-derived spheres (FIGURE 3B & C). Expression of ATOH-1 ($17.51 \pm 1.71\%$ of cells), Myosin VIIa ($1.88 \pm 0.61\%$ of cells) and Calretinin ($4.18\% \pm 0.97\%$ of cells) was observed by immunocytochemistry (FIGURE 3B) and confirmed at the mRNA level (FIGURE 3C). *Atoh-1* is considered a master gene for the HC lineage, as it has been shown to be necessary and sufficient for differentiation to a HC phenotype [13,14,17,64]. *Atoh-1* expression in HCs is shortly followed by that of Myosin VIIa, which, although not specific to the HC lineage, is typically monitored as a HC marker in differentiation studies of this type [21,22,40,41,43]. qRT-PCR analysis also demonstrated increased expression of another HC gene, *Brn3c* (FIGURE 3C), which is a transcription factor known to play an essential role in the survival of HCs [65,66] and is rapidly induced following *Atoh-1* expression [40,43,67], prior to the expression of *Myosin VIIa* and *Calretinin*. Therefore, these experiments show that hMSC-derived NPs can differentiate under appropriate conditions into HC-like cells.

In a different set of experiments, we followed-up the observation made by Heller *et al.* that coculturing otic progenitors with chick utricle stromal cells promotes the differentiation towards a HC phenotype [22]. For this purpose, we established a similar type of coculture with hMSC-derived NP cultures. Differentiation to HC-like cells was monitored by analyzing the expression of either Myosin VI and/or Myosin VIIa; human cells were distinguished from the chick stromal cells by staining their nuclei with an antibody against the human nuclear (HuNu) antigen. However, none of the hMSC-derived cells expressed HC proteins (FIGURE 4). Occasional Myosin VIIa-positive cells occurring in some of

the cultures were negative for HuNu and identified as of avian origin; counting of these rare cells was therefore not carried out. Therefore, coculture of hMSCs with avian stromal cells did not promote differentiation towards a HC phenotype.

■ Induction of sensory neuron markers in hMSC-derived NPs

In the following experiments we explored the possibility of obtaining sensory neuron phenotypes from hMSCs. We conducted a first set of experiments based on the report by Kondo *et al.* showing that a combination of SHH and

RA was able to differentiate mMSCs towards sensory neurons, as opposed to other treatments that rendered nonsensory neurons [39]. RA is known to play an essential role in inner ear development [68,69] and SHH is important for the initiation of sensory neurogenesis [70]. However, in the case of hMSCs, the application of the SHH/RA culture regime failed to induce sensory neuron differentiation (data not shown). Therefore, we decided to modify the original protocol. First, instead of applying the preinduction step described by Kondo *et al.* [39], we obtained hMSC-derived NPs by treatment with β -ME and RA. Second, we cultured these

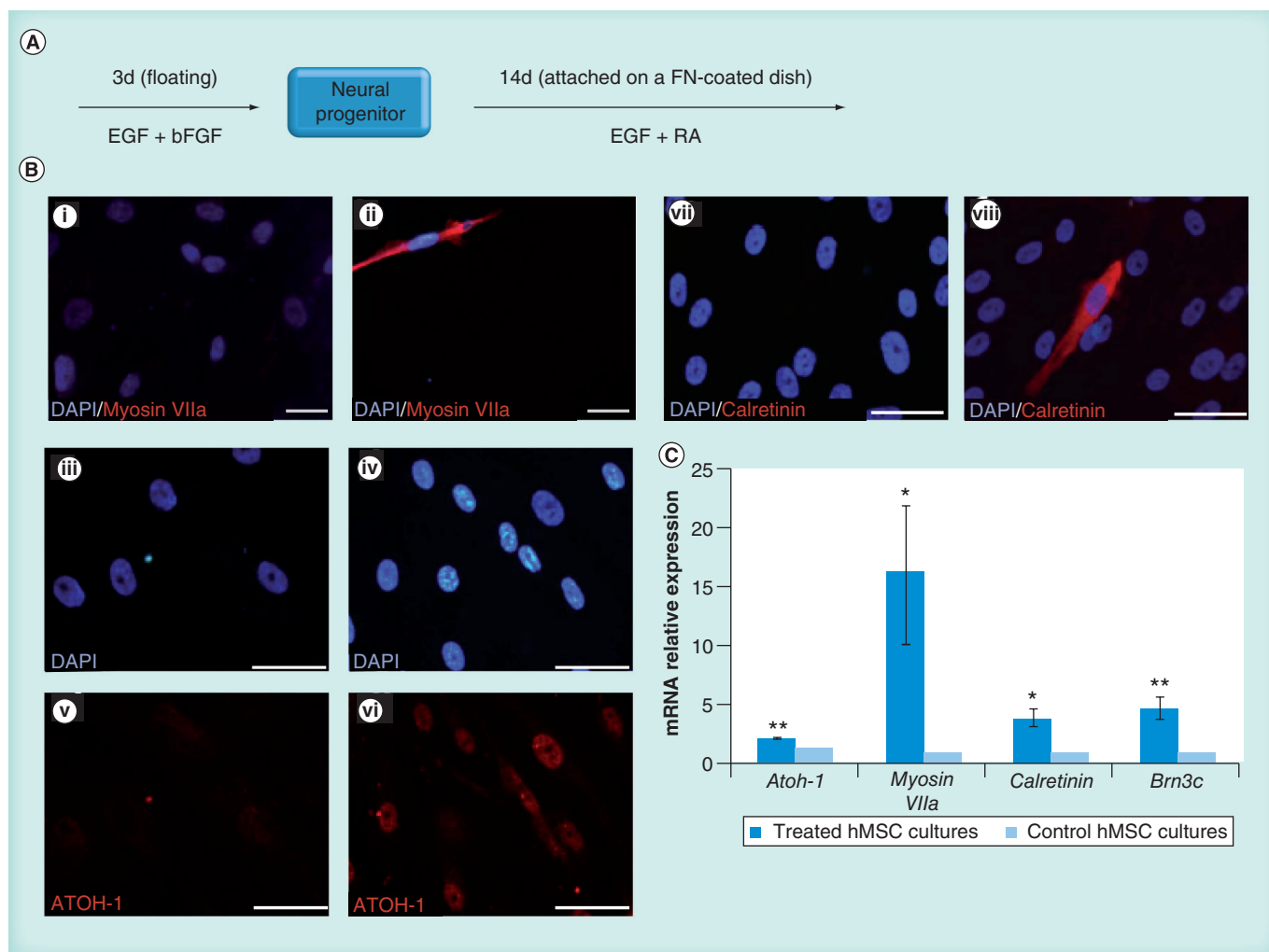


Figure 3. Induction of hair cell proteins in serum-free medium-grown human mesenchymal stem cell-derived sphere cultures. (A) Schematic representation of the culture regime followed in these experiments. (B) hMSC expression of Myosin VIIa (ii), ATOH-1 (iv & vi) and Calretinin (viii) proteins was observed in hMSC cultures grown in serum-free medium with added RA and EGF, compared with control cultures (i, iii, v & vii). Cells expressing Myosin VIIa and Calretinin proteins were mostly identified as single cells within the culture, perhaps due to the migration of the cells away from the body of the sphere during differentiation. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bars: 50 μ m. (C) Quantitative reverse transcription PCR shows increased mRNA expression of the genes *Atoh-1*, *Myosin VIIa*, *Calretinin* and *Brn3c* in cultures grown in serum-free medium with added RA and EGF, as compared with nontreated controls.

Student's t-test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

d: Day; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; FN: Fibronectin; hMSC: Human mesenchymal stem cell; RA: Retinoic acid.

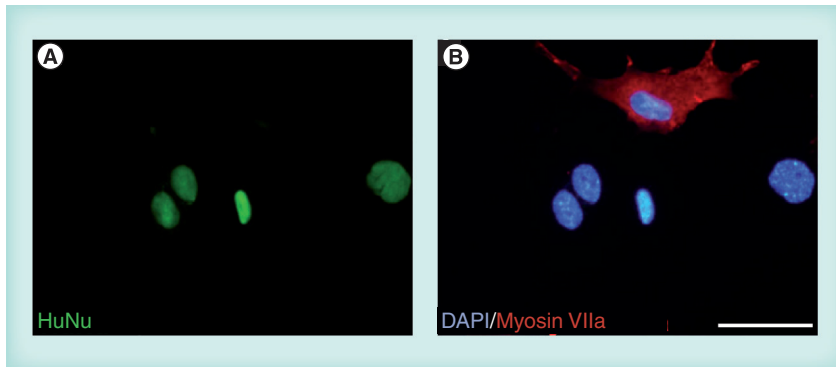


Figure 4. Coculture of human mesenchymal stem cell-derived neural progenitors with chick utricle stromal cells. No Myosin VIIa expression was detected in (A) HuNu-positive human mesenchymal stem cell-derived cells cocultured with chick utricle stromal cells (HuNu-negative). (B) Occasionally, some Myosin VIIa staining was observed in chick cells. Scale bar: 50 μ m. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

cells in a medium that contained SHH and RA, together with BDNF and NT-3 (FIGURE 5A), which are known to support the survival of auditory sensory neurons [43,71]. Finally, we grew our cultures in the presence of bFGF, followed by bFGF/BDNF/NT-3, factors that are known to sequentially regulate SGN differentiation [71,72]. Under these conditions, we were able to observe increased transcriptional levels of *Sox-2*, *GATA-3*, *Ngn-1* and *Islet-1* (FIGURE 5C). These genes are typically expressed in ANs throughout development. In addition, immunocytochemical analyses for Sox-2 ($47.19 \pm 10.68\%$ of cells), NF-200 ($3.24 \pm 0.68\%$ of cells) and the sensory marker Calretinin ($3.63 \pm 2.27\%$ of cells) demonstrated the induction of these genes after growth factor treatment (FIGURE 5B). Expression of the early neuronal marker β III-tubulin was not analyzed because, in agreement with previous reports [52,73,74], we already detected the expression of this protein in a high proportion of undifferentiated hMSCs.

Another set of experiments was carried out using hMSC-derived spheres grown in the presence of FBS and RA. The spheres were left to attach to tissue culture plates and were initially grown in the presence of bFGF. This factor is a well-known inducer of otic fate and it has been employed to obtain inner ear progenitor-like cells from neuralized mESC cultures [22]. We subsequently treated our cultures with different combinations of SHH, bFGF, BDNF and NT-3, following the protocol described by Chen *et al.* for hFASCs (FIGURE 6A) [43]. As with the protocol described above, qRT-PCR analysis of the genes *Sox-2*, *GATA-3* and *Ngn-1* indicated increased transcription of these genes in treated cells (FIGURE 6C); immunocytochemical

analyses confirmed induction of Sox-2 expression ($41.55 \pm 8.37\%$ pf cells), as well as that of NF-200 ($5.64 \pm 1.79\%$ of cells) and Calretinin ($3.63 \pm 0.60\%$ of cells) (FIGURE 6B).

A third set of experiments was performed by coculturing hMSC-derived spheres with mouse cochlear explants, following the protocol of Coleman *et al.* [75]. Neuronal differentiation of the human cells was assessed by immunocytochemical analyses of NF-200 and the human nuclear antigen protein, HuNu. Coculture of SFM-grown hMSC-derived spheres with mouse cochlear explants resulted in NF-200 protein expression in some HuNu-positive cells (FIGURE 7).

Taken together, these results indicate that hMSCs can generate sensory neuron phenotypes under the appropriate conditions.

Discussion

SNHL is the most common sensory disorder in humans. Given the absence of a stem/progenitor cell population in the postnatal auditory system, a cell therapy approach for efficiently treating moderate-to-severe hearing loss must be based on the implantation of exogenous cells that can differentiate into the lost sensory cell types of the inner ear. Both HCs and ANs derive from a common NPs [45,46,76]. Along with the potential of MSCs to differentiate into cells of a neural type [33,34,47,77,78], this makes these cells good candidates for neuroregenerative cell-based therapies. Nevertheless, neural differentiation studies on MSCs must take some important points into account, namely the unclear nature of these cells [79–81], considered by many to be a heterogeneous mix of multipotent progenitors instead of a *bona fide* stem cell population, and also the risks of relying on the expression of neural markers as indicators of differentiation in MSC cultures, as it is now known that undifferentiated MSCs may already express an array of these markers [73,74]. A clear example of this was the detection of β III-tubulin protein in our untreated hMSC cultures, which precluded the use of this antibody in our analyses of neuronal differentiation. Consequently, our differentiation studies always included the analysis of untreated hMSC controls as reference. In addition, a number of reports have shown that what appears to be differentiation of MSCs towards neural lineages is often the result of a toxic effect following the manipulation of these cells [34,82,83]. Thus, the phenotypic changes observed in these MSC cultures are caused by morphological changes (mostly due to rapid

disruption of the cytoskeleton) that are not accompanied by the corresponding genotypic and physiological changes. In order to avoid this type of artifact in our work, we decided to mostly apply differentiation protocols that had already been proven to give rise to specific neural cell types following treatment of MSC cultures [33,40,47,50,77,78] and we analyzed changes in the treated hMSC cultures not only by immunocytochemistry but also by looking at the gene transcription levels, via qRT-PCR. Importantly, we did not observe fast, drastic morphological changes or any significant cell death in our cultures, arguing against a toxic effect of the applied treatment regimes.

The differentiating culture regimes employed during the course of our work led to changes

in both the phenotype and the genotype of the original hMSCs. These changes were observed to be maintained in time.

■ Induction of NPs in hMSC cultures

Various reports have highlighted the need to convert MSCs to an intermediate NSC/NP cell-like stage prior to their differentiation towards more committed neural cell types [33,37,50,52]. Therefore, we employed several protocols known to lead to the differentiation of MSCs into NPs [40,47,77,78], and obtained progenitors that expressed the neural markers nestin and Sox-2. Work on SFM-grown hMSC-derived spheres also indicated a significant increase in the expression of *Oct-4* and *Musashi-1* (SUPPLEMENTARY FIGURE 3B), as previously shown for mMSCs [40].

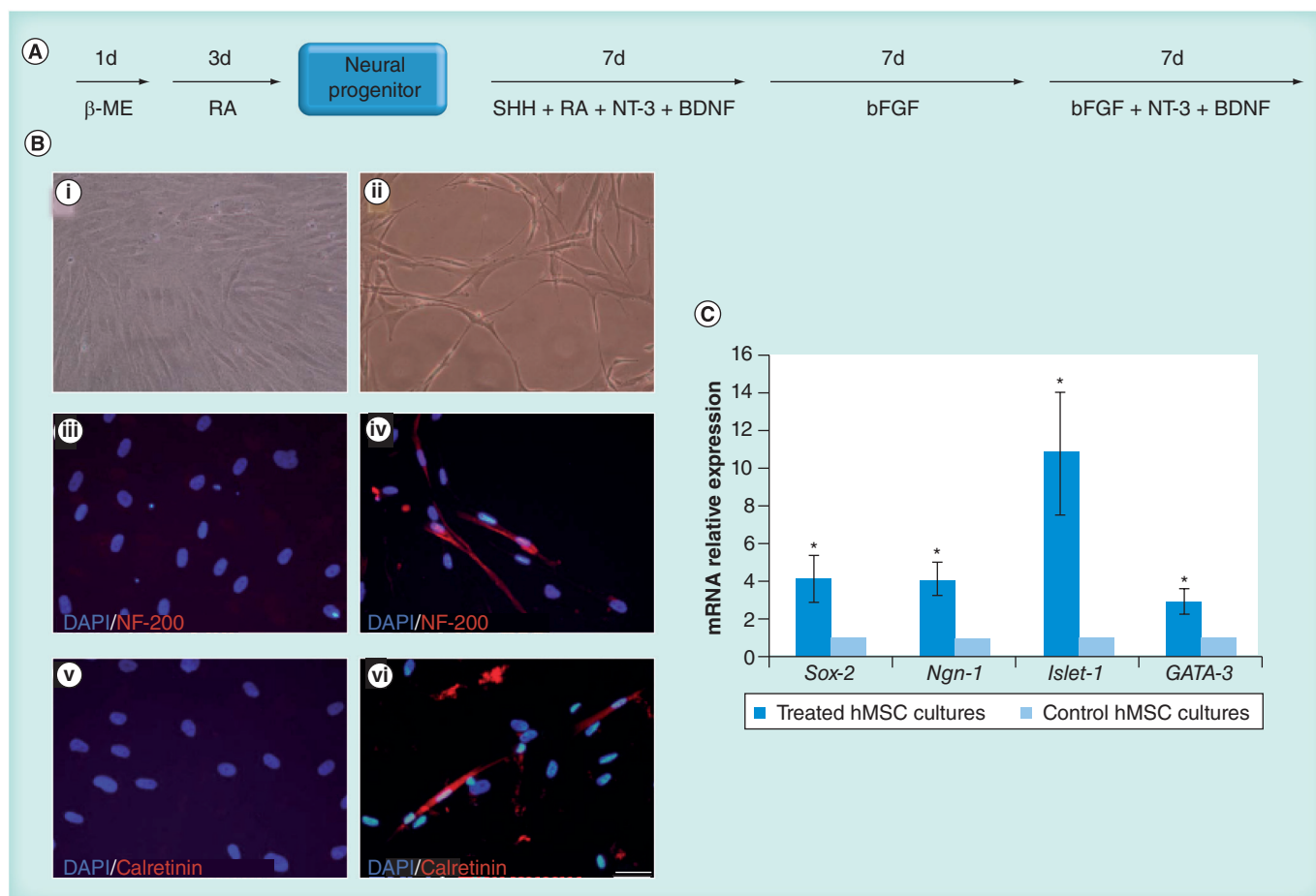


Figure 5. Expression of sensory neuron proteins in neural progenitor cultures obtained following β -mercaptoethanol and retinoic acid treatment of human mesenchymal stem cell monolayers. (A) Schematic representation of the culture regime followed in these experiments. (B) hMSC-derived neural progenitor control cultures (i, iii & v) were compared with cultures grown in serum-free medium containing a combination of growth factors (ii, iv & vi), modified from the protocols described in [34,37]. (i & ii) Phase-contrast photographs. Expression of NF-200 (iii & iv) and Calretinin (v & vi) was observed in the treated cultures (iv & vi) upon staining with the corresponding antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar: 50 μ m. (C) Quantitative reverse transcription PCR data indicate increased mRNA expression of the genes *Sox-2*, *Ngn-1*, *Islet-1* and *GATA-3*. Data were normalized to expression levels in hMSC control cultures.

Student's t-test: *p < 0.05.

β -ME: β -mercaptoethanol; d: Day; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; hMSC: Human mesenchymal stem cell; RA: Retinoic acid.

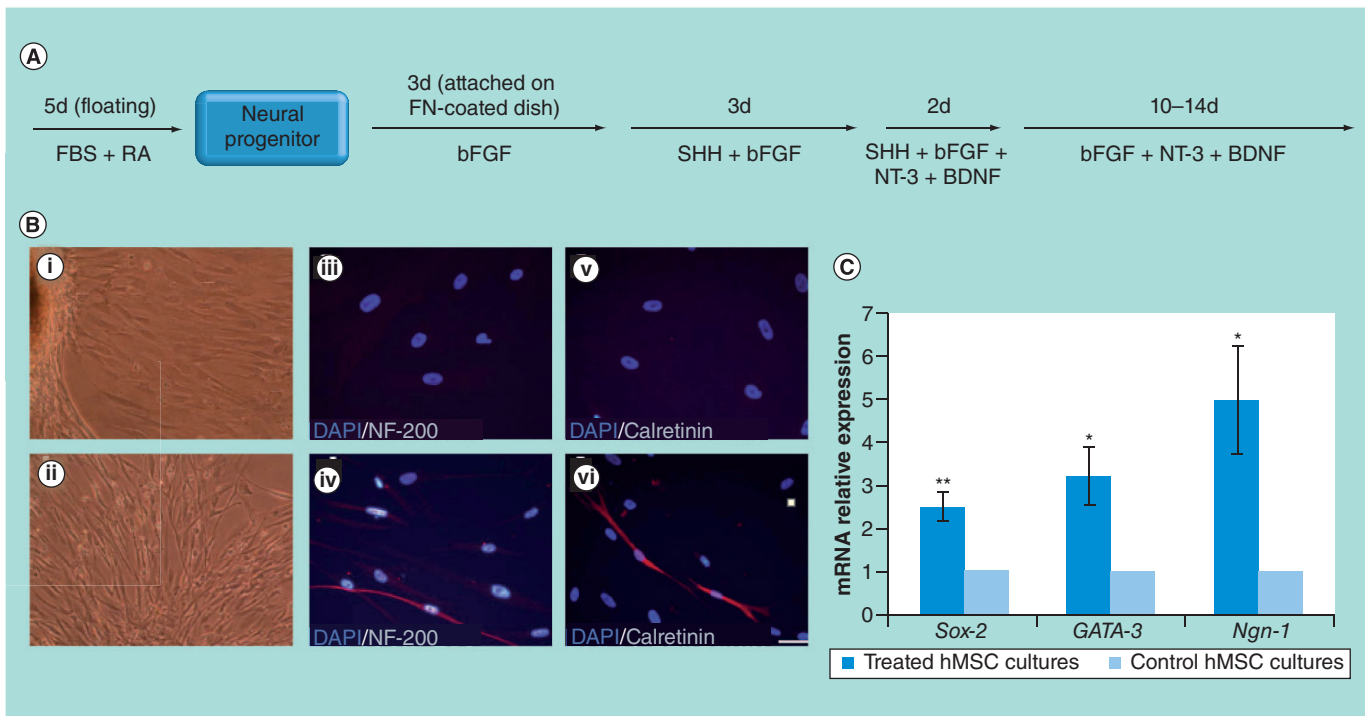


Figure 6. Expression of sensory neuron proteins in fetal bovine serum-grown human mesenchymal stem cell-derived sphere cultures. (A) Schematic representation of the culture regime followed in these experiments. (B) hMSC-derived sphere cultures grown in the presence of bFGF and subsequently grown in serum-free medium containing a combination of growth factors (ii, iv & vi; see [37]) were compared with hMSC control cultures (i, iii & v). (i & ii) Phase-contrast photographs. Expression of NF-200 (iii & iv) and Calretinin (v & vi) was observed in the treated cultures (iv & vi) upon staining with the corresponding antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar: 50 μ m. (C) Quantitative reverse transcription PCR results indicate increased mRNA expression of the genes *Sox-2*, *GATA-3* and *Ngn-1*. Data were normalized to expression levels in hMSC control cultures. Student's t-test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; FBS: Fetal bovine serum; FN: Fibronectin; hMSC: Human mesenchymal stem cell; RA: Retinoic acid.

Therefore, it is possible to generate several standard protocols that result in the generation of NPs from hMSCs cultures.

■ Differentiation of hMSC-derived NP cultures towards HCs

Further differentiation of hMSC-derived neural cell populations towards cells that express HC markers was obtained, but only under very specific and restricted culture conditions. From the several protocols tested, HC markers were only observed when hMSC-derived NPs were grown following the procedure used by Chen *et al.* for hFASCs [43], that is, growing hMSC-derived NPs in SFM containing EGF and RA. On the other hand, not all the hMSC-derived NP cultures were induced to express HC markers under these conditions, but only those obtained as SFM-grown hMSC-derived spheres. These results suggest a strong variability in the responsiveness of the cell populations obtained from hMSCs when applying different neural induction treatments. Such variability may simply reflect the different efficiency in the differentiation

of hMSCs into distinct types of NPs upon the treatments employed. Alternatively, only certain neural subpopulations within the hMSC cultures may respond to the different treatment regimes. In this regard, it has been claimed that MSC cultures are perhaps not a true stem cell population but rather a heterogeneous mix of clones with different growth and differentiation responses [79–81]. The observed variability would be caused by the heterogeneity of the hMSC population, which in turn would result in a heterogeneous response to the different growth conditions.

In our hands, the coculture of hMSC-derived NPs with chick utricle stromal cells did not lead to differentiation towards HC-like cells. This is in contrast to the data obtained from mESCs [22], and this divergence probably arises from the differences between the NPs used in the cocultures. Most likely it is related to the lack of differentiation of our hMSC-derived NPs towards an otic lineage prior to the establishment of the cocultures. Overexpression of *Atoh-1* in hMSCs and hMSC-derived NP cultures failed to differentiate these cells towards HCs, which is in contrast with

what occurs in mMSCs [40]. Moreover, we have some indication that Atoh-1 overexpression in hMSC cultures might lead these cells to apoptosis (DURÁN ALONSO MB, FEIJOO REDONDO A, CONDE DE FELIPE M, SCHIMMANG T, UNPUBLISHED DATA). Neither have we observed differentiation of hMSC-derived NPs toward HC-like cells when cocultured with chick otocyst cells (see [40]). In addition, the application of the differentiation conditions described for mMSCs to our hMSC cultures did not completely recapitulate the results on mMSCs. For example, while there is an increase in the expression of Atoh-1 during the differentiation of mMSCs

towards NPs [40], we observed a significant down-regulation in the expression of this gene in hMSCs (SUPPLEMENTARY FIGURE 3B). Moreover, the application of culture conditions that generate sensory neurons from mMSCs [39] to hMSC cultures did not lead to neuronal differentiation but, on the contrary, exerted a somewhat toxic effect on the cultures (DURÁN ALONSO MB, FEIJOO REDONDO A, CONDE DE FELIPE M, SCHIMMANG T, UNPUBLISHED DATA). These discrepancies between hMSCs and mMSCs suggest again important species-specific differences that are worth considering when thinking about potential therapeutical applications.

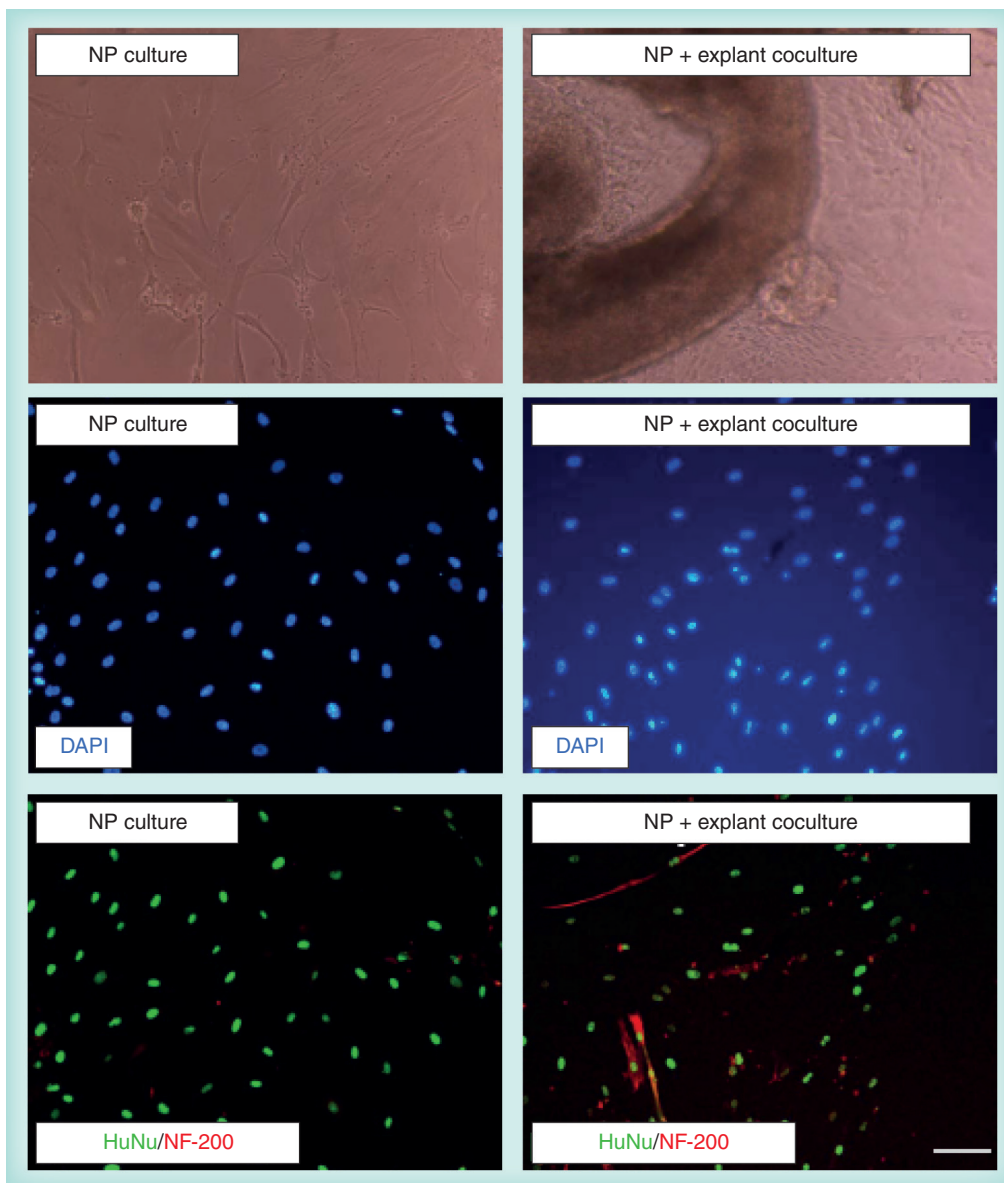


Figure 7. Coculture of human mesenchymal stem cell-derived neural progenitors with mouse cochlear explants promotes neuronal differentiation of these cells, as indicated by NF-200 staining of HuNu-positive cells. Nuclei were counterstained with DAPI.

Scale bar: 100 μ m.

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; NP: Neural progenitor.

■ Differentiation of hMSC-derived NP cultures toward ANs

Two protocols yielded differentiation of hMSC-derived NPs towards neurons, both relying on the combination of SHH and either RA or bFGF. SHH is a sensory neuron competence factor [4,70], while RA and bFGF have been shown to promote the development of ANs [84,85]. However, not all of the protocols used to obtain hMSC-derived NPs resulted in cells that responded to these neuronal induction cues. Instead, they exhibited the same selectivity in response to treatment as that described above for HC-like cells. In the case of the neurons, the only cultures upregulating AN markers were those that had been exposed to RA. The neural and neuronal inducing properties of RA are well known [47–49,53,86,87], and, in the context of MSCs, RA induces the expression of ectodermal genes, but downregulates mesodermal genes, and promotes neuronal differentiation [50,51,85].

Differentiation of FBS/RA-grown hMSC-derived spheres towards neuronal-like cells was only attained when bFGF was intercalated prior to the application of the neuronal differentiation protocol described for hFASCs [43]. bFGF is a well-known otic inducer and it has been previously used by Heller and coworkers to direct neuralized mESCs towards the otic lineage [22]. The fact that RA provides a region of competence for bFGF-dependent otic induction [88] during normal development underlines the importance of the cooperative function of FGFs and RA in neuronal and HC differentiation.

It is interesting that while only hMSC-derived spheres grown in the presence of FBS and RA differentiated towards sensory neuron-like cells, hMSC-derived spheres grown in SFM responded best to neuronal induction cues from mouse cochlear explants. This suggests again the heterogeneity of the hMSC-derived NP populations obtained with the various

treatments, and the variety of responses elicited by differentiation cues.

Conclusion

The demonstration of the neural differentiation potential of MSC cultures [33,39,50,52] has opened up a new range of applications for this type of cells in regenerative medicine. Our results show that HC- and sensory neuron-like cells can be obtained from hMSCs grown in culture under specific protocols and culture conditions. The data point to the existence of a considerable heterogeneity among the NP populations obtained from hMSC cultures, depending on the neural induction method used. This leads to a subsequent variability in the response to further differentiation cues. Our results also indicate the existence of species-related differences in the response of human and rodent MSCs to *in vitro* cues aimed at their differentiation to inner ear sensory cells. Ultimately, our work has resulted in the establishment of a set of conditions that lead to the expression of gene combinations that are characteristic for either HCs or ANs in hMSC cultures. To our knowledge, this is the first report on the potential of human bone marrow-derived MSCs to acquire *in vitro* features of auditory sensory cells, following their culture in specific growth factor combinations. These results add to the exciting report by Cho and colleagues [38] of some degree of hearing recovery following transplantation of neuralized hMSCs into an auditory neuropathy guinea pig model.

Acknowledgements

The authors would like to thank I López-Hernández and A Fontecha Santos for technical support.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by TerCel, PLE2009-0098, MICINN, Red de Terapia Celular de Castilla y León, Cibernet and Junta de Castilla y León, Consejería de Educación and the European Social Fund within the PO Castilla y León 2007–2013 Programme. MB Durán Alonso is holder of a JAE-postdoc fellowship financed by

Executive summary

- Neural progenitors can be obtained from human mesenchymal stem cells (hMSCs) following the application of specific culture regimes.
- Differentiation of hMSCs to an intermediate neural progenitor stage is a critical factor for their differentiation to inner ear sensory lineages.
- hMSC-derived neural progenitors can give rise to hair cell-like cells. Differentiation takes place when neural progenitors obtained from serum-free medium-grown nonadherent hMSC cultures are exposed to EGF and retinoic acid.
- hMSC-derived neural progenitors can generate auditory neuron-like cells. This is achieved by culturing neural progenitors obtained from retinoic acid-treated hMSCs in the presence of defined growth factor combinations that contain Sonic Hedgehog.
- Our data strongly point to the existence of species-related differences in the response of human and rodent MSCs to specific differentiation cues, underlining the importance of studying human cells when evaluating the potential use of MSCs for regenerative therapies.

the FSE. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

References

Papers of special note have been highlighted as:

▪ of interest

▪▪ of considerable interest

- 1 Tucci D, Merson MH, Wilson BS. A summary of the literature on global hearing impairment: current status and priorities for action. *Otol. Neurotol.* 31, 31–41 (2010).
- 2 Nadol JB Jr. Patterns of neural degeneration in the human cochlea and auditory nerve: implications for cochlear implantation. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 117, 220–228 (1997).
- 3 Starr A, Sininger YS, Pratt H. The varieties of auditory neuropathy. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 11, 215–230 (2000).
- 4 Sekiya T, Holley MC, Kojima K, Matsumoto M, Helyer R, Ito J. Transplantation of conditionally immortal auditory neuroblasts to the auditory nerve. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2307–2318 (2007).
- 5 Wilson BS, Dorman MF. Cochlear implants: current designs and future possibilities. *J. Rehabil. Res. Dev.* 45, 695–730 (2008).
- 6 Zeng FG, Rebscher S, Harrison WV, Sun X, Feng H. Cochlear implants: system design, integration and evaluation. *IEEE Rev. Biomed. Eng.* 1, 115–142 (2008).
- 7 Moore DR, Shannon RV. Beyond cochlear implants: awakening the deafened brain. *Nat. Neurosci.* 12, 686–691 (2009).
- 8 Stone JS, Cotanche DA. Hair cell regeneration in the avian auditory epithelium. *Int. J. Dev. Biol.* 51, 633–647 (2007).
- 9 Brignull HR, Raible DW, Stone JS. Feathers and fins: non-mammalian models for hair cell regeneration. *Brain Res.* 1277, 12–23 (2009).
- 10 Warchol ME. Sensory regeneration in the vertebrate inner ear: differences at the levels of cells and species. *Hear. Res.* 273, 72–79 (2011).
- 11 Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K *et al.* Auditory hair cell replacement and hearing improvement by *Atoh1* gene therapy in deaf mammals. *Nat. Med.* 11, 271–276 (2005).
- 12 Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R, Brough DE, Raphael Y. *Math1* gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs *in vivo*. *J. Neurosci.* 23, 4395–4400 (2003).
- 13 Kraft S, Hsu C, Brough DE, Staecker H. *Atoh1* induces auditory hair cell recovery in mice after ototoxic injury. *Laryngoscope* doi:10.1002/lary.22171 (2012) (Epub ahead of print).
- 14 Schlecker C, Praetorius M, Brough DE *et al.* Selective atonal gene delivery improves balance function in a mouse model of vestibular disease. *Gene Ther.* 18, 884–890 (2011).
- 15 Zheng JL, Gao WQ. Overexpression of *Math1* induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nat. Neurosci.* 3, 580–586 (2000).
- 16 Li H, Liu H, Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat. Med.* 9, 1293–1299 (2003).
- 17 Oshima K, Grimm CM, Corrales CE *et al.* Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 8, 18–31 (2007).
- 18 Groves AK. The challenge of hair cell regeneration. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 235, 434–446 (2010).
- 19 Jongkamonwiwat N, Zine A, Rivolta MN. Stem cell based therapy in the inner ear: appropriate donor cell types and routes for transplantation. *Curr. Drug Targets* 11, 888–897 (2010).
- 20 Conde de Felipe MM, Feijoo Redondo A, Garcia-Sancho J, Schimmang T, Durán Alonso MB. Cell- and gene-therapy approaches to inner ear repair. *Histol. Histopathol.* 26, 923–940 (2011).
- 21 Li H, Roblin G, Liu H, Heller S. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 13495–13500 (2003).
- **This was the first report on the *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells to hair cell (HC)-like cells via their culture in the presence of a specific combination of growth factors, namely EGF, IGF-1 and bFGF, and the subsequent withdrawal of these factors. The authors then went on to demonstrate further differentiation of the obtained HC-like cells *in vivo* following their integration into developing inner ear sensory patches in chick–mouse chimeras.**
- 22 Oshima K, Shin K, Diensthuber M, Peng AW, Ricci AJ, Heller S. Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell* 141, 704–716 (2010).
- **Reports the *in vitro* differentiation of both mouse embryonic stem cells and mouse induced pluripotent stem cells to hair cells. A combination of markers that is typical of HCs was induced in both types of culture. Further differentiation and cytomorphological specializations were acquired by these cells when they were cocultured with embryonic chicken utricle stromal cells.**
- 23 Corrales CE, Pan L, Li H, Liberman MC, Heller S, Edge AS. Engraftment and differentiation of embryonic stem cell-derived neural progenitor cells in the cochlear nerve trunk: growth of processes into the organ of Corti. *J. Neurobiol.* 66, 1489–1500 (2006).
- 24 Altschuler RA, O’Shea KS, Miller JM. Stem cell transplantation for auditory nerve replacement. *Hear. Res.* 242, 110–116 (2008).
- 25 Shi F, Corrales CE, Liberman MC, Edge AS. BMP4 induction of sensory neurons from human embryonic stem cells and reinnervation of sensory epithelium. *Eur. J. Neurosci.* 26, 3016–3023 (2007).
- 26 Reyes JH, O’Shea KS, Wys NL *et al.* Glutamatergic neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells after transient expression of neurogenin 1 and treatment with BDNF and GDNF: *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Neurosci.* 28, 12622–12631 (2008).
- 27 Erdo F, Buhler C, Blunk J *et al.* Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 780–785 (2003).
- 28 Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 51, 1–28 (2004).
- 29 Pauley S, Kopecky B, Beisel K, Soukup G, Fritsch B. Stem cells and molecular strategies to restore hearing. *Panminerva Med.* 50, 41–53 (2008).
- 30 Ito J, Kojima K, Kawaguchi S. Survival of neural stem cells in the cochlea. *Acta Otolaryngol.* 121, 140–142 (2001).
- 31 Hu Z, Wei D, Johansson CB *et al.* Survival and neural differentiation of adult neural

- stem cells transplanted into the mature inner ear. *Exp. Cell Res.* 302, 40–47 (2005).
- 32 Han Z, Yang JM, Chi FL *et al.* Survival and fate of transplanted embryonic neural stem cells by *Atoh1* gene transfer in guinea pigs cochlea. *Neuroreport* 21, 490–496 (2010).
- 33 Hermann A, Gastl R, Liebau S *et al.* Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J. Cell. Sci.* 117, 4411–4422 (2004).
- 34 Krabbe C, Zimmer J, Meyer M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells – a critical review. *APMIS* 113, 831–844 (2005).
- 35 Feng Z, Li C, Jiao S, Hu B, Zhao L. *In vitro* differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes. *Hepatogastroenterology* 58, doi:10.5754/hge11220 (2011) (Epub ahead of print).
- 36 Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T *et al.* Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport* 15, 1–4 (2004).
- 37 Ogita H, Nakagawa T, Sakamoto T, Inaoka T, Ito J. Transplantation of bone marrow-derived neurospheres into guinea pig cochlea. *Laryngoscope* 120, 576–581 (2010).
- 38 Cho YB, Cho HH, Jang S, Jeong HS, Park JS. Transplantation of neural differentiated human mesenchymal stem cells into the cochlea of an auditory-neuropathy guinea pig model. *J. Korean Med. Sci.* 26, 492–498 (2011).
- 39 Kondo T, Johnson SA, Yoder MC, Romand R, Hashino E. Sonic Hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 4789–4794 (2005).
- **Identifies Sonic Hedgehog and retinoic acid as sensory competence factors that exert synergistic effects on neuralized mouse mesenchymal stem cells to express a set of glutamatergic sensory neuron markers. Further differentiation of these cells was promoted by their incubation in the presence of embryonic hindbrain/somite/otocyst conditioned medium or by their coculture with cochlear explants.**
- 40 Jeon SJ, Oshima K, Heller S, Edge AS. Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors *in vitro* for inner ear hair cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 59–68 (2007).
- **Describes the differentiation of mouse mesenchymal stem cells to neurosensory progenitors. Further differentiation of these progenitors to inner ear sensory cells was observed following *Math1* overexpression or coculture of the progenitors with embryonic chick inner ear cells.**
- 41 Qin H, Zhao LD, Sun JH *et al.* The differentiation of mesenchymal stem cells into inner ear hair cell-like cells *in vitro*. *Acta Otolaryngol.* 131, 1136–1141 (2011).
- 42 Boddy SL, Chen W, Romero-Guevara R, Kottam L, Bellantuono I, Rivolta MN. Inner ear progenitor cells can be generated *in vitro* from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Regen. Med.* 7(6), 757–767 (2012).
- 43 Chen W, Johnson SL, Marcotti W, Andrews PW, Moore HD, Rivolta MN. Human fetal auditory stem cells can be expanded *in vitro* and differentiate into functional auditory neurons and hair cell-like cells. *Stem Cells* 27, 1196–1204 (2009).
- **This is the first publication on the culture of cochlear progenitors of human origin and their differentiation to HC- and auditory neuron-like cells.**
- 44 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–408 (2001).
- 45 Ma Q, Anderson DJ, Fritzsche B. Neurogenin 1 null mutant ears develop fewer, morphologically normal hair cells in smaller sensory epithelia devoid of innervation. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 1, 129–143 (2000).
- 46 Satoh T, Fekete DM. Clonal analysis of the relationships between mechanosensory cells and the neurons that innervate them in the chicken ear. *Development* 132, 1687–1697 (2005).
- 47 Caddick J, Kingham PJ, Gardiner NJ, Wiberg M, Terenghi G. Phenotypic and functional characteristics of mesenchymal stem cells differentiated along a Schwann cell lineage. *Glia* 54, 840–849 (2006).
- 48 Wang R, Liang J, Yu HM, Liang H, Shi YJ, Yang HT. Retinoic acid maintains self-renewal of murine embryonic stem cells via a feedback mechanism. *Differentiation* 76, 931–945 (2008).
- 49 Engberg N, Kahn M, Petersen DR, Hansson M, Serup P. Retinoic acid synthesis promotes development of neural progenitors from mouse embryonic stem cells by suppressing endogenous, Wnt-dependent nodal signaling. *Stem Cells* 28, 1498–1509 (2010).
- 50 Keilhoff G, Goihl A, Langnase K, Fansa H, Wolf G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 11–24 (2006).
- 51 Solmesky L, Lefler S, Jacob-Hirsch J, Bulvik S, Rechavi G, Weil M. Serum free cultured bone marrow mesenchymal stem cells as a platform to characterize the effects of specific molecules. *PLoS One* 5, e12689 (2010).
- 52 Hermann A, Liebau S, Gastl R *et al.* Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols. *J. Neurosci. Res.* 83, 1502–1514 (2006).
- 53 Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J. Cell. Sci.* 108, 3181–3188 (1995).
- 54 Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585–595 (1990).
- 55 Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G. Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* 469, 311–324 (2004).
- 56 Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKecher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 290, 1779–1782 (2000).
- 57 Wislet-Gendebien S, Leprince P, Moonen G, Rogister B. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J. Cell. Sci.* 116, 3295–3302 (2003).
- 58 Ferri AL, Cavallaro M, Braida D *et al.* Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131, 3805–3819 (2004).
- 59 Neves J, Kamaid A, Alsina B, Giraldez F. Differential expression of Sox2 and Sox3 in neuronal and sensory progenitors of the developing inner ear of the chick. *J. Comp. Neurol.* 503, 487–500 (2007).
- 60 Pevny LH, Nicolis SK. Sox2 roles in neural stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 421–424 (2010).
- 61 Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T *et al.* Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev. Neurosci.* 22, 139–153 (2000).
- 62 Pesce M, Scholer HR. Oct-4: control of totipotency and germline determination. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 452–457 (2000).
- 63 Chen W, Cacciabue-Rivolta DI, Moore HD, Rivolta MN. The human fetal cochlea can be a source for auditory progenitors/stem cells isolation. *Hear. Res.* 233, 23–29 (2007).
- 64 Bermingham NA, Hassan BA, Price SD *et al.* *Math1*: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284, 1837–1841 (1999).
- 65 Xiang M, Gan L, Li D *et al.* Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 9445–9450 (1997).

- 66 Xiang M, Gao WQ, Hasson T, Shin JJ. Requirement for Brn-3c in maturation and survival, but not in fate determination of inner ear hair cells. *Development* 125, 3935–3946 (1998).
- 67 Hu X, Huang J, Feng L, Fukudome S, Hamajima Y, Lin J. Sonic Hedgehog (SHH) promotes the differentiation of mouse cochlear neural progenitors via the Math1–Brn3.1 signaling pathway *in vitro*. *J. Neurosci. Res.* 88, 927–935 (2010).
- 68 Romand R, Dolle P, Hashino E. Retinoid signaling in inner ear development. *J. Neurobiol.* 66, 687–704 (2006).
- 69 Frenz DA, Liu W, Cvekl A *et al.* Retinoid signaling in inner ear development: a ‘Goldilocks’ phenomenon. *Am. J. Med. Genet. A* 152A, 2947–2961 (2010).
- 70 Ota M, Ito K. Induction of neurogenin-1 expression by Sonic Hedgehog: its role in development of trigeminal sensory neurons. *Dev. Dyn.* 227, 544–551 (2003).
- 71 Hossain WA, Brumwell CL, Morest DK. Sequential interactions of fibroblast growth factor-2, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and their receptors define critical periods in the development of cochlear ganglion cells. *Exp. Neurol.* 175, 138–151 (2002).
- 72 Nicholl AJ, Kneebone A, Davies D *et al.* Differentiation of an auditory neuronal cell line suitable for cell transplantation. *Eur. J. Neurosci.* 22, 343–353 (2005).
- 73 Tondreau T, Lagneau X, Dejenneff M *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 72, 319–326 (2004).
- 74 Montzka K, Lassonczyk N, Tschoke B *et al.* Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neurosci.* 10, 16 (2009).
- 75 Coleman B, Fallon JB, Pettingill LN, de Silva MG, Shepherd RK. Auditory hair cell explant co-cultures promote the differentiation of stem cells into bipolar neurons. *Exp. Cell Res.* 313, 232–243 (2007).
- 76 Jeon SJ, Fujioka M, Kim SC, Edge AS. Notch signaling alters sensory or neuronal cell fate specification of inner ear stem cells. *J. Neurosci.* 31, 8351–8358 (2011).
- 77 Yang Q, Mu J, Li Q *et al.* A simple and efficient method for deriving neurospheres from bone marrow stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 520–524 (2008).
- 78 Radtke C, Schmitz B, Spies M, Kocsis JD, Vogt PM. Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 817–823 (2009).
- 79 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41–49 (2002).
- 80 Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 126–131 (2011).
- 81 Pevsner-Fischer M, Levin S, Zipori D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell. Rev.* 7, 560–568 (2011).
- 82 Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J. Neurosci. Res.* 77, 174–191 (2004).
- 83 Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostur L, MacKay A, Fischer I. Reevaluation of *in vitro* differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of the actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J. Neurosci. Res.* 77(2), 192–204 (2004).
- 84 Carnicero E, Garrido JJ, Alonso MT, Schimmang T. Roles of fibroblast growth factor 2 during innervation of the avian inner ear. *J. Neurochem.* 77, 786–795 (2001).
- 85 Martinez-Monedero R, Yi E, Oshima K, Glowatzki E, Edge AS. Differentiation of inner ear stem cells to functional sensory neurons. *Dev. Neurobiol.* 68, 669–684 (2008).
- 86 Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev. Biol.* 168, 342–357 (1995).
- 87 Bi Y, Gong M, Zhang X *et al.* Pre-activation of retinoid signaling facilitates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *Dev. Growth Differ.* 52, 419–431 (2010).
- 88 Hans S, Christison J, Liu D, Westerfield M. Fgf-dependent otic induction requires competence provided by Foxi1 and Dlx3b. *BMC Dev. Biol.* 7, 5 (2007).

