



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

Tesis doctoral

*“Células madre en el oído interno;
Trasplante celular en el órgano de Corti”*

Rodrigo Martínez Monedero

2008

A mi familia

D. Rafael Ramirez Camacho, con DNI 25887090-S, Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Servicio del Hospital Universitario Puerta de Hierro y

D. Jose Ramón García Berrocal con DNI 1110346-K, Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Sección del Hospital Universitario Puerta de Hierro

CERTIFICAN QUE

D. Rodrigo Martínez Monedero con DNI 9799802-P, Licenciado en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valladolid y Médico Adjunto del Departamento de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Puerta de Hierro ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: "*Células madre en el oído interno, trasplantes celulares en el órgano de Corti*" y que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su exposición y defensa como tesis doctoral.

Madrid, 10 de abril de 2008

Fdo: Los directores de tesis



D. Rafael Ramirez Camacho.



D. Jose Ramón García Berrocal

AGRADECIMIENTOS

Quisiera reconocer la ayuda que me ofrecieron:

Los directores de tesis

El Departamento de Otorrinolaringología del Hospital Clínico
Universitario de Valladolid

El Department of Otolaryngology, Eaton Peabody Laboratory del
Massachusetts Eye and Ear Infirmary de la Universidad de Harvard en
Boston

El Glowatzki Laboratory del Johns Hopkins School of Medicine en
Baltimore

El Departamento de Otorrinolaringología del Hospital Universitario
Puerta de Hierro de la Universidad Autónoma de Madrid

Gracias al esfuerzo de todos ellos este trabajo ha sido posible.

INDICE

INTRODUCCION.	1-22
1. Oído interno e hipoacusia.....	3
2. Epidemiología de la hipoacusia.....	4
3. Hipoacusia neurosensorial. Clasificación.....	5-8
4. Neuronas espiroganglionares o auditivas.	
• 4. 1. Características.....	8-9
• 4. 2. Importancia de las neuronas auditivas en la función coclear....	10
• 4. 3. Irreversibilidad de la pérdida neuronal.....	11-12
5. Regeneración celular en el oído interno.....	13-15
6. Células madre en el oído interno.	
• 6. 1. Embriología del oído interno.....	15-16
• 6. 2. Estado actual del conocimiento sobre las células madre del oído interno.....	16-18
• 6. 3. Estudio de la diferenciación de las células madre del oído interno.....	18-20
7. Posibilidad del trasplante neuronal en el órgano de Corti.....	20
OBJETIVOS	23-26
MATERIAL Y METODOS	27-60
1. Denervación de un explante del órgano de Corti.	33-36
1.1. Cultivo in vitro del órgano de Corti.....	33
1.2. Tratamiento del explante del órgano de Corti con β -bungarotoxina.....	34
1.2.1. Unión de la β -bungarotoxina a las células del órgano de Corti.....	35

1.2.2. Estudio de la muerte celular por apoptosis (TUNEL) en explantes de órgano de Corti.....	35-36
2. Obtención y caracterización de células madre del oído interno de mamíferos tras el nacimiento.	37-48
2.1. Estudio de la proliferación celular de las células madre.....	40-41
2.2. Estudio de la diferenciación celular de las células madre.....	42-45
2.3. Estudio de la funcionalidad de las neuronas obtenidas de la diferenciación de las células madre mediante electrofisiología.....	45-48
3. Trasplante celular en el explante del órgano de Corti denervado tras la neurotoxina.	48-52
3.1. Trasplante de neuronas auditivas.....	48-50
3.2. Trasplante de células madre del oído interno.....	51-52
4. Inmunohistoquímica.	53-57
5. Aislamiento del ARN y PCR con transcriptasa inversa.	58-59

RESULTADOS 61-92

1. Denervación de un explante del órgano de Corti.	61-66
1.1. Especificidad de la unión de la β -bungarotoxina a las neuronas auditivas.....	66-67
1.2. Apoptosis en las neuronas auditivas tras el tratamiento con β -bungarotoxina.....	67-68
2. Obtención y caracterización de células madre del oído interno de mamíferos tras el nacimiento.	69-85
2.1. Estudio de la proliferación celular de las células madre.....	69-72
2.1.1. Formación de esferas en diferentes áreas del oído interno.	
2.2. Estudio de la diferenciación celular de las células madre.....	72-80
2.2.1. Diferenciación en neuronas, células gliales y células ciliadas.	

2.2.2. La diferenciación de las células madre comparte el programa neurogénico de los progenitores neuronales in vivo.

2.3. Estudio de la funcionalidad de las neuronas obtenidas de la diferenciación de las células madre.....81-85

3. Trasplante celular en el explante del órgano de Corti denervado tras la neurotoxina. 85-93

3.1. Trasplante de neuronas auditivas.....85-89

3.2. Trasplante de células madre del oído interno.....90-91

DISCUSION 93-126

1. Evolución histórica de la corrección de la hipoacusia neurosensorial. 95

2. Estado actual de la corrección de la hipoacusia neurosensorial. 97

3. Importancia de la población neuronal en el nervio auditivo. 98-99

4. Terapia celular. 100-102

5. Denervación de un explante del órgano de Corti. 102-106

6. Obtención y caracterización de células madre del oído interno de mamíferos tras el nacimiento. 107-121

6.1. Registro electrofisiológico de las neuronas diferenciadas de las células madre utriculares.....118-120

7. Trasplante celular en el explante del órgano de Corti denervado tras la neurotoxina. 120-125

7.1. Trasplante de neuronas auditivas.....120-123

3.1.1. Establecimiento de la polaridad neuronal.

7.2. Trasplante de células madre del oído interno.....124-125

CONCLUSIONES 127-130

BIBLIOGRAFIA 131-146

INTRODUCCIÓN

1. Oído interno e hipoacusia.

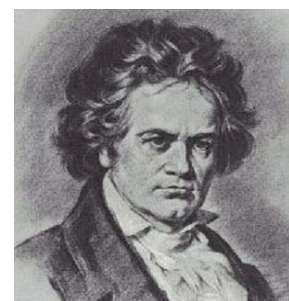
El oído interno es un órgano con una función especializada en transformar la señal acústica en una señal eléctrica. La señal acústica varía enormemente en amplitud y frecuencia y el órgano de Corti debe ser capaz de captar cada señal con sus diferentes características para ser enviada al sistema nervioso central.

La percepción de los sonidos mantiene al sujeto en relación activa con el exterior, permitiendo la comunicación y mejorando nuestro aprendizaje.

En el ser humano, la pérdida de la audición conlleva alteraciones en el patrón de conducta, aislamiento social y agonía personal (1). Ejemplos llamativos de las consecuencias de la pérdida de la función auditiva se encuentran en las biografías de personajes célebres como L. V. Beethoven o F. Goya (Fig. 1). En ellas se describe el cambio de la expresión artística, la lucha interna y el aislamiento que sufrieron sus vidas debido a la pérdida progresiva de la audición como se describe en una carta personal de Beethoven a sus hermanos (2, 3, 4).



Figura 1.
 Izquierda, autoretrato de F. Goya, 1800, Museo Metropolitano de Nueva York.
 Derecha, dibujo de L. V. Beethoven realizado por Carl Jaeger 1880, The library of Congress.



2. Epidemiología de la hipoacusia.

La pérdida de audición es una de las enfermedades y una de las discapacidades mas frecuentes. Debido a su inicio insidioso y progresivo, la determinación de la prevalencia de la pérdida auditiva es un valor aproximado. Para individuos mayores de 65 años es el tercer problema de salud más frecuente (30%), únicamente por detrás de la artritis (47%) y de la hipertensión (39%). Debido al aumento de la esperanza de vida en los países en vías de desarrollo, la incidencia de esta enfermedad está en aumento.

Según el Instituto Nacional de Estadística (INE) en España, en 1999, existían unas 700.000 personas con algún grado de deficiencia auditiva, con una tasa de 31,07 personas por cada 1000 habitantes en edades comprendidas entre los 6 y 80 años. La tasa de personas con hipoacusia se incrementa gradualmente en las poblaciones de más edad (Fig. 2). La incidencia de hipoacusia severa en el recién nacido es de 1 por cada 1000, cifra que aumenta considerablemente cuando se trata de niños con factores de riesgo de hipoacusia.

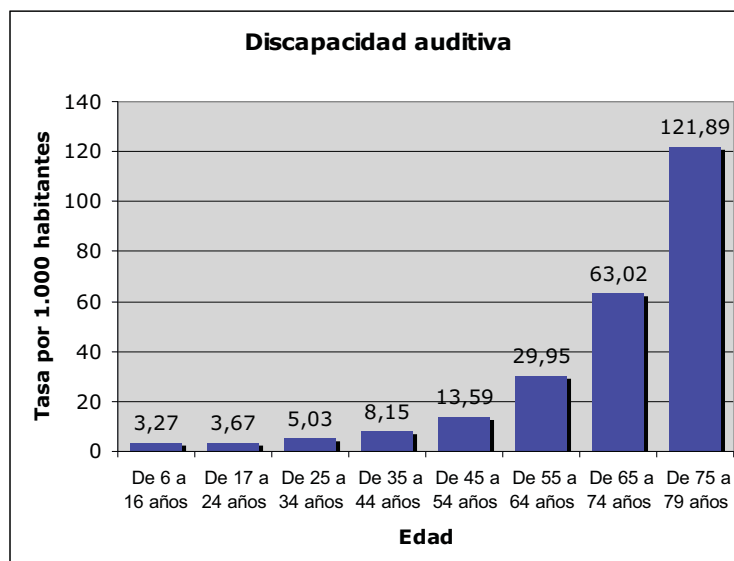


Figura 2. Diagrama de barras de las tasas de personas con discapacidad auditiva por 1.000 habitantes en grupos de edad según el Instituto Nacional de Estadística en 1999 en España. Se observa un aumento exponencial con el aumento de la edad.

3. Hipoacusia neurosensorial. Clasificación.

La hipoacusia neurosensorial se refiere a dos entidades relacionadas:

- Hipoacusia sensorial, donde predomina una desaparición de las células cocleares.
- Hipoacusia neuronal, donde las neuronas auditivas son las más afectadas.

La hipoacusia neurosensorial no es una entidad única y puede deberse a factores múltiples. Una historia familiar, la exposición a sonidos intensos en ambientes de trabajo u ocio, el alcohol, tabaco, traumatismos craneales, infecciones, enfermedades cardiovasculares y trastornos inmunológicos se asocian a la instauración temprana de la pérdida auditiva. El uso de medicamentos también puede acelerar los cambios degenerativos en el oído interno.

Otras causas de sordera neurosensorial incluyen las patologías específicas del oído como la otoesclerosis coclear, el schwannoma vestibular, la enfermedad de Menière's (pérdida auditiva, tinnitus, sensación de plenitud ótica y crisis de vértigo) y la medicación ototóxica (aspirina, aminoglucósidos o el cisplatino entre otros) (Tabla I).

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos
Aminoglucósidos (Gentamicina, estreptomina, neomicina, tobramicina...). Macrólidos (Clarithromicina, eritromicina, azitromicina). • Diuréticos del asa (Furosemida, ácido etacrínico...). • Salicilatos (Ácido acetilsalicílico). • Quinina • Antineoplásicos
Componentes platinados (cisplatino, carboplatino). Difluorometilornitina. |
|---|

Tabla I. Medicamentos con potencial ototóxico.

Típicamente, si no hay una causa identificable en la historia clínica de un paciente de edad adulta con hipoacusia neurosensorial se le diagnostica de presbiacusia o pérdida de audición relacionada con la edad. Schuknecht HF y Gacek MR clasificaron en el año 1993 la presbiacusia en diferentes tipos basándose en las características histopatológicas ocurridas en la cóclea (5, 6). Así se clasificaron cuatro tipos: neural, sensorial, estrial y conductiva coclear (Fig. 3). También es posible observar formas mixtas e indeterminadas.

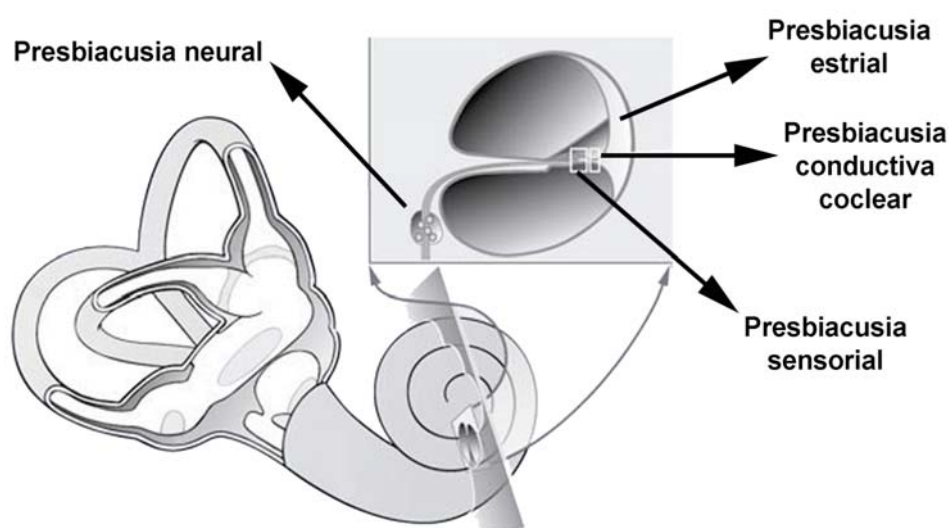


Figura 3. Localización coclear de la lesión en los diferentes tipos de presbiacusia según la clasificación histopatológica de Schuknecht y Gacek. Adaptación de Senn P y Heller S, *HNO* 2008; 56: 21-2.

Presbiacusia neural. Histológicamente se produce una pérdida difusa de las neuronas auditivas, principalmente en la base coclear. La pérdida auditiva es variable con una mayor tendencia a afectar las frecuencias altas. Los síntomas ocurren en edades mayores cuando la falta neuronal impide un correcto procesamiento del sonido. Los pacientes, a pesar de mantener unos niveles aceptables en el umbral de percepción en la audiometría tonal liminar, presentan una afectación progresiva en los porcentajes de discriminación verbal.

Además pueden ocurrir otros signos o síntomas a nivel del sistema nervioso central tales como disminución de la capacidad cognitiva, temblores o incoordinación.

Actualmente no existe un modelo experimental *in Vitro* de hipoacusia neuronal. Nuestros experimentos se centran principalmente en este tipo de patología.

Presbiacusia sensorial. Se produce una pérdida de las células ciliadas cocleares en la base de la cóclea. Clínicamente se diagnostica por una caída neurosensorial de forma gradual en el umbral auditivo en las frecuencias agudas (2kHz-8kHz) y, normalmente, simétrica. El órgano de Corti, el cual contiene los receptores auditivos (células ciliadas), aparece atrofiado en las muestras histopatológicas. Los efectos de un trauma acústico crónico también se presentan con estas características.

Presbiacusia estrial. Se produce una pérdida de células en la estría vascular en las porciones media y apical de la cóclea. Como consecuencia se genera una alteración en el equilibrio electroquímico de la endolinfa con una pérdida del potencial eléctrico positivo del líquido endolinfático. Clínicamente se manifiesta como una hipoacusia neurosensorial con una disminución en el umbral auditivo, similar en todas las frecuencias. La discriminación verbal está generalmente conservada. Parece existir una predisposición familiar.

Presbiacusia conductiva coclear. Se le considera un diagnóstico de exclusión histopatológico. La apariencia del órgano de Corti es normal. El engrosamiento o la pérdida de flexibilidad de la

membrana basilar pueden contribuir a este tipo de presbiacusia. La pérdida auditiva en la audiometría tonal muestra una caída del umbral auditivo gradual con una afectación mayor en las frecuencias agudas, iniciándose la hipoacusia en edades adultas. La pérdida es progresiva y la discriminación verbal empeora cuanto mayor sea la caída en las frecuencias agudas.

Presbiacusia mixta. La mayoría de las presbiacusias muestran patrones histopatológicos y clínicos de más de un tipo. De esta manera, una combinación de una presbiacusia estrial y neural produce una hipoacusia neurosensorial con un umbral auditivo plano en la audiometría tonal acompañada de una mala discriminación verbal.

4. Neuronas espiroganglionares o auditivas.

4.1 Características.

Durante el desarrollo, las neuronas bipolares del ganglio espiral de la cóclea conectan con el núcleo coclear en el sistema nervioso central y con las células ciliadas del órgano de Corti a través de prolongaciones centrales y periféricas respectivamente que salen del cuerpo neuronal que forma el ganglio espiral (Fig. 4). El ganglio espiral está formado por el perikarion de las neuronas auditivas, cuyas prolongaciones están situadas a ambos lados del cuerpo neuronal, como se describió hace más de cien años (7, 8).

Existen dos tipos de neuronas espiroganglionares que inervan el epitelio sensorial coclear:

- Las **neuronas auditivas tipo I** realizan sinapsis únicas con las células ciliadas internas a través de prolongaciones sin ramificaciones. Son de mayor tamaño que las neuronas tipo II, bipolares y con los axones mielinizados. Representan el 90-95% de las neuronas del ganglio espiral.
- Las **neuronas auditivas tipo II** realizan sinapsis múltiples con varias células ciliadas externas a través de prolongaciones con ramificaciones. Son menores en tamaño que las neuronas tipo I y con menos ribosomas (sustancia de Nissl). Son pseudomonopolares y con axones no mielinizados. Estas características sugieren que su función sea la monitorización eléctrica de las células ciliadas internas. Representan el 5-10% de las neuronas del ganglio espiral.

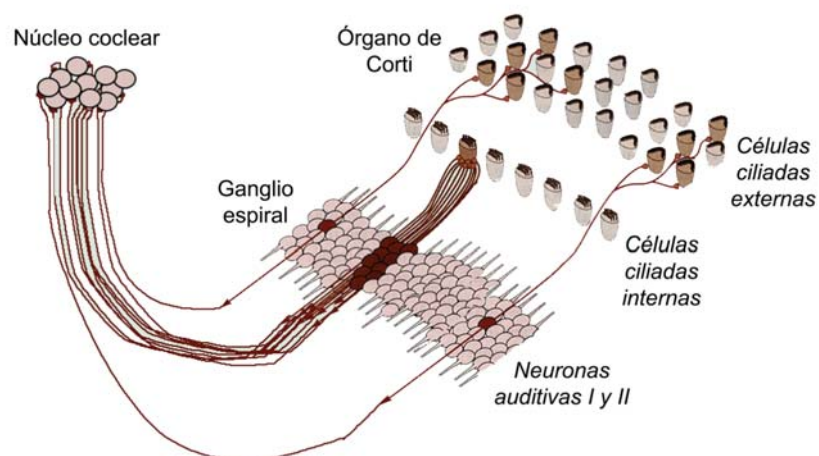


Figura 4. Neuronas auditivas en el ganglio espiral y sus prolongaciones centrales hacia el núcleo coclear y prolongaciones periféricas hacia las células ciliadas del órgano de Corti. Modificación de Kandel ER. *Principles of neural science*; 4ª Edición.

Algunos aspectos de las prolongaciones periféricas que crecen hacia las células ciliadas son similares a las dendritas, como por ejemplo el hecho de que la señal eléctrica desde la célula ciliada se transmita a través de una terminación postsináptica a la neurona espiroganglionar. Otras características de las prolongaciones periféricas son similares a las de un axón, como por ejemplo el hecho de que la prolongación esté cubierta por mielina, tenga nódulos y en su desarrollo crezca como un axón hacia la célula ciliada. La reparación funcional del nervio auditivo tras su lesión sería posible únicamente si las neuronas trasplantadas formaran conexiones periféricas y centrales.

4. 2. Importancia de las neuronas auditivas en la función coclear.

El número de neuronas auditivas varía considerablemente en diferentes especies. En el ser humano hay alrededor de 30.000 neuronas, 50.000 en el gato (9) y 250.000 en la ballena (10).

La pérdida de las neuronas auditivas es la patología más frecuente en el oído humano anciano (4). Otte y colaboradores en 1978 demostraron que se producía una pérdida de alrededor de 1.200 neuronas por década de vida (11). Importantes reducciones en el número de neuronas auditivas, incluso con la presencia de las células ciliadas, han sido descritas en diversos estudios (4, 12).

Sobre la base del gran número de neuronas auditivas existentes en el oído sano, es posible la hipótesis de que los umbrales no se vean afectados de una manera importante por una pérdida moderada neuronal debido a que las neuronas restantes deberían transmitir adecuadamente un estímulo. Sin embargo, debido a la complejidad

del lenguaje, es de esperar que haya una relación entre el número de neuronas auditivas en la cóclea humana y la capacidad para el reconocimiento verbal.

Otte y colaboradores en el año 1978, de acuerdo a estas observaciones, dedujeron que aproximadamente son necesarias unas 10.000 neuronas espiroganglionares para el entendimiento del lenguaje. Un estudio más tardío del mismo grupo (13) encontró que la discriminación verbal se relacionaba con la densidad de la inervación coclear en la región correspondiente a las frecuencias 1 y 3 kHz, el mismo rango de frecuencias que se producen en la formación de los sonidos de las vocales.

Tales resultados se deben interpretar con precaución debido a que el entendimiento del lenguaje realmente es dependiente de las estructuras cerebrales centrales. Es arriesgado asumir que todas las pérdidas en la percepción del lenguaje son debidas a lesiones periféricas únicamente. Un estudio comparando el reconocimiento verbal de personas jóvenes y ancianos concluye que ambas patologías auditivas, centrales y periféricas, están implicadas en el desarrollo de la presbiacusia (14).

4. 3. Irreversibilidad de la pérdida neuronal.

La degeneración de las neuronas aferentes puede ocurrir de dos maneras:

- Pérdida neuronal *primaria*, en la que hay conservación de las células ciliadas (15, 16, 17).
- *Secundaria* a la pérdida de las células ciliadas, las cuales normalmente suministran los factores neurotróficos para estas neuronas (18, 16).

Los estudios mediante ratones transgénicos han mostrado la existencia de algunos factores de los que depende la supervivencia de las neuronas espiroganglionares (Tabla II).

- Genes que expresan las **neurotrofinas** (19, 20),
- Componentes de la **vía erbB** (21).
- Una **proteína kinasa AMPc-dependiente** (22).
- El **receptor de la acetilcolina** (subunidad $\beta 2$), mutaciones en el gen responsable de este receptor provocan una degeneración neuronal por la edad (23).
- La **cadherina 23** (24, 25).

Tabla II. Factores estudiados en la literatura en los que la alteración en su producción disminuye la supervivencia de las neuronas auditivas

La degeneración neuronal primaria (sin lesión en las células ciliadas) se ha descrito en una variedad de patologías que causan un daño directo a las neuronas (26). Se ha observado, por ejemplo, en ratones expuestos a sonidos con una intensidad que no provocaba la pérdida de las células ciliadas (27).

Tras un daño neuronal se ha demostrado que las neuronas espiroganglionares envían nuevas prolongaciones en diferentes modelos animales, como por ejemplo, tras la toxicidad ejercida por el glutamato aplicado de una manera constante en cobayas (28, 29). La sección experimental del nervio auditivo en ratones provoca el crecimiento de fibras hacia la cóclea (30). Sin embargo, en humanos la extensión del crecimiento no es lo suficientemente importante para provocar una mejora clínica (31, 32).

Tras la degeneración neuronal en el sistema auditivo, al contrario de lo que ocurre en las neuronas motoras periféricas y en algunas neuronas sensoriales, las neuronas auditivas no se regeneran de una manera clínicamente significativa (33, 30). Ante esta

incapacidad innata de regeneración neuronal se hace necesario el buscar un tratamiento que evite la degeneración neuronal o que, si la pérdida neuronal está ya instaurada, reemplace las neuronas auditivas.

5. Regeneración celular en el oído interno.

El descubrimiento de la capacidad de regeneración y reparación funcional del oído interno en diferentes especies ha traído esperanzas en la búsqueda de un tratamiento para que la hipoacusia neurosensorial pueda algún día ser restaurada mediante la proliferación o diferenciación celular.

Peces y anfibios. Una de las características de los peces y anfibios es que sus células conservan en la edad adulta su capacidad de proliferación y diferenciación. En el año 1981 Jeff Corwin demostró que se formaban nuevas células ciliadas en el órgano de la línea lateral en animales adultos. Observó que las células de soporte se dividían con escasa frecuencia a lo largo de la vida, continuamente produciendo nuevas células ciliadas y células de soporte (34). Estudios posteriores han confirmado y extendido estos hallazgos (35).

Aves. Las células de las aves, por el contrario, poseen una capacidad más limitada de proliferación y diferenciación y nacen con un número determinado de células ciliadas. La comunidad científica se sorprendió cuando se demostró que, en las aves, la cóclea producía

nuevas células ciliadas tras un daño por estimulación acústica (36, 37, 38). Junto a las pruebas de imagen, la incorporación de un marcador de ADN (timidina radioactiva) por las nuevas células ha sido aceptada como la prueba de la identificación de la regeneración celular. Reemplazar las células ciliadas no tendría consecuencias funcionales si las nuevas células no fueran reinervadas por las neuronas auditivas. El resultado de estas investigaciones es que la cóclea, en las aves, es un órgano dinámico en cuanto a la regeneración de sus células. La cóclea de las aves conserva la capacidad de reparar lesiones diferentes al reemplazar las células dañadas.

Mamíferos. A diferencia de la cóclea de las aves, en los mamíferos adultos las células ciliadas lesionadas en la cóclea no se ven re-emplazadas. En el sistema vestibular de los mamíferos sí que se mantiene la regeneración de las células ciliadas. Se hace necesario el estudio de posibles tratamientos para estimular la expresión de los genes responsables de la proliferación celular en la cóclea. Montcouquiol y Corwin en el año 2001 demostraron la capacidad de proliferación del epitelio vestibular de la rata tras la estimulación con forskolina. La principal acción de esta molécula es el aumento del AMPc (Fig. 5) (39).

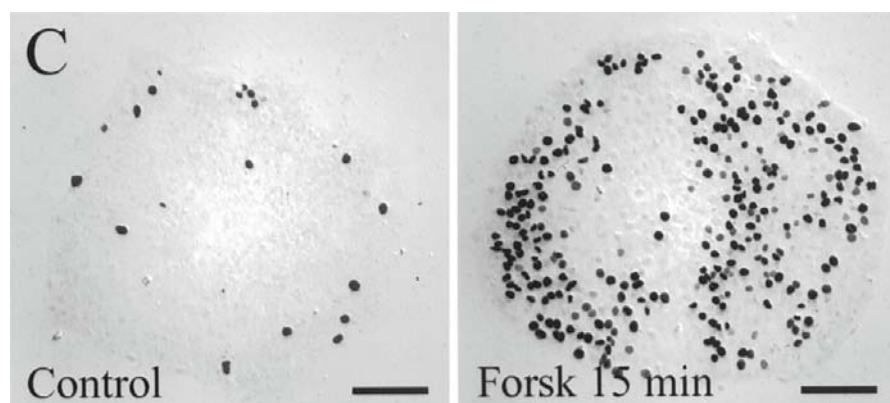


Figura 5. El epitelio vestibular de la rata (utrículo) es teñido con bromodeoxiuridina (marcador mitótico) en negro para comprobar la capacidad de proliferación de sus células. Izquierda, un número escaso de células son positivas. Derecha, tras la estimulación con forskolina durante 15 minutos, la proliferación celular se ve aumentada considerablemente. Tomado de Montcouquiol y Corwin. *J Neurosci.* 2001; 21: 974-82.

La expresión de los genes responsables de la proliferación celular en la cóclea ha disminuido con el desarrollo evolutivo de los mamíferos y la importante especialización de sus células. La posibilidad de la obtención de células madre adultas del oído interno hace posible la búsqueda de nuevos tratamientos que estimulen la proliferación o la diferenciación celular en el oído interno.

6. Células madre en el oído interno.

6. 1. Embriología del oído interno.

La placoda ótica, una de las placodas craneales que forman los órganos sensoriales pares de la cabeza en el embrión, consiste en un engrosamiento ectodérmico que se invagina para formar la vesícula ótica. Las células progenitoras de la vesícula ótica dan lugar a la totalidad de las estructuras especializadas del oído interno (Fig. 6) (40, 41).

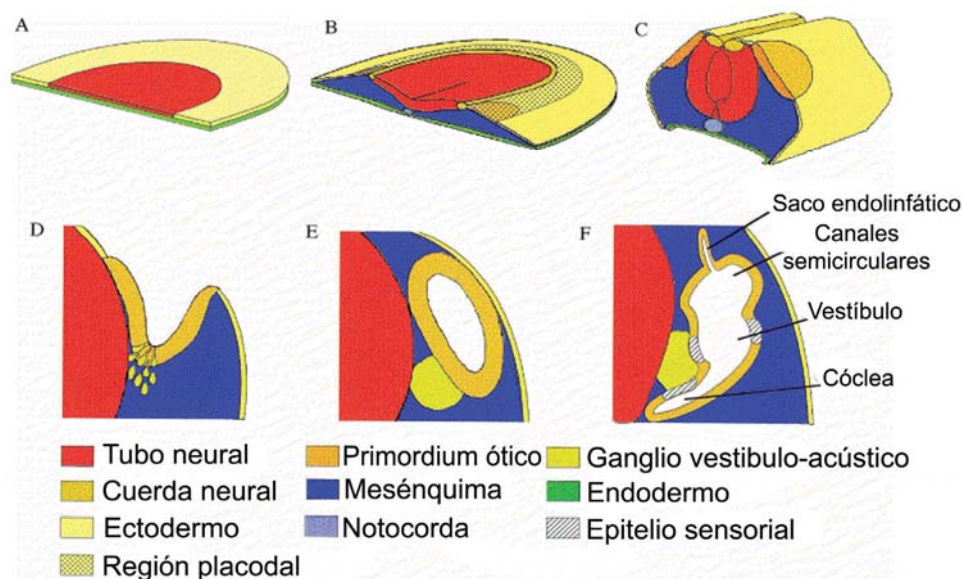


Figura 6. Desarrollo embrionario del oído. Las células del oído interno derivan de la placoda ótica. D. Las células del ganglio vestibulo-acústico se desprenden de la placoda ótica. Adaptación de Torres M. y Giráldez F., 1998. (41)

El nervio auditivo está formado por los neuroblastos que derivan de la placoda ótica que llevan a cabo una serie de procesos de diferenciación para formar las neuronas sensoriales (40, 42). Su origen, por lo tanto, es diferente al de las neuronas sensoriales derivadas de la cresta neural (43). Las células progenitoras de la placoda ótica del embrión que forman las neuronas auditivas, vestibulares y las células ciliadas pueden tener un origen común (44). Por analogía con la cresta neural, las células madre de la placoda pueden incluir células que tienen la capacidad para diferenciarse en células gliales y en neuronas. Algunas células madre de la cresta neural se diferencian en neuronas sensoriales (43, 45).

6. 2. Estado actual del conocimiento sobre las células madre del oído interno.

Estudios recientes han demostrado la existencia de células que cumplen las características de las células madre en el aparato vestibular del oído interno del ratón (46). Estas células madre pueden ser aisladas y separadas del resto al formar agrupaciones celulares esféricas cuando proliferan en una placa de Petri (no adherente) (Fig. 7) (46). Estas esferas flotantes contienen un elevado número de células madre y pueden ser propagadas en cultivo para obtener un importante número de esferas clonales.

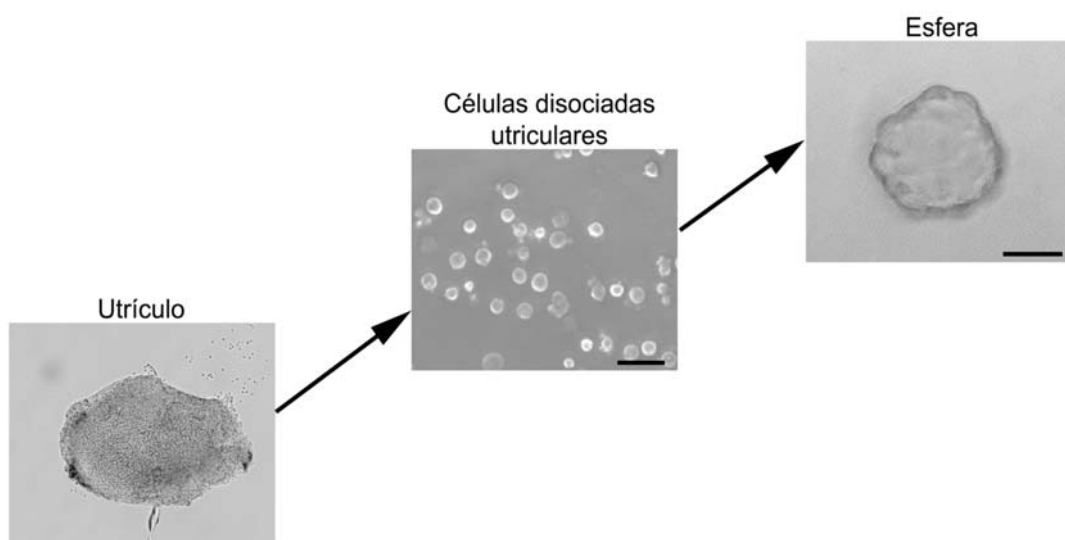


Figura 7. Formación de esferas por la proliferación de algunas células disociadas del utrículo de un ratón. Estas esferas, al flotar en el medio de cultivo, pueden ser aisladas y propagadas *in Vitro*. Barra de medida es de 130 μm en figura central y 40 μm en figura de esfera.

La diferenciación celular puede promoverse con la adhesión celular de la esfera a la placa de cultivo (Fig. 8). Estas células, al diferenciarse, pueden dar lugar a una amplia variedad de tipos celulares como por ejemplo células musculares, cardíacas, hepáticas, y epidérmicas (46).

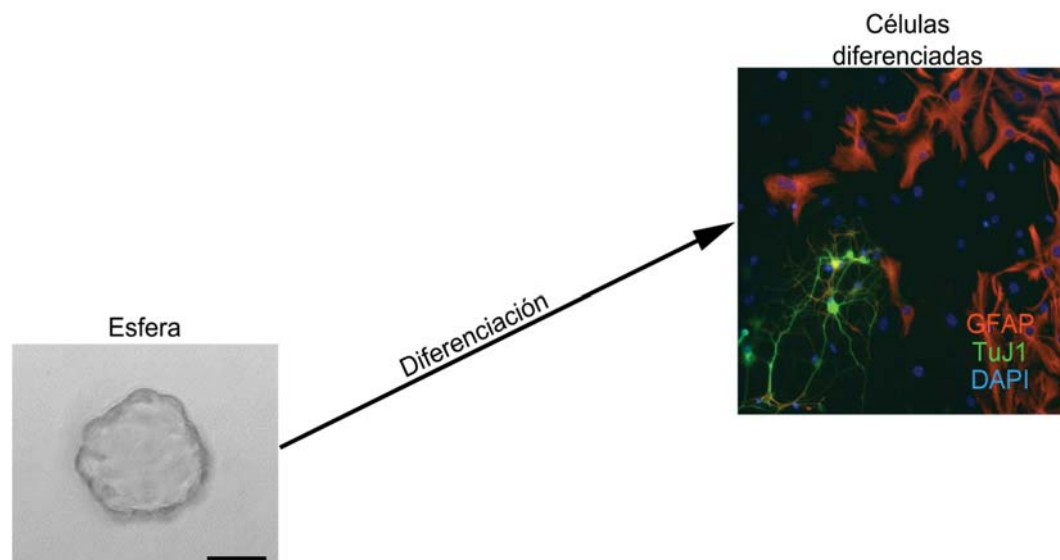


Figura 8. Tras la diferenciación celular de las esferas procedentes del utrículo se pueden obtener diferentes tipos celulares. En la imagen se muestran células gliales con el anticuerpo *GFAP* (rojo), neuronas con el anticuerpo *TuJ* (verde) y los núcleos celulares están marcados con *DAPI* (azul).

Debido a que las neuronas y las células ciliadas de la cóclea normalmente no se regeneran, es necesario el obtener un suministro de células para la reparación coclear. Las células madre pueden ser utilizadas para trasplantes celulares. La posibilidad de que estas células trasplantadas en la cóclea formen nuevas conexiones con las células ciliadas aún no ha sido estudiada. El trasplante de neuronas del ganglio dorsal medular y de células madre en la cóclea ha demostrado la supervivencia neuronal en la cóclea, aunque las prolongaciones de estas células se extendían a otras neuronas y no a las células ciliadas (47, 48).

6. 3. Estudio de la diferenciación de las células madre del oído interno.

Es importante determinar si las células madre siguen el programa de diferenciación llevado a cabo por los progenitores de la placoda ótica en el embrión. Se debe valorar si las células madre se diferencian en neuronas maduras con características electrofisiológicas de neuronas del oído interno. Una vez comprobada esta vía de diferenciación de las células madre se estudiaría su potencial de regeneración celular.

Para ser utilizadas como terapia en el oído interno las células madre deben formar neuronas sensoriales con un fenotipo de neuronas auditivas. Debe corroborarse mediante la expresión de marcadores y la actividad electrofisiológica. Se debe comprobar su respuesta al glutamato, el neurotransmisor que activa las neuronas del oído interno en la sinapsis con las células ciliadas. También se debe estudiar su capacidad para desarrollar potenciales de acción. Finalmente, mediante trasplantes celulares *in Vitro*, debe comprobarse que las neuronas diferenciadas de las células madre forman nuevas conexiones con las células ciliadas denervadas.

Para determinar si las células madre siguen las mismas vías de diferenciación que las llevadas a cabo por las células progenitoras del embrión, se debe comparar la expresión temporal de marcadores en sus programas de diferenciación (Tabla III).

<ul style="list-style-type: none"> • Factores de transcripción - <i>GATA3</i> - <i>Bm3a</i> - Ngn1 - NeuroD - <i>Islet1</i> • Receptores de neurotróficos - TrkB - TrkC 	<p>Tabla III. Marcadores tempranos de neuronas auditivas y vestibulares (49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56).</p>
--	--

Debe observarse si estos marcadores son expresados en las células madre en proceso de diferenciación. Con la utilización de diferentes factores de diferenciación puede comprobarse si se aumenta la expresión de estos marcadores.

En conclusión, una vez conocida la existencia de las células madre en el oído interno, es necesario estudiar su capacidad para formar neuronas sensoriales mediante una vía de diferenciación que se asemeje a la llevada a cabo por los progenitores embrionarios durante el desarrollo del oído interno.

7. Posibilidad del trasplante neuronal en el órgano de Corti.

Ante la falta de regeneración celular en el oído interno de mamíferos un posible tratamiento de la pérdida neuronal consiste en el trasplante de células que puedan suplantar a las células perdidas o que, estas células trasplantadas, secreten factores necesarios para la supervivencia de las células residuales.

Se hace necesario el estudio de trasplantes celulares que formen nuevas prolongaciones y conexiones con las células ciliadas en la cóclea postnatal para determinar si las señales que guían las neuronas hacia las células ciliadas están intactas en la cóclea tras el nacimiento. Para comprobar esto, debe utilizarse un modelo experimental de degeneración neuronal en un explante del órgano de Corti y, seguidamente, aislar y trasplantar las células de un segundo animal en el explante.

El estudio de los trasplantes celulares *in Vitro* en el órgano de Corti debe preceder a su aplicación *in vivo* en vistas de convertirse en un tratamiento futuro de la hipoacusia neurosensorial.

OBJETIVOS

1. Denervación de un explante del órgano de Corti.

Se utilizará una neurotoxina con una acción sobre las neuronas auditivas y que no dañe las células ciliadas.

Este modelo experimental será utilizado para el estudio de posibles tratamientos de la pérdida neuronal en la cóclea.

2. Obtención y caracterización de células madre del oído interno de mamíferos tras el nacimiento.

2.1. Estudio de la proliferación celular de las células madre.

2.2. Estudio de la diferenciación celular de las células madre.

2.3. Estudio de la funcionalidad de las neuronas obtenidas de la diferenciación de las células madre. Se utilizarán técnicas de electrofisiología.

3. Trasplante celular en el explante del órgano de Corti denervado tras la neurotoxina.

Se utilizarán como células donantes:

- Neuronas auditivas.
- Células madre del oído interno.

**MATERIALES Y
MÉTODOS**

Los estudios experimentales se realizaron en el Eaton Peabody Laboratory del Massachusetts Eye and Ear Infirmary de la Universidad de Harvard en Boston. Los estudios de electrofisiología se hicieron en el Glowatzki Laboratory del Johns Hopkins School of Medicine en Baltimore. El análisis y la interpretación de los resultados fueron llevados a cabo en la Unidad de Otología del Hospital Universitario Puerta de Hierro de la Universidad Autónoma de Madrid.

Todo el manejo de los animales se realizó respetando las recomendaciones y normas del National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory of Animals. Se utilizaron los oídos internos de 1 a 4 animales (ratones) por experimento.

El diseño del experimento comprende los siguientes pasos

1. Denervación de un explante del órgano de Corti.

1.1. Cultivo in Vitro del órgano de Corti.

Para realizar estudios de trasplante celular in Vitro se eligió un explante del órgano de Corti como tejido receptor de las células madre del utrículo y se cultivó en una placa de cultivo. Realizamos un cultivo organotípico de dicho órgano con el fin de preservar su estructura y la supervivencia celular bajo condiciones in Vitro.

1.2. Tratamiento del explante del órgano de Corti con β -bungarotoxina.

El explante de órgano de Corti contiene neuronas auditivas y nuestro objetivo consistía en eliminar dichas neuronas sin dañar las células ciliadas. Para ello, el órgano de Corti cultivado in Vitro fue tratado con una neurotoxina de acción presináptica llamada β -bungarotoxina que, a la debida concentración, eliminó las neuronas

auditivas sin dañar las células ciliadas (Heller S, comunicación personal). Conseguimos de esta manera obtener un modelo experimental de denervación celular in Vitro del órgano de Corti para realizar estudios de trasplante celular. Se realizaron un total de 20 experimentos.

2. Obtención y caracterización de células madre del oído interno (Fig. 9).

2.1. Estudio de la proliferación celular de las células madre.

Debido a la capacidad de regeneración celular del epitelio sensorial del utrículo secundaria a diferentes agresiones (39), Li y colaboradores sospecharon y posteriormente comprobaron la existencia de células proliferativas en el utrículo que cumplían las características típicas de las células madre (46). Estas células procedentes del utrículo tenían la capacidad de dividirse por mitosis en un medio de cultivo que estimulara la proliferación celular formando esferas, las cuales, una vez adheridas a la placa de cultivo y en las debidas condiciones podían diferenciarse.

En nuestro experimento realizamos el aislamiento de las células madre procedentes del epitelio utricular y comprobamos su capacidad de proliferación en un medio de cultivo con factores de crecimiento que estimulan la división celular (Fig. 10). Es necesario el asegurarnos de estar utilizando células madre y no otros tipos celulares, Con el fin de utilizar solo células madre proliferativas obtenemos esferas de segunda o tercera generación. Para ello, disociamos química y mecánicamente las esferas de primera generación en células únicas, las cuales, proliferan por mitosis formando esferas de segunda generación (Fig. 11). Se realizaron un total de 7 experimentos para el estudio de la proliferación celular.

2.2. Estudio de la diferenciación celular de las células madre.

Además de su potencial para la proliferación celular, la otra característica que define a las células madre es su capacidad de diferenciación en diferentes estirpes celulares procedentes de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). Se utilizaron células madre de segunda y tercera generación procedente del utrículo para comprobar la facultad de estas células para la diferenciación hacia una estirpe neuronal (ectodermo). Con este fin se utilizaron diferentes factores de diferenciación en el medio de cultivo. Se realizaron un total de 69 experimentos.

2.3. Estudio de la funcionalidad de las neuronas obtenidas de la diferenciación de las células madre mediante electrofisiología.

Las células con morfología neuronal derivadas de la diferenciación de las células madre utriculares fueron estudiadas mediante electrofisiología. Estas células se compararon con neuronas del tejido espiroganglionar mediante el estudio de corrientes iónicas a través de sus membranas con técnicas de Patch-Clamp. De esta manera se comprobó si las células diferenciadas de las células madre cumplían las características funcionales de las neuronas. Se realizaron un total de 39 experimentos.

3. Trasplante celular en el explante del órgano de Corti denervado tras la neurotoxina.

3.1. Trasplante de neuronas auditivas.

Tras realizar el tratamiento del órgano de Corti con la neurotoxina se trasplantaron in Vitro las neuronas auditivas de un animal donante. Se valoraron la supervivencia de las células trasplantadas y el crecimiento de prolongaciones nerviosas hacia las células ciliadas del órgano de Corti. Se realizaron un total de 20

experimentos.

3.2. Trasplante de células madre del oído interno.

De igual manera se trasplantaron in Vitro las células madre procedentes del utrículo (con forma de esferas) y se utilizó un medio de cultivo que favorece la diferenciación celular de estas células en neuronas. Se valoraron la supervivencia de las células madre trasplantadas, su capacidad de diferenciación celular y el crecimiento de prolongaciones nerviosas hacia las células ciliadas del órgano de Corti. Se realizaron un total de 12 experimentos.

4. Inmunohistoquímica.

Mediante técnicas de inmunomarcado con anticuerpos conjugados o no, se evaluaron los resultados en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular con un microscopio de fluorescencia. Se realizaron recuentos celulares utilizando DAPI (marcador nuclear) como valor de referencia.

5. Aislamiento del ARN y PCR con transcriptasa inversa.

Se aisló el ARN celular para el estudio de la diferenciación de las células madre procedentes del oído interno (utrículo).

1. Denervación de un explante del órgano de Corti.

1.1. Cultivo *in Vitro* del órgano de Corti.

Se realiza la disección de las cócleas de ratones C57BL/6 o de ratones transgénicos *Atoh1-nGFP* de 1 a 3 días tras el nacimiento realizándose un cultivo organotípico de los explantes de órgano de Corti. Para la disección y obtención de dichos órganos utilizamos los métodos descritos previamente en la literatura (57) con alguna modificación. Se utilizaron de 4 a 5 explantes en cada condición.

La cabeza del animal se cortó en dos mitades mediante un corte sagital con unas tijeras de microcirugía y las cócleas se extrajeron y sumergieron en una solución a 4° C de “Hank’s Balance Salt Solution” (HBSS). La cóclea fue disecada utilizando condiciones estériles con un microscopio de disección Zeiss Stemi 2000. El órgano de Corti y el tejido espiroganglionar se liberaron de la cápsula ótica, separándose de la estría vascular y el ligamento espiral mediante el uso de pinzas de microcirugía. El órgano de Corti se transfirió a una placa de cultivo (4-well dish, Greiner Labortechnik) utilizando una micropipeta con una pequeña cantidad de HBSS. La placa de cultivo había sido tratada con poliornitina y con fibronectina (BD Bioscience) para favorecer la adhesión del órgano de Corti. El explante se orientó de tal manera que la superficie apical de las células ciliadas estuviera en la parte superior del espécimen y la membrana basilar se dirigiera hacia la placa de cultivo. El medio de cultivo sobrante se absorbió con una pipeta y el cultivo organotípico se introdujo en un incubador celular a 37°C con 5% de CO₂ durante

12-24 horas en un volumen mínimo de HBSS para conseguir que el explante contactara plenamente con la placa de cultivo. Una vez comprobada la adhesión del órgano de Corti se añadió medio de cultivo utilizado para el órgano de Corti formado por Dulbecco's Modified Eagle's medium con glucosa (DMEM) suplementado con F12 (1:1), N2, B27 (Invitrogen) y ampicilina (50µg/ml). El explante se introdujo nuevamente en un incubador celular a 37°C con 5% de CO₂ y los cultivos se mantuvieron hasta un periodo máximo de 2 semanas con cambios del 80% del medio de cultivo cada dos días. Para el estudio del trasplante celular utilizamos explantes de órganos de Corti como órgano receptor.

1.2. Tratamiento del explante del órgano de Corti con β -bungarotoxina.

El explante del órgano de Corti contiene neuronas auditivas y nuestro objetivo consistía en eliminar dichas neuronas sin dañar las células ciliadas. De esta manera, obteníamos un modelo experimental de explante de órgano de Corti denervado con la conservación de los demás tipos celulares. Éste explante podría ser utilizado posteriormente en nuestros estudios de trasplantes celulares.

Para la eliminación selectiva de las neuronas auditivas del órgano de Corti el medio utilizado para el cultivo del órgano de Corti (DMEM con glucosa y F12 (1:1) con N2 y B27) se suplementó con una neurotoxina llamada β -bungarotoxina (Biotium, Inc.) a una concentración de 0.01nM a 2µM durante 24 horas en un incubador celular a 37° C (Heller S, comunicación personal). Tras el tratamiento con la neurotoxina el cultivo organotípico se lavó 5 veces con medio fresco durante 10 minutos cada vez. Posteriormente se fijó

y examinó mediante inmunohistoquímica. La cuantificación de las células ciliadas externas, las células ciliadas internas y las neuronas del ganglio espiral de cuatro órganos de Corti divididos en segmentos de 100µm se realizó con el programa de software Axiovision 4.3 y los resultados se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) con un grado de significación estadístico de $p < 0.01$.

1.2.1. Unión de la β -bungarotoxina a las células del órgano de Corti. Para comprobar la especificidad de la unión de la β -bungarotoxina a las neuronas del órgano de Corti, se utilizó un marcador llamado tetrametilrodamina-5-6-isotiocianato (TRITC; Sigma) que se unió a la toxina en un dializador para posteriormente ser aplicada al órgano de Corti (Edge A, comunicación personal). De este modo, se realizó una dilución de la β -bungarotoxina (1 mg) en 200µl de tampón de conjugación (100mM tampón de carbonato/bicarbonato, pH9) y la toxina se mezcló con 35µl de TRITC en dimetilsulfóxido en un tubo de Eppendorf de 1.5ml protegido de la luz. Tras esperar 2 horas a temperatura ambiente, el exceso o la parte hidrolizada del marcador TRITC se extrajo durante una noche utilizando un dializador en una cámara especial de diálisis (Slide-A-Lyzer dialysis cassette, Pierce). Diluciones de 200 a 10000 de una solución de 212.7µM de β -bungarotoxina marcada con TRITC se añadieron al órgano de Corti procedente de ratones transgénicos *Math1-nGFP* (P0-P2). Realizamos estudios de la unión de la β -bungarotoxina marcada con TRITC a intervalos de 5 minutos a 2 horas. Los cultivos órgano-típicos se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a 4°C. Tras ser lavado nuevamente con PBS, se examinaron los órganos de Corti en un microscopio de fluorescencia.

1.2.2. Estudio de la muerte celular por apoptosis (estudio

TUNEL) en explantes de órgano de Corti. Para comprobar la muerte celular por apoptosis de las neuronas auditivas tras la aplicación de la β -bungarotoxina se estudiaron las roturas de las hélices del ADN en las células del órgano de Corti mediante una reacción de TUNEL (Edge A, comunicación personal). Así, se aplicaron 0.5 μ M de β -bungarotoxina en un órgano de Corti de ratones C57BL/6 recién nacidos (P0) durante 24 horas. El tejido se lavó con PBS y se fijó con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos. Las roturas de las hélices del ADN se marcaron con “transferasa terminal desoxinucleotídica” (TUNEL label mix, Roche Molecular Biochemicals). Tras dos lavados con PBS, se añadieron al tejido 50 μ l de la mezcla de reacción TUNEL. Se realizaron controles negativos añadiendo 50 μ l de la solución de marcado (sin la enzima transferasa terminal) y mediante la mezcla de la reacción TUNEL en órganos de Corti sin tratamiento con la neurotoxina. Los órganos de Corti se introdujeron en un incubador celular a 37°C durante 60 minutos, la reacción se detuvo con lavados con PBS y los resultados se analizaron mediante un microscopio de fluorescencia.

2. Obtención y caracterización de células madre del oído interno.

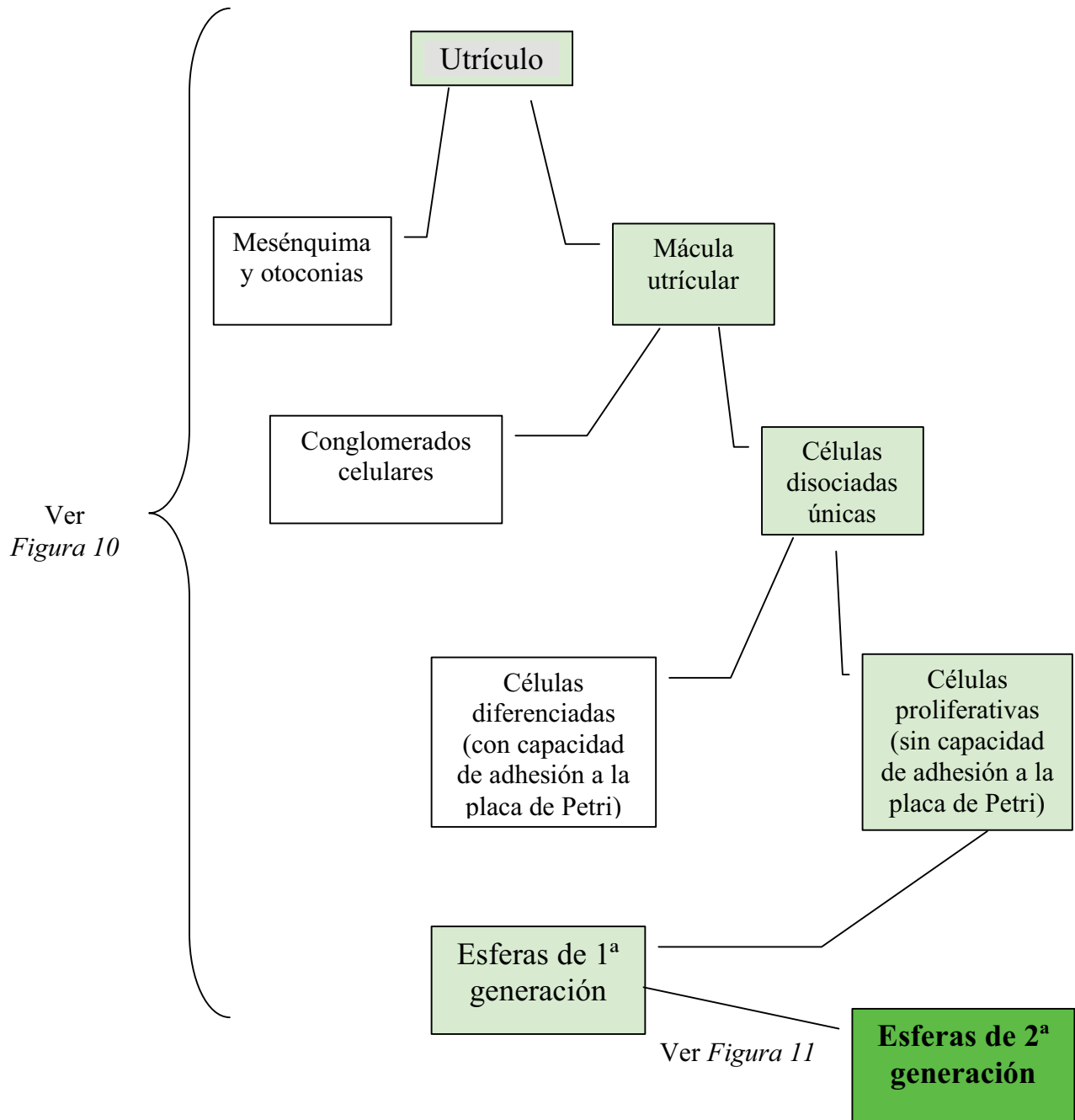


Figura 9. Las esferas de segunda generación procedentes del oído interno (utrículo) son las células utilizadas en nuestros experimentos de proliferación, diferenciación y trasplante celular. Se consideran células madre al poseer la capacidad de proliferar flotando en una placa de Petri en un medio de cultivo y la capacidad de diferenciarse en células de las tres estirpes embrionarias

(ectodermo, mesodermo y endodermo) si se estimula su adhesión a una placa de cultivo en un medio de diferenciación celular.

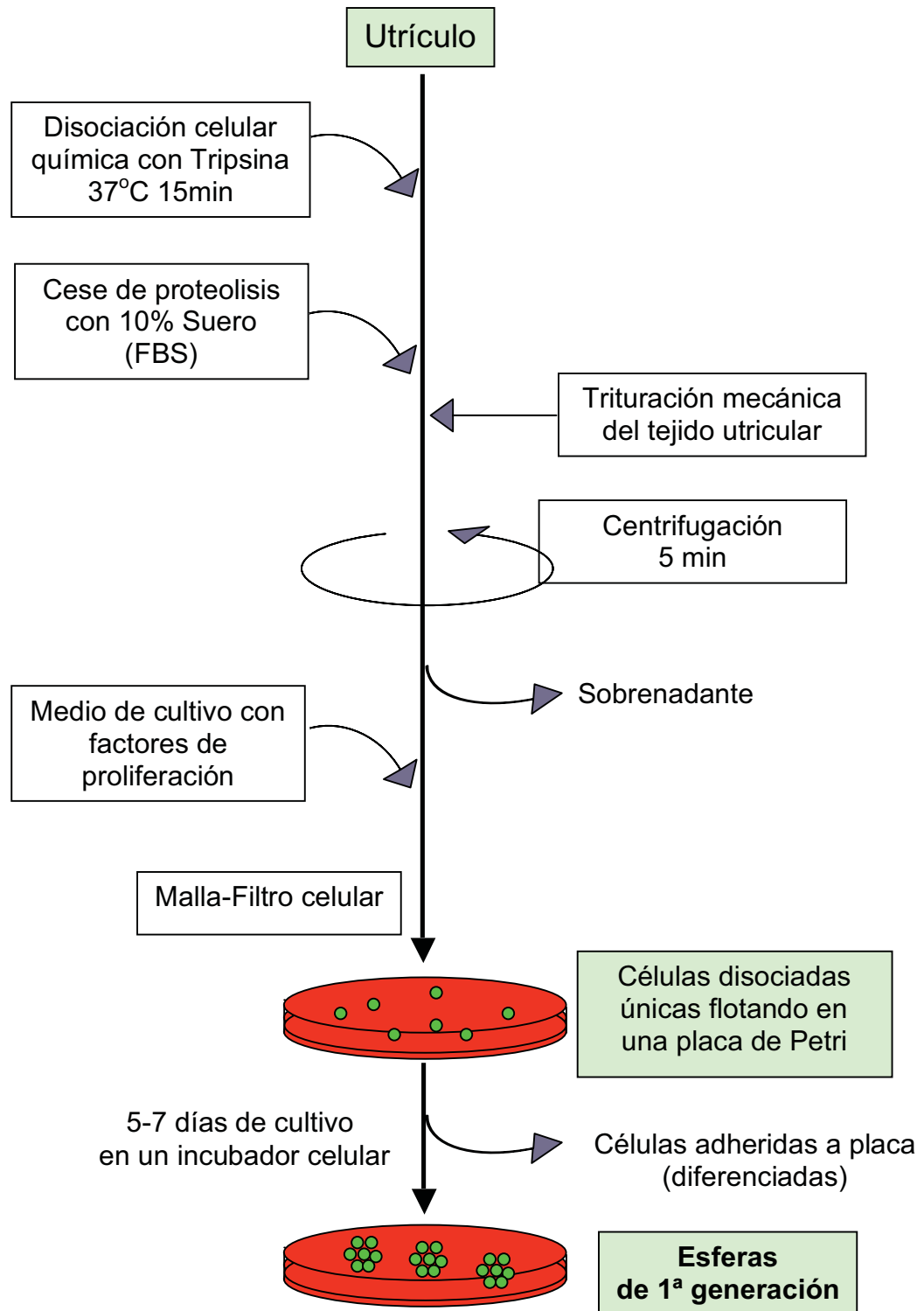


Figura 10. Método utilizado para la disociación celular del utrículo y la obtención de esferas. Las células disociadas son cultivadas en un incubador celular a 37°C con 5% de CO₂ en una placa de Petri (evita la adhesión de las células proliferativas). Estas células al multiplicarse por mitosis forman esferas

que se definen como conglomerados celulares procedentes de células únicas que flotan en el medio de cultivo.

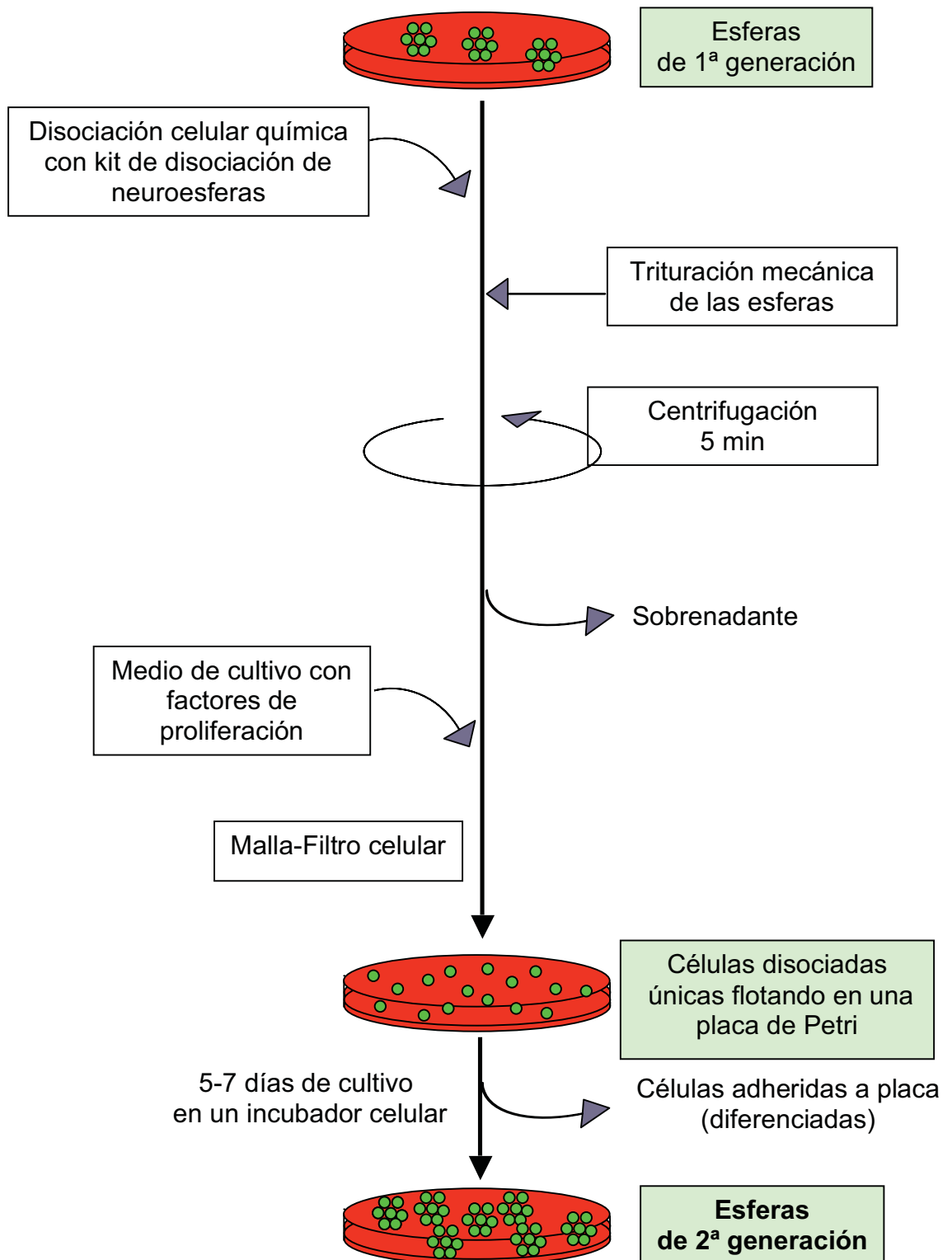


Figura 11. Método utilizado para la propagación de las esferas. Tras la disociación de las esferas de 1ª generación las células aisladas se multiplicaron por mitosis y volvieron a formar esferas (2ª generación). Las esferas representan

clones de células utriculares individuales.

2.1. Estudio de la proliferación celular de las células madre

Se han realizado un total de 70 experimentos al objeto de aislar las células madre procedentes del epitelio utricular. En cada experimento, se realiza la disección de 4 a 10 máculas utriculares procedentes de ratones tipo C57BL/6 o de ratones transgénicos *Math1-nGFP*. Estos últimos expresan una proteína de fluorescencia verde en las células ciliadas bajo el control del amplificador (enhancer) Math1 que facilita su detección en un microscopio de fluorescencia. Se han realizado un total de 70 experimentos aproximadamente al objeto de aislar las células madre procedentes del epitelio utricular. En la disección de los oídos internos se utiliza como medio “Hank’s Balanced Salt Solution” (HBSS) a 4°C. Una vez diseccionado el utrículo, se separa el epitelio sensorial del tejido subepitelial y de la capa de otoconias mediante el uso de pinzas de microcirugía. Para obtener células únicas procedentes del epitelio utricular las células se disocian utilizando tripsina al 0,25% como agente proteolítico, durante 15-20 minutos en “Phosphate Buffer Saline” (PBS) a 37°C en un incubador celular. La digestión enzimática es detenida mediante el uso de suero fetal bovino (FBS) al 10% en “Dulbeco’s Modified Eagle Medium” con glucosa (DMEM-high glucose). Una vez finalizada la disociación química el tejido es lavado en dos ocasiones y triturado mecánicamente de forma suave con una micropipeta regulada a 100µl. La disociación mecánica es realizada suavemente y con dicha regulación en la micropipeta para evitar la rotura de la membrana plasmática celular. Las células disociadas resultantes del epitelio utricular se diluyen en un medio de

cultivo para promover la proliferación celular formado por DMEM-high glucosa con F12 (mezclado 1:1) y suplementado con N2, B27 (Invitrogen), factor de crecimiento epidérmico (EGF) 20ng/ml, factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) 10ng/ml, factor de crecimiento insulínico (IGF) 50ng/ml, y sulfato de heparina 50ng/ml (Sigma).

Medio de cultivo para la proliferación celular

<i>Medio de cultivo</i>	<i>Suplementos</i>	<i>Factores de proliferación</i>	<i>Antibiótico</i>
DMEM-glucosa	F12, N2, B27, Sulfato de heparina	EGF, bFGF, IGF	Ampicilina

La suspensión celular se filtra a través de una malla con un poro de 70 μm de diámetro, (“cell strainer”, BD Labware) para extraer agregados celulares y conseguir células aisladas únicas.

Para conseguir la proliferación celular con la consiguiente formación de esferas se cultivan las células disociadas del epitelio utricular en placas de Petri (Greiner) que evitan la adhesión celular en un incubador celular a 37°C con 5% de CO₂ durante 5-7 días (Fig. 10). Para obtener segunda, tercera y demás generaciones celulares, se recogen con una pipeta 50-100 esferas y se disocian para conseguir células únicas utilizando un medio de disociación celular llamado “NeuroCult chemical dissociation kit” (StemCell Technologies). Se cultiva la nueva suspensión celular en placas de Petri en un incubador celular a 37°C con 5% de CO₂ y se repite la propagación durante 5-7 días. La formación de esferas secundarias o terciarias siempre ocurrió en un plazo de 5 a 7 días tras el inicio del cultivo de células únicas (Fig. 11). Las esferas utilizadas en este experimento proceden todas de la segunda o tercera generación, lo que permite asegurar la

utilización para nuestro experimento de células con un origen proliferativo. Como método de confirmación se realiza inmunohistoquímica y las células proliferativas se marcan utilizando 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Bromodesoxiuridina (BrdU) en incubación durante el periodo de la formación de las esferas.

2.2. Estudio de la diferenciación celular de las células madre.

Las esferas de segunda o tercera generación se transfirieron a placas de cultivo (“4 well plates Greiner”) tratadas con poliornitina y laminina que permiten la adhesión celular. Además se favorece la adhesión durante aproximadamente 10 horas con 10% FBS en DMEM-glucosa. Después de comprobar la adhesión celular completa mediante microscopio óptico, el medio es reemplazado por un medio de cultivo que induce la diferenciación celular compuesto por DMEM con glucosa y F12 (mezclado 1:1) con N2, B27 (Invitrogen), neurotrofina 3 (NT3) (50ng/ml), “brain derived neurotrophin” BDNF (100 ng/ml) y ampicilina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las células se trataron con factores de diferenciación como el ácido retinoico 1 μM (AR), noggin 0,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o sonic hedgehog (Shh) 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante dos días y posteriormente se cultivaron durante el periodo indicado de tiempo, reemplazando el 80% del medio de cultivo cada dos días.

Medio de cultivo para la diferenciación celular

	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Suplementos</i>	<i>Factores de diferenciación</i>	<i>Neurotrofinas</i>	<i>Antibiótico</i>
1.	DMEM-glucosa	F12, N2, B27	Ácido retinoico (AR) 1µM	BDNF, NT3	Ampicilina
2.	DMEM-glucosa	F12, N2, B27	Noggin 0.75µg/ml	BDNF, NT3	Ampicilina
3.	DMEM-glucosa	F12, N2, B27	Sonic hedgehog (Shh) 3µg/ml	BDNF, NT3	Ampicilina

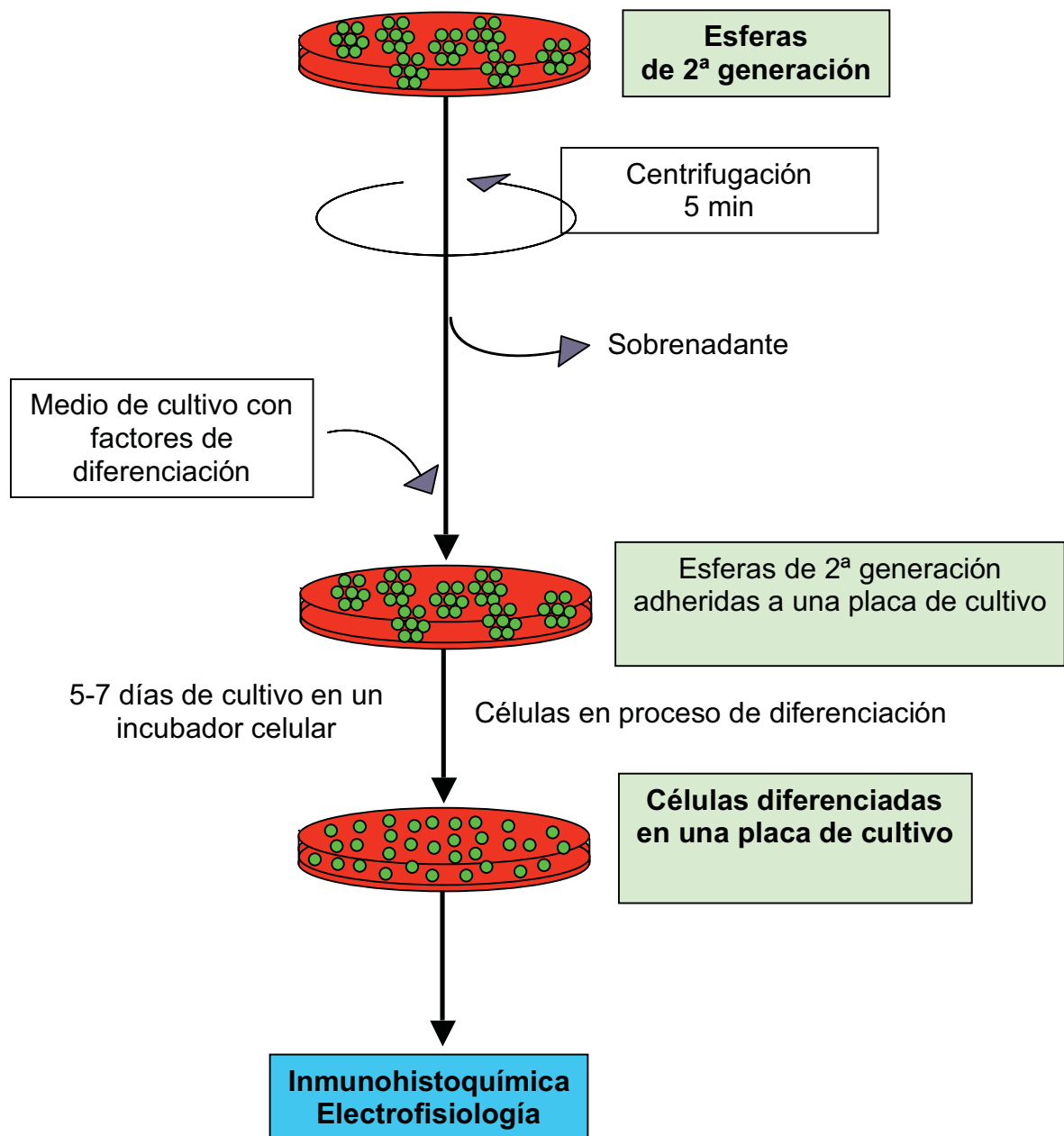


Figura 12. Método utilizado para la diferenciación celular de las esferas procedentes del epitelio utricular. La adhesión celular en una placa de cultivo junto a los factores de diferenciación añadidos al medio estimula la diferenciación de las células madre. Se utilizaron ácido retinoico, noggin y sonic hedgehog como diferentes factores de diferenciación.

Factores de diferenciación

Ácido Retinoico	Factor de diferenciación celular que estimula la formación de neuronas procedentes de células madre embrionarias.
Noggin	Inhibidor de “Bone Morphogenic Proteins” (BMPs), que induce la creación de células en el desarrollo que favorecen la neurogénesis.
Sonic hedgehog	Factor peptídico de señalización celular con acción en el desarrollo embrionario morfológico de diversos tejidos incluyendo el nodo de Hensen, la notocorda y el tubo neural.

Las células diferenciadas procedentes de las células proliferativas del epitelio utricular se analizaron mediante aislamiento de ARN seguida de PCR con transcriptasa inversa o mediante técnicas de inmunohistoquímica. La cuantificación de las células diferenciadas en neuronas, células gliales o células ciliadas se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia dotado del programa Axiovision 4.3 software. El resultado se sometió a un análisis de la varianza (ANOVA) con un grado de significación estadística de $p < 0,01$.

2.3. Estudio de la funcionalidad de las neuronas obtenidas de la diferenciación de las células madre mediante electrofisiología.

Una vez obtenidas las neuronas procedentes de la diferenciación de las células madre utriculares se nos planteó la incógnita de si estas neuronas compartían características funcionales con neuronas

auditivas adultas. Para ello realizamos estudios de electrofisiología de ambos grupos celulares (neuronas diferenciadas de células madre y neuronas maduras disecadas del modiollo coclear y comparamos sus corrientes iónicas a través de sus membranas con la técnica de “Patch-Clamp”. De esta manera, podríamos asegurar que las neuronas diferenciadas de las células madre eran activas desde el punto de vista funcional.

Para los experimentos de electrofisiología las células madre se transfirieron al cubreportas recubiertos de poliornitina y laminina; una vez adheridas al cubre se diferenciaron con la aplicación de ácido retinoico al medio de cultivo durante 3-4 días (la misma concentración e ingredientes que en los experimentos anteriores, ver material y métodos apartado 2) y cultivados durante 1-6 días más sin ácido retinoico hasta las electrograbaciones. El cultivo celular se realizó en un incubador celular a 37°C.

Con el fin de realizar estudios comparativos, las neuronas del tejido espiroganglionar procedentes de ratones C57BL/6 recién nacidos de 1-3 días se aislaron y cultivaron. Las neuronas se disociaron utilizando tripsina (0,25%, 20-30 min., 37°C), se redispersaron en 10% FBS en DMEM-alta glucosa, una vez transferidas a cubreportas cubiertos de poliornitina-laminina se permitió la adhesión durante una noche. El medio se reemplazó con DMEM-alta glucosa sin suero y con F12 (mezclado 1:1) conteniendo N2, B27 (Invitrogen), NT-3 (50 ng/ml) y BDNF (100 ng/ml). Las células se cultivaron durante 3-5 días reemplazando el 80% del medio de cultivo diariamente. Para realizar las grabaciones de las corrientes iónicas a través de la membrana plasmática celular los cubreportas con las células diferenciadas procedentes de las células madre utriculares o las neuronas espiroganglionares se trasladaron a una

cámara de electrograbación montada en un microscopio de luz directa (upright microscope, Axioskop2 FS plus, Zeiss, Oberkochen, Germany). Las células fueron lavadas continuamente con (en mM); KCl 5,8; NaCl 144, MgCl₂ 0,9; CaCl₂ 1,5; NaH₂PO₄ 0,7; HEPES 10; glucosa 5,6 (ph 7,4; NaOH 300 mOsm) a 2-3 ml/minuto. Posteriormente las células se visualizaron a través de un objetivo de inmersión en agua de magnificación de 4x y de 40x utilizando luz verde, óptica DIC y una cámara Newvicon (Dage, MTI, Michigan City, IN). Las pipetas utilizadas para la grabación fueron fabricadas en cristal de borosilicato de 1mm (B100F, WPI, Sarasota, FL), cubiertas con Sylgard® (Dow Corning, Midland, MI), y con una punta con resistencias de 3-5 MΩ. La solución interna contenía (mM) KCl 135; MgCl₂ 3,5; CaCl₂ 0,1; EGTA 5, HEPES 5, ATP-Na₂ 2,5 (ph 7,3; KOH 290 mOsm). En algunos experimentos, la composición de las soluciones internas se modificó a (mM); KCl 131, MgCl₂ 3,5, CaCl₂ 0,1, EGTA 5, HEPES 5, ATP-Na₂ 5, fosfocreatina sódica 10 (ph 7,3, KOH, 295 mOsm). El potencial del líquido de unión (-4 mV para ambas soluciones internas) se corrigió “off-line” (fuera del campo de la grabación). Con el fin de poder identificar las células grabadas se añadió 50 nM Alexa Fluor® 568 de hidracida sódica (Molecular Probes, Eugene, OR) a la solución interna, lo que permitió observar dichas células tras la grabación en un microscopio de fluorescencia óptica. Para comprobar que las corrientes iónicas correspondían a canales de sodio dependientes del voltaje se aplicó tetrodotoxina (TTX) al flujo de pipeta. Esta neurotoxina es un bloqueador reversible de estos canales. Así, tetrodotoxina (TTX) (Alomone Labs, Jerusalén, Israel) y 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona disodio sal (CNQX) (Tocris, Ellisville, MO) se diluyeron diariamente de muestras congeladas y se aplicaron con un flujo de pipeta por

gravedad (100 μm de diámetro) cerca de las células, conectándose a un controlador de válvula de 6 canales (Warner, Hamden, CT). Los demás productos químicos se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO). Las grabaciones mediante bloqueo del voltaje y de la corriente se realizaron con un “Multiclamp 700A de amplificación y un CV-7B de plataforma (Axon Instruments, Foster City, CA), digitalizado a 10-50 kHz, y con un filtro a 2-10 kHz. Las resistencias en serie fueron de alrededor de 20 M Ω . Durante la neutralización de la capacitancia de la pipeta en el bloqueo de la corriente el balance se utilizó para compensar errores de la capacitancia de la pipeta y de la resistencia de la punta. El análisis de los resultados se realizó posteriormente utilizando como programa informático “pClamp 9 software package” (Axon Instruments) y “Origin 7.5” (OriginLab, Northampton, MA). El grado de significación estadística se comprobó utilizando el programa “SigmaStat 3.1” (Systat, Point Richmond, CA). Los valores son presentados como media \pm desviación standard (ds).

3. Trasplante celular en el explante del órgano de Corti denervado tras la neurotoxina.

3.1. Trasplante de neuronas auditivas (Fig. 13).

Las neuronas procedentes del tejido espiroganglionar procedían de 4-5 órganos de Corti de ratones C57/BL6 o de ratones transgénicos *Thy1-CFP* en los cuales el gen *CFP* (cyan fluorescence protein) se encuentra bajo el control de la expresión del gen de

regulación *thy1* (58) lo que produce una expresión de la proteína CFP en las neuronas. El tejido espiroganglionar fue utilizado directamente para el cocultivo con el explante de órgano de Corti o, en otras ocasiones, se realizó una disociación del tejido para obtener células únicas. Para conseguir dicha disociación se utilizó tripsina durante 20 minutos en un incubador celular a 37°C (25 µl/cóclea). La tripsinización se detuvo con suero al 10% (FBS) en DMEM/F12 (50µl/cóclea), posteriormente se realizó la trituración mecánica con una micropipeta P200 fijada a 75µl. Se añadieron DMEM/F12 (1:1) suplementado con N2, B27 y ampicilina a la suspensión celular y se centrifugó a 800rpm durante 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se añadió 100µl de medio con NT3 (50µg/ml) y BDNF (100µg/ml) (ambos de Chemicon) a las células. Estas células (donantes) se añadieron a los explantes de órganos de Corti denervados (receptor) y se introdujeron durante 2 días en un incubador celular a 37°C. Se realizaron estudios de inmunohistoquímica para comprobar la supervivencia neuronal y el crecimiento de prolongaciones nerviosas hacia las células ciliadas.

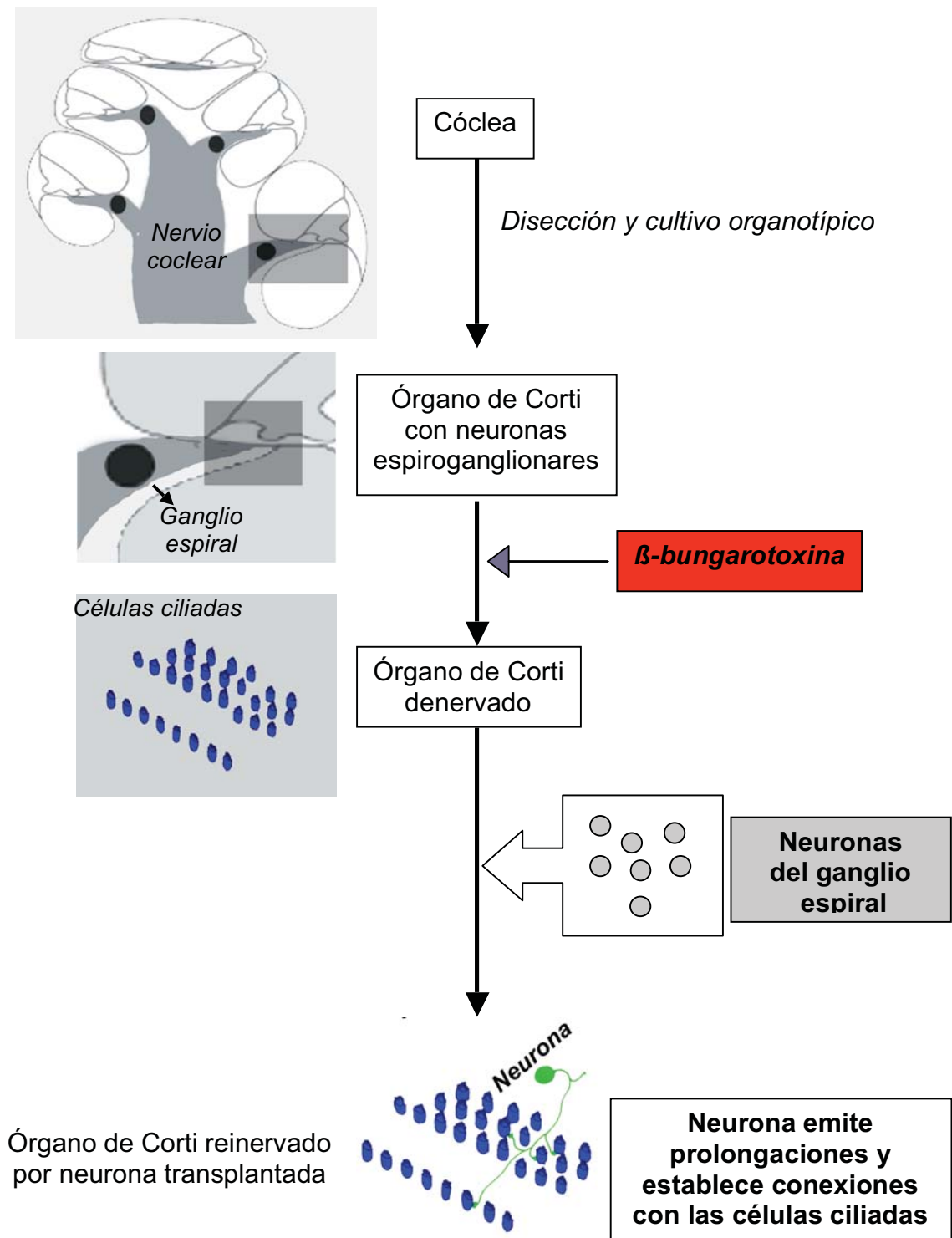


Figura 13. La disección del órgano de Corti del animal receptor es seguida del trasplante *in Vitro* con las neuronas auditivas del animal donante.

3.2. Trasplante de células madre del oído interno.

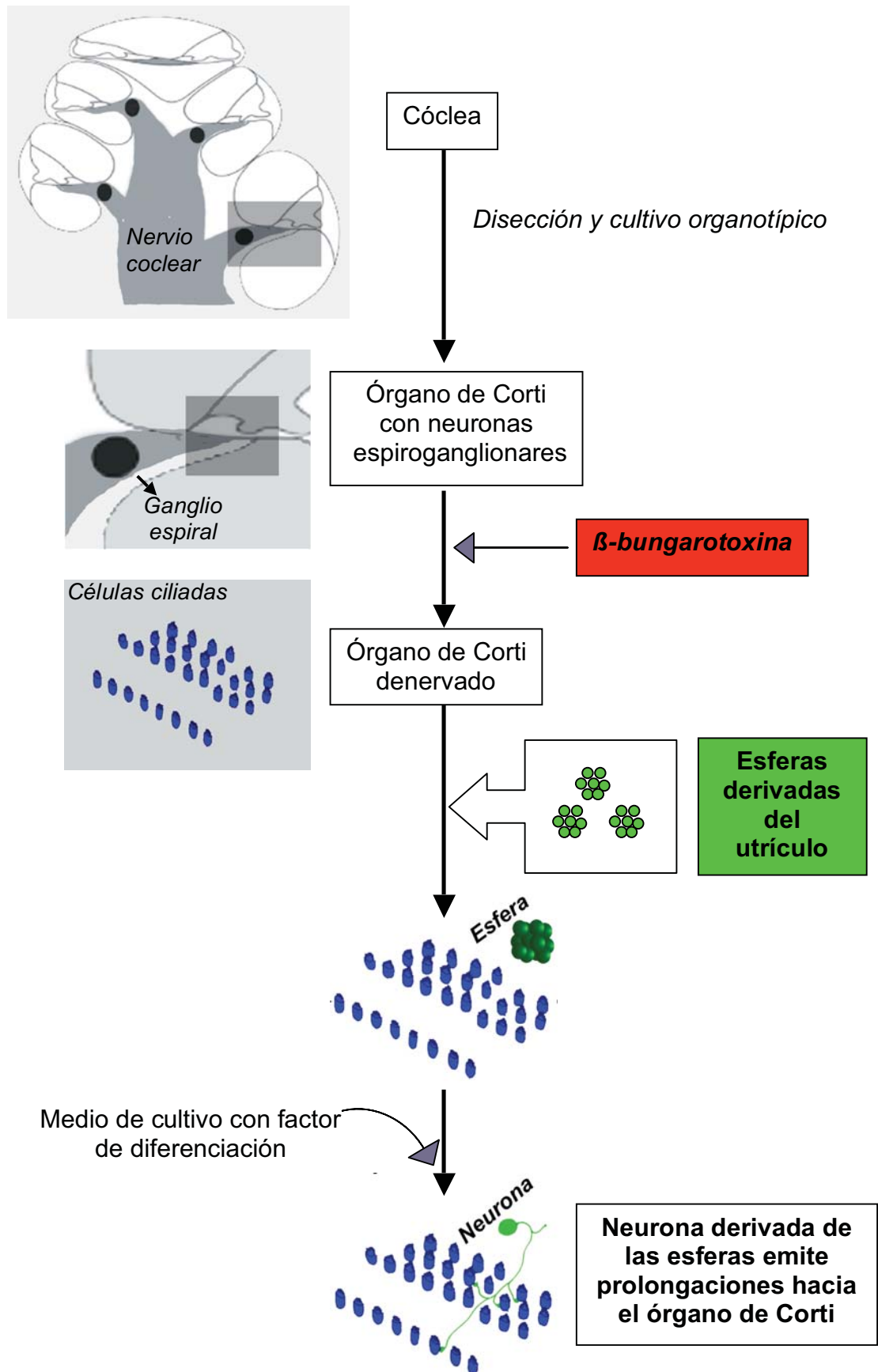


Figura 14. Las esferas con las células madre se transplantan en el órgano de Corti denervado tras la β -bungarotoxina y se estudia su diferenciación celular y la formación de prolongaciones nerviosas.

Para realizar el trasplante celular *in Vitro* sobre el explante de órgano de Corti aproximadamente 100 esferas (ver 1. Materiales y métodos) procedentes de células madre proliferativas aisladas del utrículo de ratones C57/BL6, de ratones transgénicos β -actin-GFP o Thy1-CFP (donantes), se cultivaron junto a los explantes de órgano de Corti (recipiente) en un medio de cultivo formado por 100 μ l de DMEM con glucosa y F12 (1:1) con N2, B27 (Invitrogen), NT3 (50ng/ml) y BDNF (100ng/ml) en una placa de cultivo (4 well plate) introduciéndose en un incubador celular a 37^o C. Los ratones transgénicos β -actin-GFP expresan una proteína de color verde en todas sus células mientras que los ratones transgénicos Thy1-CFP expresan una proteína de color naranja en las neuronas lo que hace fácil la detección de las células (en el primer caso) o de las neuronas (en el segundo caso) procedentes de estos ratones en estudios de trasplantes celulares. Se añadieron 1 μ M de ácido retinoico (AR) como factor de diferenciación durante un plazo de 2 días y la duración total del cultivo celular fue de 6-10 días. Tras finalizar el cultivo se estudió la diferenciación celular de las esferas en neuronas y el crecimiento de prolongaciones nerviosas de las células donantes hacia las células ciliadas del órgano de Corti mediante inmunohistoquímica.

4. Inmunohistoquímica.

Las células y los órganos de Corti se fijaron utilizando paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras realizar 3 lavados con PBS de 5 minutos se realizó la permeabilización de los tejidos y el bloqueo de los lugares no específicos de unión de los anticuerpos con una solución de PBT1 (0,1% Triton X-100, 1% BSA y 5% de suero de cabra inactivado con calor en PBS) durante 20 minutos. Una vez fijado, bloqueado y permeabilizado el tejido se incubó a 4° C por la noche con anticuerpos primarios en PBT1. La dilución usada fue de 1:1000 para el anticuerpo policlonal derivado del conejo para la miosina VIIa (Proteus

Bioscience), 1:500 anticuerpo policlonal derivado del conejo para Musashi-1 (cortesía del Dr. H. Okano, Keio University), 1:500

Anticuerpos monoclonales derivados del ratón.	β -III tubulina (TuJ), BromodesoxiUridina (BrdU), Nestina, Tirosina hidroxilasa, 81.5C10 (HB9)
Anticuerpos policlonales derivados del conejo	Miosina VIIa, Musashi-1, periferina, GFAP (Glial Fibrilar Acidic Protein), Sinapsina, Colina acetiltransferasa, GluR2/R3, serotonina, Glutamato, Brn-3a, TrkB
Anticuerpos policlonales derivados del pollo	β III-tubulina (TuJ)
Anticuerpos policlonales derivados de la cabra	NeuroD, TrkC, Calretinina

anticuerpo policlonal derivado del conejo para GFAP (Glial Fibrillar Acidic Protein) (Dako), 1:500 para anticuerpo monoclonal derivado del ratón contra la β -III tubulina (TuJ, MMS-435P; Covance), 1:200 anticuerpo policlonal derivado del pollo para la β -III tubulina (TuJ, Neuromics), 1:500 anticuerpo policlonal derivado del conejo para la sinapsina (Chemicon), 1:500 para anticuerpo monoclonal derivado del ratón contra la Bromodesoxiuridina (Sigma), 1:500 para anticuerpo monoclonal derivado del ratón contra la nestina (Developmental Studies Hybridoma Bank), 1:2000 anticuerpo policlonal derivado del conejo para la colina acetiltransferasa (Abcam), 1:500 para anticuerpo monoclonal derivado del ratón contra la tirosina hidroxilasa (Sigma), 1:500 para anticuerpo monoclonal derivado del ratón contra la 81.5C10 (HB9, Developmental Studies Hybridoma Bank), 1:500 anticuerpo policlonal derivado del conejo para Brn-3a (Sigma), 1:200 anticuerpo policlonal derivado de la cabra para NeuroD (Santa Cruz Biotechnology), 1:500 anticuerpo policlonal derivado de la cabra para TrkC, 1:2000 anticuerpo policlonal derivado del conejo para TrkB (Chemicon), 1:500 anticuerpo policlonal derivado del conejo para el glutamato (Sigma), 1:2000 anticuerpo policlonal derivado de la cabra para calretinina (Chemicon), 1:500 anticuerpo policlonal derivado del conejo para GluR2/R3 (Chemicon), 1:2000 anticuerpo policlonal derivado del conejo para serotonina (5-hydroxytryptamine), 1:500 anticuerpo policlonal *Pax2* (Covance), *Islet1*, 1:500 anticuerpo policlonal derivado del conejo para la periferina (Chemicon).

Los anticuerpos secundarios conjugados Cy5-, TRITC- y FITC- (Jackson ImmunoResearch) se utilizaron para unirse y detectar los anticuerpos primarios. Los núcleos celulares se marcaron con la exposición a 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) con Vecta-shield

(Vector Laboratories). El inmunomarcado se visualizó con microscopio de fluorescencia (Axioskop 2 Mot Axiocam, Zeiss) o microscopio confocal (TCD, Leica).

Especificidad de los anticuerpos

Marcador de proliferación celular	Bromodesoxiuridina (BrdU), análogo de la timidina que se incorpora en el ADN en las células mitóticamente activas.
Marcadores de desarrollo del oído interno	<i>Pax2</i> , factor de transcripción de placodas sensoriales, marcador de la vesícula ótica. <i>Islet1</i> , marcador del epitelio sensorial en el oído interno y de los progenitores neuronales auditivos y vestibulares.
Marcador de desarrollo neuronal	Nestina, proteína de filamento intermedio expresada en los progenitores neuronales del sistema nervioso central y periférico. <i>Bm3a</i> , factor de transcripción expresado en progenitores neuronales de la estirpe sensorial. Periferina, expresado en neuronas sensoriales, motoneuronas y en neuronas auditivas tipo II. Calretinina, expresado en

	<p>neuronas sensoriales.</p> <p>Musashi1, proteína de unión al ARN asociada con división celular asimétrica.</p> <p>NeuroD, factor de transcripción expresado en la fase terminal de diferenciación neuronal del sistema nervioso central y periférico, se considera un marcador de estirpe sensorial.</p>
<p>Marcadores neuronales</p>	<p>β-III tubulina (TuJ), componente del citoesqueleto neuronal que se polimeriza para formar un microtúbulo.</p> <p>TrkB, TrkC, receptores de membrana de BDNF y de NT3 respectivamente. La coexpresión de estos dos marcadores es típica de las neuronas auditivas.</p> <p>GluR2/R3, receptor del neurotransmisor glutamato.</p> <p>Glutamato, se especula que es el neurotransmisor utilizado por las células ciliadas.</p> <p>Tirosina hidroxilasa (TH), cataliza la hidroxilación de L-tirosina a L-dopa para la biosíntesis de catecolaminas, marcador de</p>

	<p>neuronas catecolaminérgicas (dopamina, norepinefrina y epinefrina).</p> <p>Colina acetiltransferasa (ChAT), enzima que cataliza la síntesis de acetilcolina, marcador de neuronas colinérgicas.</p> <p>5-hidroxitriptamina (5HT), neurotransmisor inhibidor y hormona del sistema nervioso central y periférico, marcador de neuronas seritoninérgicas.</p> <p>HB9 (marcador de motoneuronas).</p>
Marcadores de sinapsis	<p>Sinapsina, proteína de membrana de vesícula sináptica.</p> <p>SV2, proteína de membrana de vesícula sináptica.</p>
Marcadores de células ciliadas del oído interno	<p><i>Math1</i>, factor de transcripción necesario para la formación de células ciliadas.</p> <p>MiosinaVIIa, proteína estructural de las células ciliadas.</p> <p>PV3, proteína receptora de calcio en las células ciliadas.</p> <p>Brn3.1, factor de transcripción para la formación de células ciliadas.</p>

	Espin, proteína de unión a la actina en las células ciliadas.
Marcador de células gliales	GFAP (Glial Fibrilar Acidic Protein), filamento intermedio de los astrocitos.

5. Aislamiento del ARN y PCR con transcriptasa inversa.

El ARN se aisló de las esferas procedentes del utrículo y de las esferas diferenciadas, utilizando “RNeasy Mini Kits” (Qiagen) y la enzima transcriptasa inversa en ADNc con “Superscript III” (Invitrogen). El análisis de PCR se realizó utilizando ADNc como molde con los siguientes oligonucleótidos en reacciones PCR (59):

Gliceraldehido3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) sense,
AACGGGAAGCCCATCACCATCTT,

GAPDH antisense, CAGCCTTGGCAGCACCAGTGG;

Pax2 sense, CCAAAGTGGTGGACAAGATTGCC,

Pax2 antisense, GGATAGGAAGGACGC TCAAAGAC;

Pax6 sense, AGACTTTAACCAAGGGCGGT,

Pax6 antisense, TAGCCAGGT TGCGAAGAAGT;

Sox2 sense, CACCCGGGCCTCAACGCTCACG,

Sox2 antisense, TCCCCTTCTCCAGTTCGCAGTCCA;

Oct4 sense, ATGGCTGGACACCTGGCTTCAG,

Oct4 antisense, TTAACCCCAAAGCTCCAGGTTC;

GATA3 sense, CCTCCGACGGCAGGAGTC,

GATA3, antisense, ACCGTAGCCCTGACGG

AGTTT, *Islet1* sense, CCCGGGGGCCACTATTTG,
Islet1 antisense, GTCGGCTGCAGGCTACACA,
NANOG sense, AAGTACCTCAGCCTCCAG,
NANOG antisense, AGAAAGTCCTCCCCGAAG,
Tcl1 sense, TCGGCTGCCTTGGTT,
Tcl1 antisense, ACTGCCTGGCCTCTTGT
Tbx3 sense, CAGCCGCGGTCCCACATCG,
Tbx3 antisense, GGCCGTGCTCCTCCTTGCTCT.

RESULTADOS

1. Denervación de un explante del órgano de Corti.

El órgano de Corti cultivado *in Vitro* retuvo su estructura anatómica por periodos de hasta 2 semanas. Se utilizaron ratones “wild type” (C57BL/6) y transgénicos *Math1-nGFP*. La innervación de las células ciliadas por las neuronas aferentes permaneció intacta en los estudios de inmunohistoquímica (Fig. 15A).

Al objeto de determinar una concentración óptima para conseguir la eliminación de las neuronas auditivas con la preservación de las células ciliadas se estudiaron diferentes concentraciones de β -bungarotoxina en el explante de órgano de Corti (Fig. 15C-G). El explante fue tratado con la toxina durante 48 horas. Las células ciliadas supervivientes continuaban expresando fluorescencia verde de nGFP (ratón transgénico *Math1-nGFP*) y las neuronas supervivientes eran positivas al inmunomarcado con un anticuerpo para la β III-tubulina. En estos experimentos se comprobó una inducción de la muerte celular por la toxina de una manera dosis-dependiente. Se observó una mayor resistencia a la toxina en las neuronas del ápex coclear respecto a las de la base coclear. Con la utilización de las dosis más bajas (0,5 nM) la mayoría de las neuronas de la base coclear fueron destruidas, mientras que las del ápex permanecieron intactas (Fig. 15C). Cuando la concentración se aumentó a 50nM las neuronas en la base de la cóclea fueron completamente eliminadas con neuronas supervivientes en el ápex (Fig. 15D). El tratamiento del órgano de Corti con una concentración de 0,5 μ M de β -bungarotoxina eliminó las neuronas auditivas a lo largo de toda la cóclea y no afectó a las células ciliadas (Fig. 15E). En las

concentraciones mayores de $1\mu\text{M}$ las neuronas auditivas fueron eliminadas (Fig. 15F, G) aunque el número de células ciliadas también disminuyó. Las células ciliadas aparecieron intactas con la ausencia de la inervación durante periodos de hasta 2 semanas en cultivos tratados con β -bungarotoxina. El recuento celular indicó que las neuronas espiroganglionares estaban marcadamente disminuidas incluso a concentraciones de $0,5\text{nM}$. Las células ciliadas internas eran bastante resistentes a la neurotoxina y estaban ligeramente disminuidas a concentraciones de hasta $2\mu\text{M}$. Las células ciliadas externas eran mas sensibles a la acción de la neurotoxina y disminuyeron significativamente (ANOVA, $p<0,01$) a concentraciones de $1\mu\text{M}$ o mayores de β -bungarotoxina (Fig. 15I). Una concentración de $0,5\mu\text{M}$ produjo un órgano de Corti sin cuerpos neuronales ni prolongaciones nerviosas detectables y con una supervivencia completa de las células ciliadas. A esta concentración de $0,5\mu\text{M}$ la disminución de las neuronas espiroganglionares fue estadísticamente significativa ($p<0,01$; $n=5$). Esta concentración fue la elegida para los experimentos siguientes.

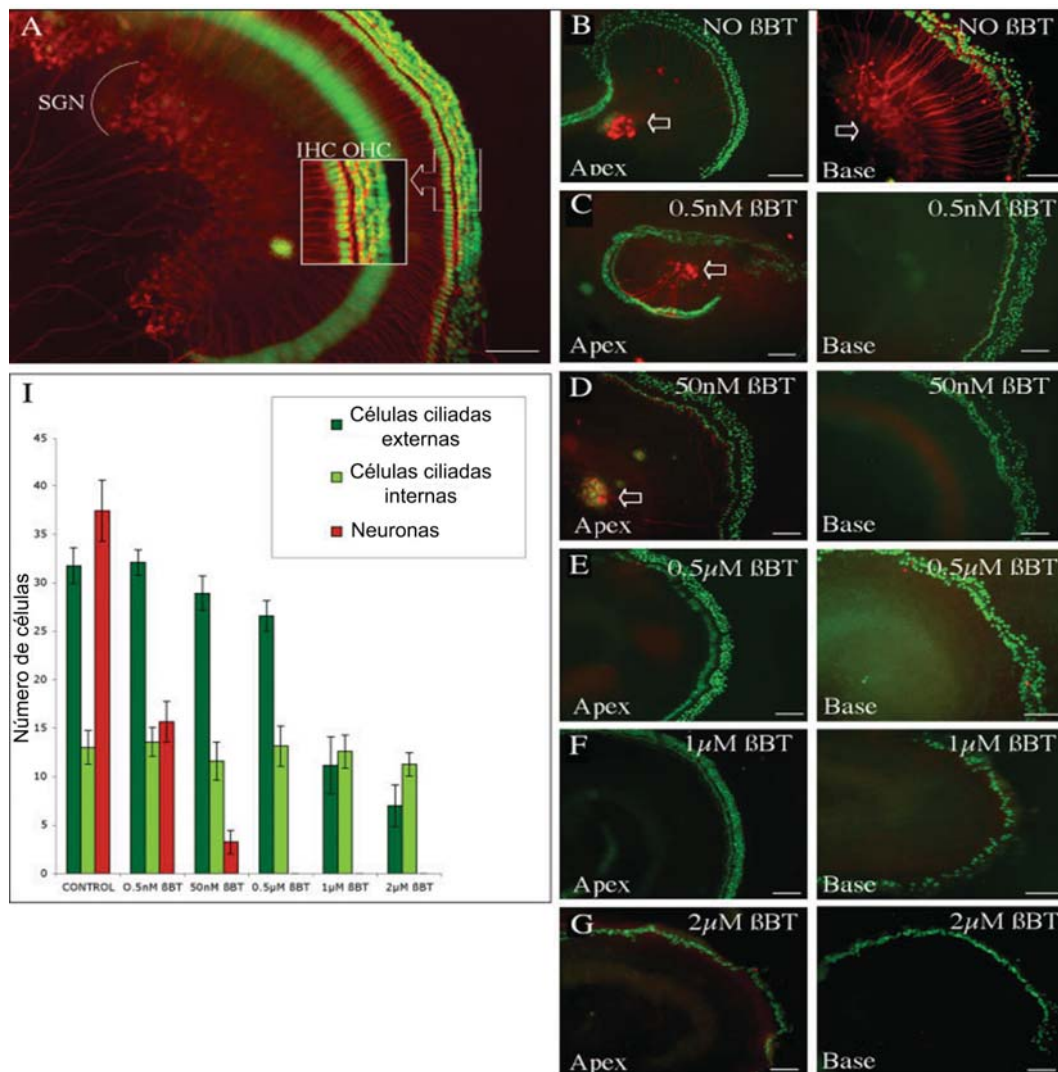


Figura 15. Efecto dosis dependiente de la β -bungarotoxina en un explante del órgano de Corti. A. Explante de órgano de Corti de un ratón C57BL/6 tras tres días de cultivo. Las células ciliadas externas (OHC) y las células ciliadas internas (IHC) se visualizaron con un anticuerpo para la parvalbúmina 3 (FITC, mostrado en verde), las neuronas auditivas o espiroganglionares (SGNs) se detectaron con un anticuerpo para la β III-tubulina (TRITC, mostrado en rojo). El recuadro muestra una mayor magnificación de las células ciliadas. B.

Porción del ápex coclear (izquierda) y base coclear (derecha) de un explante sin tratar, grupo control de un órgano de Corti de ratones transgénicos *Math1-nGFP*. Los núcleos celulares de las células ciliadas se mostraron en fluorescencia verde y las neuronas se estudiaron mediante inmunomarcado con un anticuerpo para la β III-tubulina (TRITC, mostrado en rojo). C. Tratamiento

durante dos días con β -BT 0,5nM. D. 50nM. E. 0,5 μ M. F. 1 μ M. G. 2 μ M. La barra de medición en A-G es de 100 μ m. I. Cuantificación de las células ciliadas externas (verde oscuro), internas (verde claro) y de las neuronas (rojo) de los explantes de los órganos de Corti tras el cultivo durante 48 horas con diferentes concentraciones de β -bungarotoxina. Los porcentajes se expresan como el promedio del número de células \pm la desviación Standard en 100 μ m de longitud de explante.

1.1. Especificidad de la unión de la β -bungarotoxina a las neuronas auditivas.

La β -bungarotoxina se une a los canales de potasio en la superficie de las neuronas (60) y desencadena una muerte celular debido al aumento de las concentraciones de Ca^{++} . Para comprobar su especificidad por las neuronas auditivas unimos la neurotoxina con el marcador TRITC y estudiamos su capacidad para unirse a los diferentes tipos celulares en el órgano de Corti. La β -bungarotoxina marcada con TRITC se unió rápida y específicamente con las neuronas auditivas objetivándose mediante la fluorescencia de los cuerpos neuronales. Con la concentración más baja utilizada, se observó un marcado extenso de los cuerpos neuronales tras 30 min. de cultivo (Fig. 16A, B). Los controles sin la β -bungarotoxina no mostraron marcado (Fig. 16C, D). Asimismo no se observó la toxina con el marcador en las células ciliadas, células de Schwann o en las células de soporte durante el periodo de cultivo.

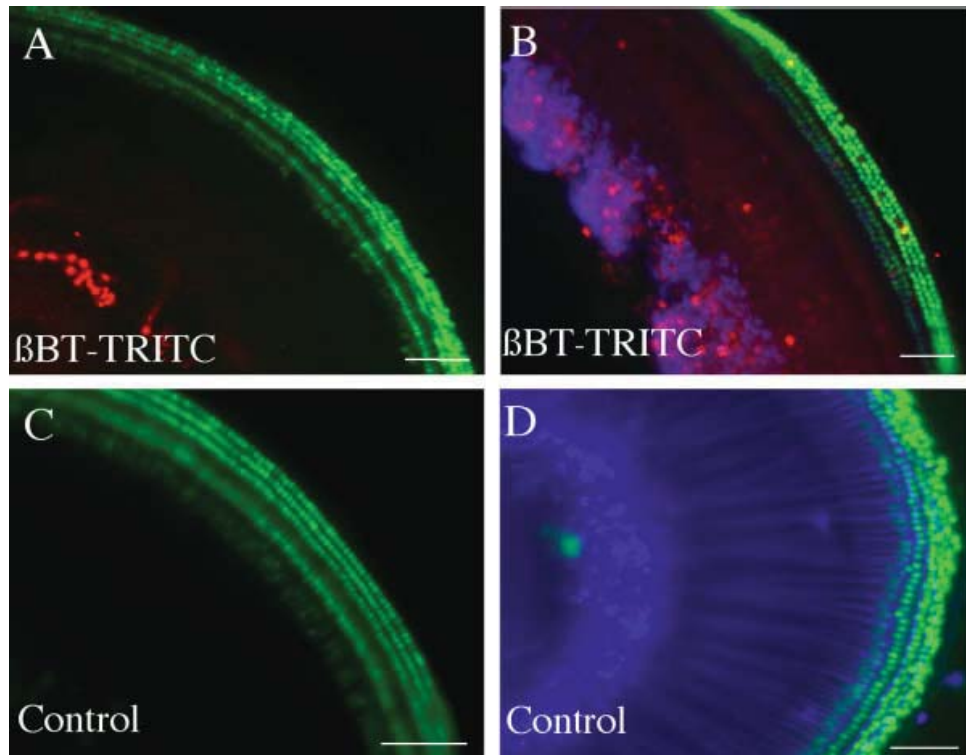


Figura 16. Unión específica de la β -bungarotoxina-TRITC a las neuronas auditivas. *A, B.* Los órganos de Corti de ratones transgénicos *Math1-nGFP* se trataron con β -bungarotoxina 50 nM marcada con TRITC (rojo) durante 30 minutos. *C, D.* Los controles se trataron con medio de cultivo conteniendo TRITC pero sin β -bungarotoxina. El tejido se fijó sin inmunomarcado en *A* y *C* o realizando inmunomarcado con un anticuerpo dirigido a la β III-tubulina (Cy5-azul) en *B* y *D*. Barra de medición de 100 μ m.

1.2. Apoptosis en las neuronas auditivas tras el tratamiento con β -bungarotoxina.

Para estudiar el mecanismo de muerte celular de las neuronas auditivas en el explante de órgano de Corti tras el tratamiento con 0,5 μ M de β -bungarotoxina se realizó el estudio de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL. Se observó un marcado intenso de

los núcleos apoptóticos en las neuronas (Fig. 17A); las células ciliadas no fueron afectadas por la toxina. En los controles sin la enzima transferasa terminal, no se observó marcado en las células del órgano de Corti. (Fig. 17B). En los controles sin el tratamiento con la β -bungarotoxina las neuronas no se marcaron con el TUNEL (Fig. 17C).

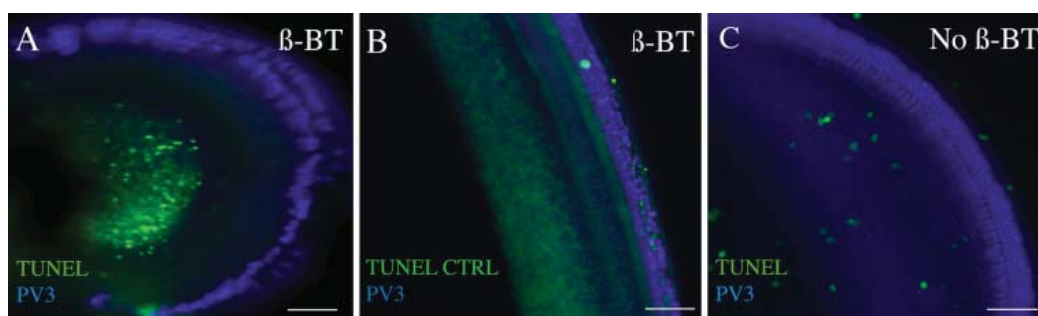


Figura 17. Estudio de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL en los explantes de órgano de Corti tratados con β -bungarotoxina. A. Tras el tratamiento con β -bungarotoxina durante 24 horas las neuronas auditivas fueron positivas al marcado con TUNEL (FITC, verde). Las células ciliadas se marcaron con un anticuerpo para la parvalbúmina 3 (Cy5, azul). B. Tras la utilización de la solución control (TUNEL CTRL) en la que falta la enzima deoxinucleotidil transferasa no se observa la tinción en las neuronas auditivas. C. Órgano de Corti sin recibir el tratamiento con β -bungarotoxina y estudiado con el método TUNEL con dUTP (FITC, verde). No hubo tinción de las neuronas auditivas. El tratamiento con β -bungarotoxina (A) causó la desaparición de las neuronas sin la pérdida de otros tipos celulares del órgano de Corti. Barra de medida de 100 μ m.

2. Obtención y caracterización de células madre derivadas del oído interno.

2.1. Estudio de la proliferación celular de las células madre.

Las células del utrículo de ratones “wild type” (C57/BL6) y ratones transgénicos *Math1-nGFP* se disociaron y se cultivaron como células aisladas a baja densidad en un medio de cultivo con factores de crecimiento. Las células que no se adherían a la placa de Petri formaron grupos celulares de forma esférica a los 5-8 días de cultivo. Para determinar si las esferas se generaron por mitosis, se utilizó la 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, análogo de la timidina) para marcar las células mitóticamente activas durante el proceso de formación de esferas. Prácticamente todas las células de las esferas habían replicado el ADN; así el $87,4\pm 5\%$ (n=3) de los núcleos celulares estaban marcados con BrdU (Fig. 18a, b) lo que demostró que las células de las esferas provenían de células proliferativas.

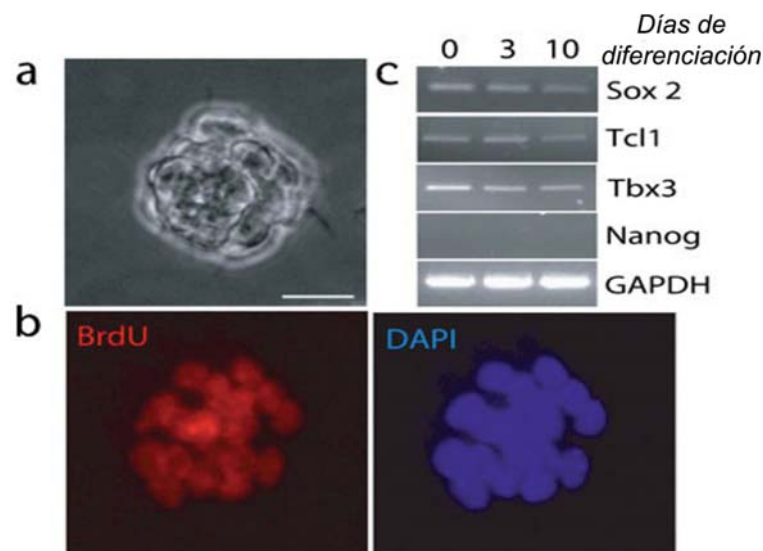


Figura 18: Estudio de la proliferación celular y de la expresión génica de

las esferas procedentes del utrículo del oído interno. a). Una esfera derivada de una célula proliferativa del utrículo flotando en el medio de cultivo previamente a su diferenciación. b). Estudio de la proliferación celular de las esferas mediante inmunomarcado con BrdU. Los núcleos se marcaron con DAPI. c). Expresión génica en las esferas a los 0 días de diferenciación, a los 3 días de diferenciación y a los 10 días de diferenciación mediante PCR con transcriptasa inversa. Barra de medida es de 40 μm .

Para conseguir la propagación de las células de las esferas se realizó la disociación de las esferas de primera generación y se volvieron a cultivar como células individuales a baja densidad. Se observó que se generaban de nuevo esferas, esta vez de segunda generación, procedentes de las células disociadas. De esta manera, conseguimos expandir los cultivos de las células proliferativas procedentes del oído interno. Además, si utilizamos para los trasplantes celulares las esferas de segunda generación tenemos la seguridad de estar utilizando células con un origen proliferativo.

El estudio del ARN mensajero de las esferas mostró que estas células expresaban *Sox2* (Fig. 18c), un marcador observado en células madre adultas y embrionarias. Otros marcadores de células madre embrionarias como *Tbx3* y *Tcl2* eran expresados. Por el contrario, no se encontró la expresión de *NANOG*, marcador de células madre embrionarias (Fig.18c).

2.1.1. Formación de esferas en diferentes áreas del oído interno.

Realizamos la disección del utrículo, el sáculo, las ampollas de los canales semicirculares, el órgano de Corti, el ganglio espiral y el ligamento espiral del oído interno de ratones P21 (21 días postnatal). Se formaron esferas de cada grupo tras el cultivo de células

individuales a baja densidad. Se encontró una capacidad para formar esferas en todas las estructuras estudiadas del oído interno de los ratones P21 (Fig. 19). El sistema vestibular mostró la más alta capacidad para la formación de esferas; las esferas procedentes de los tejidos cocleares se formaron con menor frecuencia (Fig. 19).

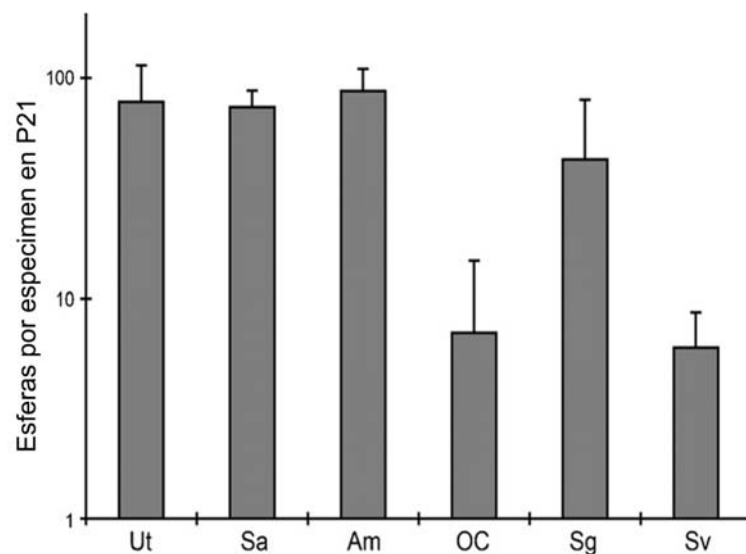


Figura 19. Número de esferas obtenidas en la disección de diferentes partes del oído interno. Ut (utrículo), Sa (sáculo), Am (ampolla de canal semicircular), OC (órgano de Corti), Sg (tejido espiroganglionar) y Sv (estría vascular). P21 es 21 días postnatal.

En los tejidos cocleares, encontramos que el órgano de Corti y el tejido espiro-ganglionar dieron lugar a una amplia población de esferas a la edad de P1 y P7 (Fig. 20). Estos tejidos parecen perder la mayoría de su capacidad para generar esferas a partir de la primera semana de edad. La formación de esferas en estos tejidos estaba ausente a la edad P42.

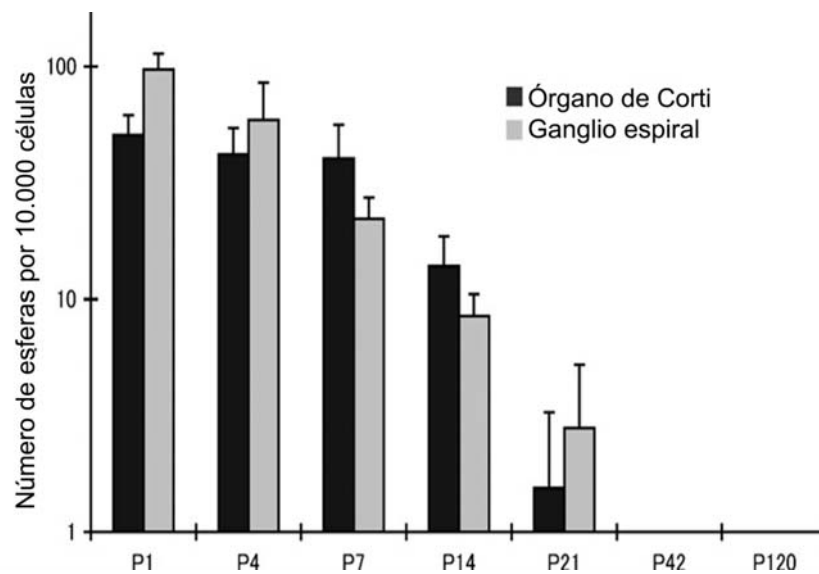


Figura 20. Disminución en la obtención de esferas en el órgano de Corti y en el ganglio espiral con la edad. A la edad de P42 (42 días postnatal) y posteriores no se obtienen esferas.

2.2. Estudio de la diferenciación celular de las células madre del oído interno.

2.2.1. Diferenciación en neuronas, células gliales y células ciliadas.

Las células madre derivadas del utrículo se diferenciaron durante 10 días formando neuronas que expresaban β III-tubulina (anticuerpo TuJ). Estas neuronas tenían morfologías variadas, incluyendo neuronas bipolares y multipolares (Fig. 21a). Se observaron, además, células gliales las cuales eran positivas para el marcador GFAP (glial fibrilar acidic protein) (Fig. 21a). Cuando las células procedían de ratones transgénicos *Math1-nGFP*, las células ciliadas en formación (expresan *Math1*) fueron aparentes por la

expresión de la proteína verde de fluorescencia en el núcleo. Las células ciliadas maduras se reconocen por la tinción con un anticuerpo frente a la miosinaVIIa (Fig. 21b). Previamente a la diferenciación de las esferas, no se observó la expresión de β III-tubulina, GFAP, *Math1* o miosinaVIIa.

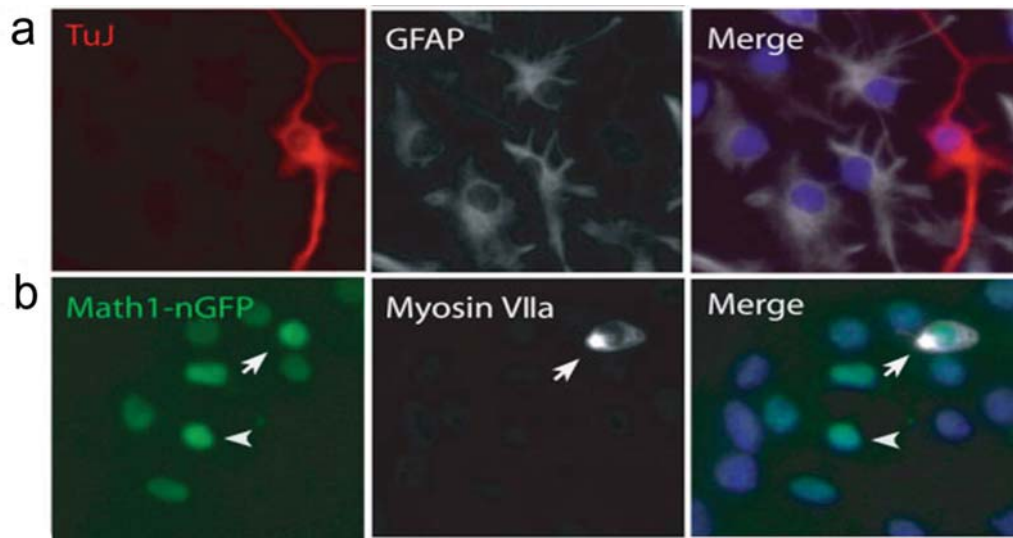


Figura 21. Las células de las esferas se diferenciaron tras 10 días en cultivo y la retirada de los factores de crecimiento. a). Las neuronas se muestran en rojo (β III-tubulina) y las células gliales en blanco (GFAP). b). En ratones transgénicos *Math1-nGFP* se observó la diferenciación de las células madre a células ciliadas (cabeza de flecha, verde). Una célula ciliada madura se muestra con el anticuerpo para la miosina VIIa (flecha, blanco) tras 10 días en cultivo. Barra de medida de $40\mu\text{m}$.

Las neuronas identificadas por el marcador neuronal β III-tubulina representaron el $5,04\pm 1,2\%$ ($n=7$) del total de las células diferenciadas procedentes de las esferas del utrículo. El número de neuronas se aumentó con el tratamiento de los cultivos con factores de diferenciación (“ácido retinoico”, “noggin” y “sonic hedgehog”) (Fig. 22). El porcentaje de neuronas fue mayor con el ácido retinoico,

con un $12,87 \pm 2,1\%$ ($n=7$) del total de las células. Tras el tratamiento con “noggin” fue del $6,42 \pm 2\%$ ($n=7$) y tras “sonic hedgehog” del $8,00 \pm 2,3\%$ ($n=7$). El ácido retinoico a una concentración de $1\mu\text{M}$ tiene un efecto estadísticamente significativo en dirigir la diferenciación celular de las células madre hacia células que expresan β III-tubulina ($p < 0,05$) comparado con el grupo control sin factores de diferenciación. El número de células positivas al marcador de células ciliadas *Math1* fue también mayor ($p < 0,05$) tras la utilización del ácido retinoico ($9,23 \pm 1\%$, $n=7$) comparado con el grupo control ($5,45 \pm 1\%$, $n=7$). Tras “sonic hedgehog” fue de $8,89 \pm 0,5\%$ ($n=7$). Tras “noggin” fue de $4,2 \pm 0,9\%$ ($n=7$) (Fig. 22).

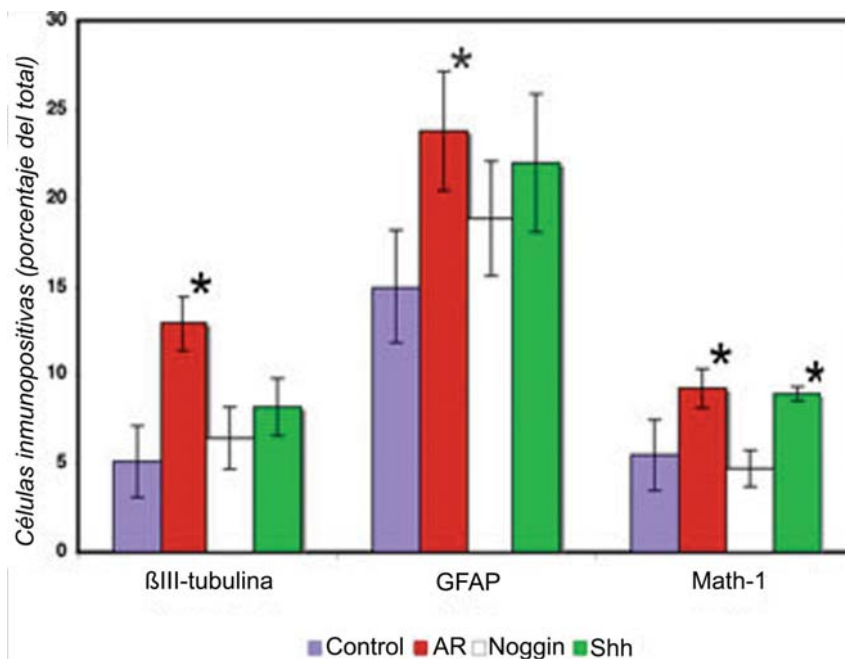


Figura 22: Porcentaje de neuronas (β III-tubulina), células gliales (GFAP) y células ciliadas (*Math1*) obtenidas tras la utilización de diferentes factores de diferenciación. Las esferas se trataron en un medio de cultivo con ácido retinoico, “noggin” o “sonic hedgehog” durante dos días y se estudiaron mediante inmunocitología tras 10 días de cultivo. Se muestran los resultados de 7 experimentos. Las células se contabilizaron como un porcentaje de células

marcadas con DAPI. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) están marcadas con un asterisco.

La proporción de células gliales identificadas con el anticuerpo GFAP estuvo también significativamente aumentada en las esferas utriculares tratadas con ácido retinoico ($p < 0,05$) (Fig. 22). El número de células por esfera no cambió por el uso del ácido retinoico (30 ± 10 células con ácido retinoico y 33 ± 12 sin ácido retinoico), determinadas por el marcado con DAPI.

2.2.2. La diferenciación de las células madre comparte el programa neurogénico de los progenitores neuronales *in vivo*.

Las esferas procedentes del utrículo se examinaron tras 3 días de diferenciación observándose marcadores de progenitores neuronales (Fig. 23 y 24).

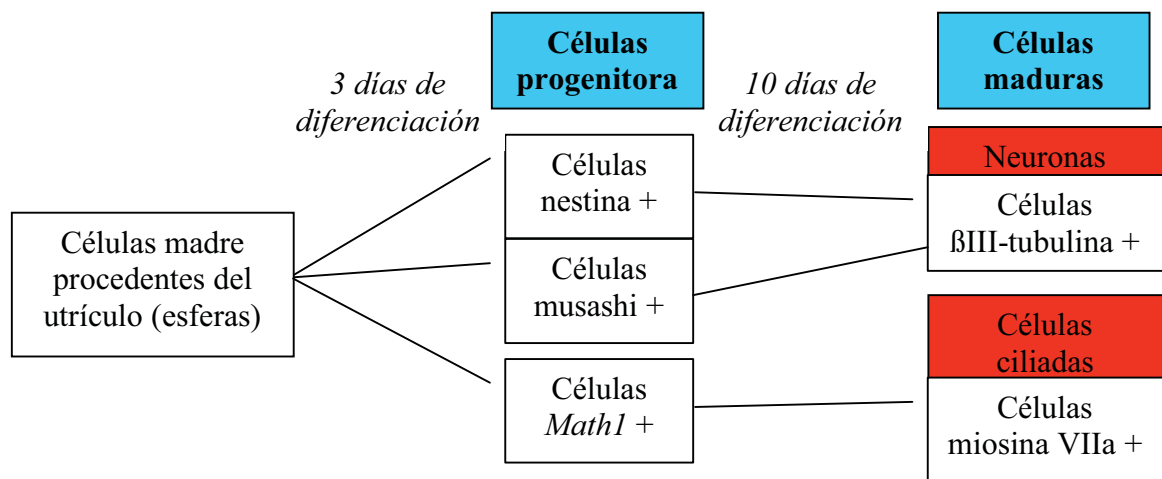


Figura 23. Expresión de diferentes marcadores en las células progenitoras y en las células maduras que forman neuronas o células ciliadas.

Las células madre del utrículo diferenciadas con ácido retinoico mostró fases de diferenciación hacia un destino neural: 23,64±4% (n=3) de las células fueron positivas a la nestina, 21,10±3% (n=3) fueron positivas al Musashi. Las células que se diferencian en células ciliadas expresaban *Math1* y eran el 3,02±1% de las totales (Fig. 24).

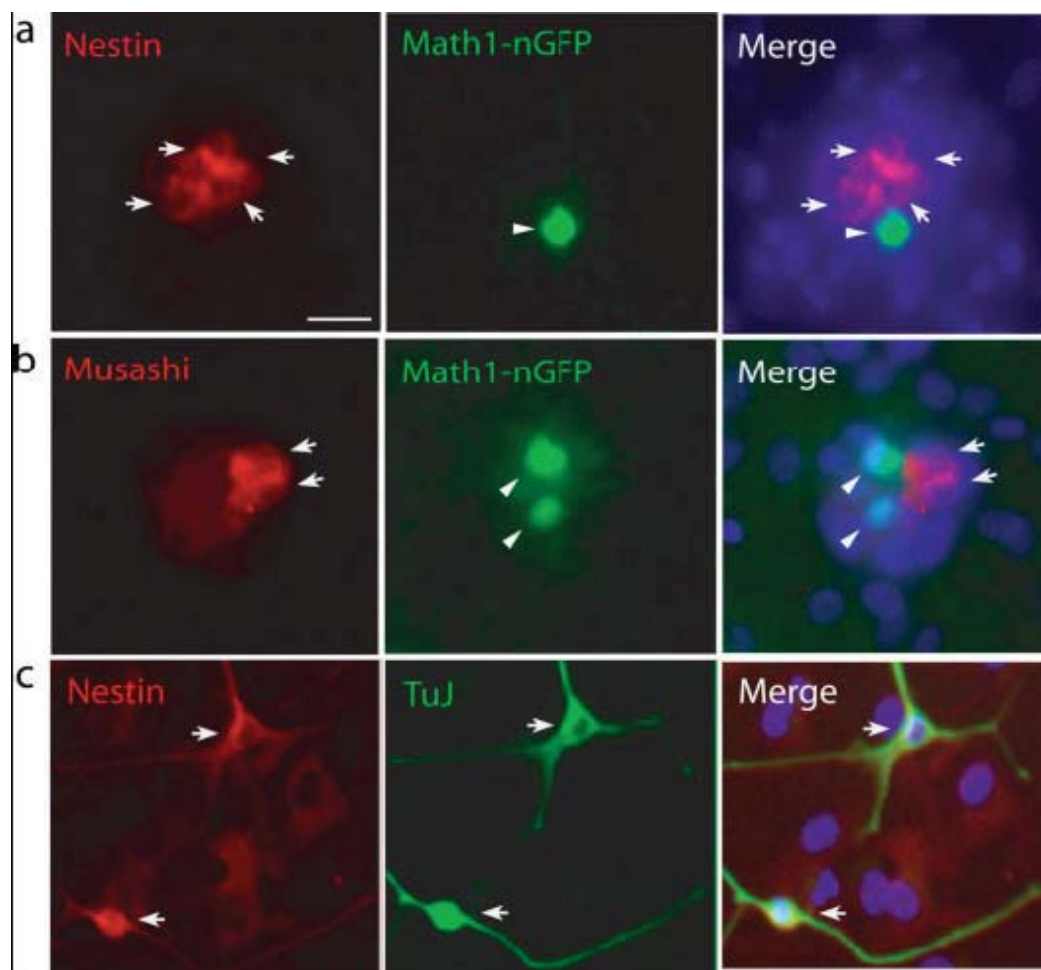


Figura 24: Expresión de marcadores de progenitores neuronales en las esferas procedentes del utrículo tratadas con ácido retinoico y cultivadas durante 3 días. a) Los progenitores neuronales eran positivos a la nestina (rojo, flechas); las células ciliadas se detectaron mediante la expresión de *Math1*-nGFP (verde, cabeza de flecha). La expresión de la nestina y de *Math1* se produjo en células diferentes. b). Una esfera con células positivas al anticuerpo Musashi (flechas,

rojo), las células ciliadas se detectaron mediante la expresión de *Math1-nGFP* (verde, cabeza de flecha). c). Las células positivas al anticuerpo Nestina (flechas, rojo) expresan también β III-tubulina (anticuerpo TuJ), sugiriendo que la nestina es expresada en neuronas en proceso de diferenciación. Barra de medida de 40 μ m.

Las células positivas al gen *Math1* se encontraban en regiones de las esferas diferentes a las células que expresaban nestina (Fig. 20a); no se encontraron células que expresaran nestina o Musashi que a su vez expresaran *Math1* tras la diferenciación de las esferas durante tres días (n=5). A diferencia de las células que expresan *Math1*, las células que expresan β III-tubulina fueron positivas para nestina: 97,01 \pm 12% (n=4) de las células positivas a β III-tubulina expresaban nestina a los tres días de diferenciación (Fig. 24c) sugiriendo que las células que expresan nestina en las esferas se convierten en neuronas.

Los marcadores tempranos del desarrollo del oído interno, *Pax2* y *Islet1* (55, 61, 62, 63, 64) también fueron detectados en las esferas diferenciadas durante tres días (Fig. 25a,b). Al igual que la expresión en diferentes células de nestina y *Math1*, las células positivas a *Math1* o a *Pax2* se distribuyeron en diferentes áreas dentro de las esferas y no coincidía su expresión en la misma célula. Esto sugiere una posible especificación de las células positivas a *Pax2* para la diferenciación hacia una estirpe neuronal. Un patrón similar se observó en la expresión de *Islet1* (Fig. 25b). Las células progenitoras en las esferas tratadas con ácido retinoico también expresaban *Brn3a*, un marcador de un fenotipo neuronal sensorial (Fig. 25c). La expresión de *Brn3a* se encontró en las células que eran positivas a nestina: tras tres días de diferenciación se encontraron que el 85 \pm 10% (n=5) de las células que expresaban nestina también expresaban

Brn3a (Fig. 25c), mientras que las células que expresaban *Math1* no eran positivas a *Brn3a*. Como la expresión de *Brn3a* es necesaria para el desarrollo de las neuronas sensoriales y es una expresión limitada a las neuronas, el inmunomarcado doble confirma que las células positivas a nestina son progenitores neuronales. *Pax2* y *Islet1* también eran expresados en las células madre en proceso de diferenciación (Fig. 26c). También hubo expresión de *GATA3*, marcador de neuronas espiroganglionares (53, 62, 63) y de *Phox2b*, un marcador de neuronas autonómicas en los progenitores de la cresta neural (45, 65). Tras el tratamiento con el ácido retinoico no se apreciaron cambios en la expresión de *Islet1*, *Phox2b* (Fig. 26c). Con el ácido retinoico la expresión de *Pax2* se elevaba a los 3 días de tratamiento, mientras que la de *Pax6* disminuía. No ocurría este cambio en la expresión sin el ácido retinoico (Fig. 26c). *Pax2* es expresado en la placoda y en la vesícula ótica (61, 62, 63, 64), por lo que el ácido retinoico favorece la diferenciación celular hacia un fenotipo ótico.

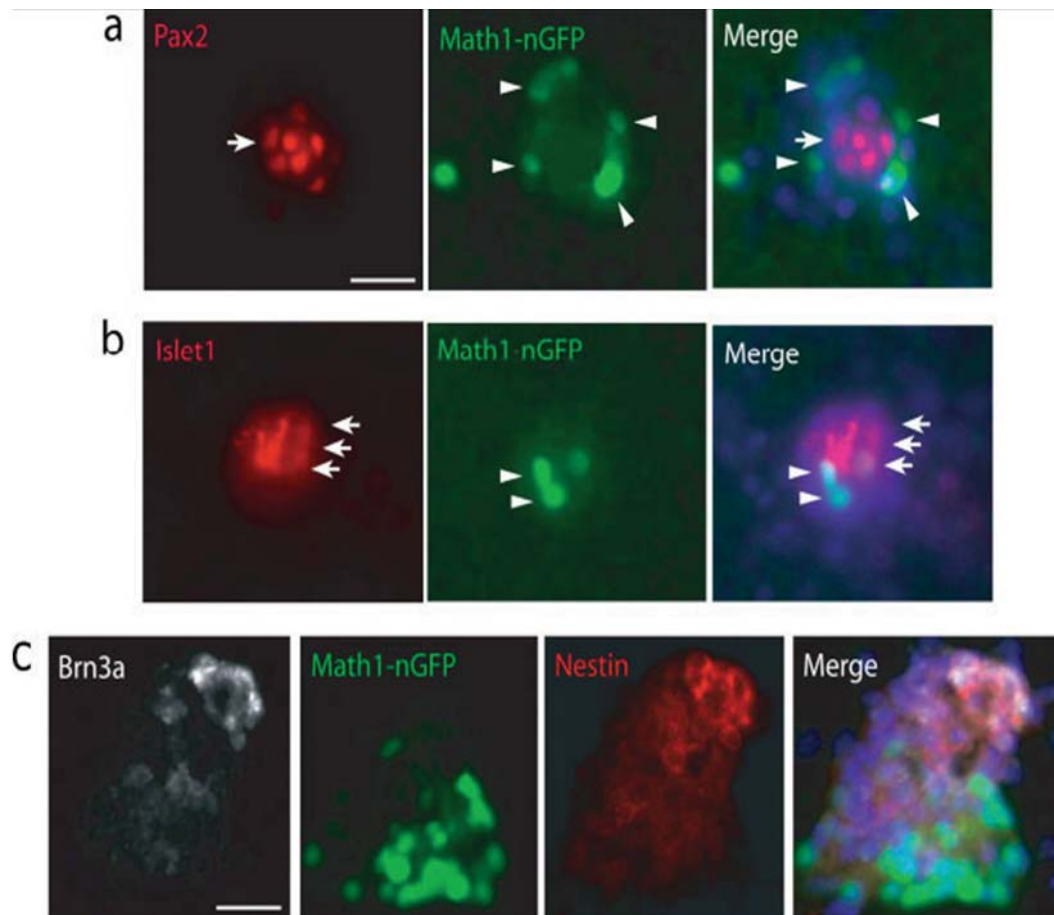


Figura 25. Expresión de marcadores de progenitores neuronales de estirpe sensorial y de células ciliadas tras tratamiento de las esferas con ácido retinoico durante 3 días. a). Células positivas a *Math1* (cabeza de flecha, verde) y *Pax2* (flecha, rojo). No hubo células que expresaran los dos marcadores a la vez y las células se distribuyeron en diferentes áreas. b). Células positivas a *Islet1* (flechas, rojo) y *Math1* (cabeza de flecha, verde). Tampoco hubo coexpresión de los dos marcadores. c). Las células que eran positivas a la nestina también expresaban *Brn3a* y estas células estaban separadas de las células que expresaban *Math1*. Barra de medida es de 40 μm (a, b) y 60 μm (c).

El examen de la secuencia temporal de la expresión de marcadores indicó que la nestina y Musashi (marcadores de progenitores neuronales) eran expresados a una intensidad mayor al tercer día de la diferenciación que en el primer día. Al décimo día,

cuando la diferenciación celular era más avanzada, la expresión de células progenitoras disminuía (Fig. 26a). Los marcadores β III-tubulina y *Math1* aumentaron su expresión significativamente al décimo día sugiriendo la formación de neuronas y de células ciliadas en las esferas (Fig. 26a). La división celular en las esferas en proceso de diferenciación disminuyó en el tiempo (Fig. 26b) siendo prácticamente ausente a los 10 días. La expresión de marcadores de la estirpe sensorial, *Islet1* y *Pax2* (61, 64, 66) aumentó significativamente al tercer día de diferenciación de las esferas con el ácido retinoico (Fig. 26a).

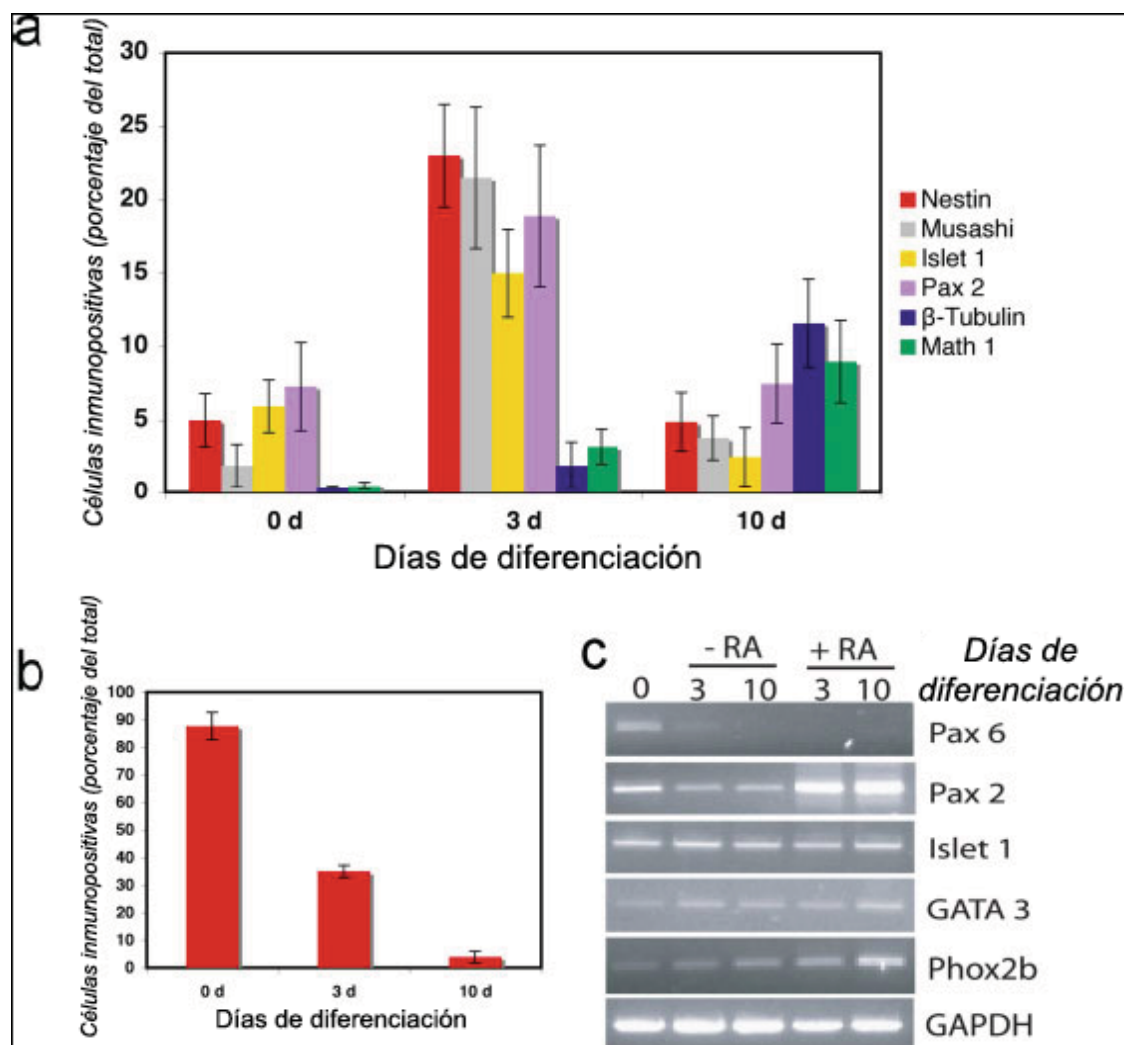


Figura 26. Expresión de los marcadores de progenitores neuronales en

células madre diferenciadas del oído interno. a). Secuencia temporal de la expresión de los marcadores de progenitores neuronales (nestin y musashi), marcadores de progenitores neuronales sensoriales (Islet1 y Pax2) y marcadores de neuronas (β -III tubulina) y de células ciliadas (Math1) en esferas indiferenciadas (0 días) y en células diferenciadas (3 días y 10 días). b). La incorporación de BrdU en los días 0, 3 y 10 demuestra que la proliferación celular disminuyó cuando la diferenciación celular comenzaba (3 días). c). PCR con transcriptasa inversa demuestra que Pax6, Pax2, Islet1, GATA3 y Phox2b eran expresados en las esferas.

2.3. Estudio de la funcionalidad de las neuronas obtenidas de la diferenciación de las células madre.

El requerimiento básico de una neurona funcional es la presencia, a través de su membrana, de corrientes de Na⁺ sensibles a la tetrodotoxina (TTX) y de corrientes de potasio activadas de alto voltaje. Estas dos corrientes son necesarias para la generación de potenciales de acción. Se realizaron estudios de “patch-clamp” en las células madre diferenciadas con ácido retinoico. Para las grabaciones se eligieron, bajo microscopio óptico, las células con un fenotipo neuronal (morfología redonda u ovoidea en el cuerpo celular y con prolongaciones largas y finas). Los potenciales de membrana de reposo detectados fueron de -43 ± 18 mV (n=27). Para las relaciones entre corriente y voltaje, partiendo de un potencial mantenido en -84 mV, se aplicaron pulsos de voltaje en incrementos de 10 mV desde -104 a 36 mV, durante 40 ms cada segundo. Todas las células estudiadas (41/41) mostraron una corriente de potasio de alto voltaje con un umbral a -40 ± 8 mV (Fig. 27b). Tres células (3/41) mostraron además una corriente de potasio de bajo voltaje con un umbral a -54 mV. En el 41% de las células estudiadas (17/41), se encontraron una

corriente hacia el interior celular rápidamente activadora y, posteriormente, una corriente desactivadora; con un promedio máximo de 620 ± 674 pA y un umbral a -35 ± 9 mV. Esta corriente se bloqueaba de una manera rápida y reversible con tetrodotoxina (TTX) $1 \mu\text{M}$, un bloqueante selectivo de los canales de Na^+ voltaje dependientes (7/7) (Fig. 27c). Como respuesta a las corrientes despolarizantes (10 a 120 pA en incrementos de 10mV, durante 200ms), 4 de 10 células con corrientes de Na^+ voltaje dependientes (I_{Na}) eran capaces de tener potenciales de acción (Fig. 27e). En 3 de estas células, una corriente negativa se inyectó antes de la despolarización para eliminar la inactivación de los canales de Na^+ .

Se comprobó si la aparición de I_{Na} se correlacionaba con la expresión del marcador neuronal βIII -tubulina. Las células fueron infiltradas con un marcador fluorescente Alexa Fluor[®] 568 durante el periodo de las grabaciones. Tras la fijación del tejido se estudió la inmunoreactividad para la βIII -tubulina. Un total de 10 de las 11 células positivas a I_{Na} eran positivas a la βIII -tubulina (Fig. 27h) mientras que solamente 4 de 11 células negativas a I_{Na} eran positivas a la βIII -tubulina, mostrando una correlación entre estas dos características neuronales (test de Fischer, $p=0,024$). Las 4 células con I_{Na} aparentemente negativas y positivas a la βIII -tubulina podrían también tener pequeñas corrientes de Na^+ imperceptibles debido a unas corrientes de K^+ mucho más grandes.

Para comprobar las diferencias y similitudes entre las neuronas diferenciadas de las células madre y las neuronas auditivas realizamos grabaciones de neuronas auditivas (P1-3) cultivadas en las mismas condiciones. Los potenciales de membrana fueron de -42 ± 8 mV. El 100% (19/19) de las neuronas auditivas cultivadas tenían corrientes de potasio activadas con alto voltaje (Fig. 27a), 2 de las 19 células

expresaban corrientes de potasio de bajo voltaje y 1 de la 19 células una corriente activada con la hiperpolarización. El 63% de las neuronas auditivas tenían corrientes de Na⁺ con un promedio de 1064 ± 1322 pA (n=12). Todas las células marcadas con Alexa Fluor[®] 568 eran positivas a la β III-tubulina (13/13), incluyendo tres células I_{Na}-negativas (Fig. 27g).

Se comprobó si las células diferenciadas de las células madre respondían electrofisiológicamente al glutamato (neurotransmisor en la sinapsis célula ciliada-neurona auditiva). La aplicación de dicho neurotransmisor (0,1-1 mM) produjo corrientes hacia el interior de la célula en las células madre diferenciadas (13/25; 33 ± 29 pA) (Fig. 27f) y en las neuronas auditivas aisladas del tejido espiroganglionar (4/8; 14 ± 8 pA). La respuesta se inhibía con el bloqueador específico del receptor AMPA, CNQX (10 μ M) (5/5 en células diferenciadas de las células madre) y revertía en un caso.

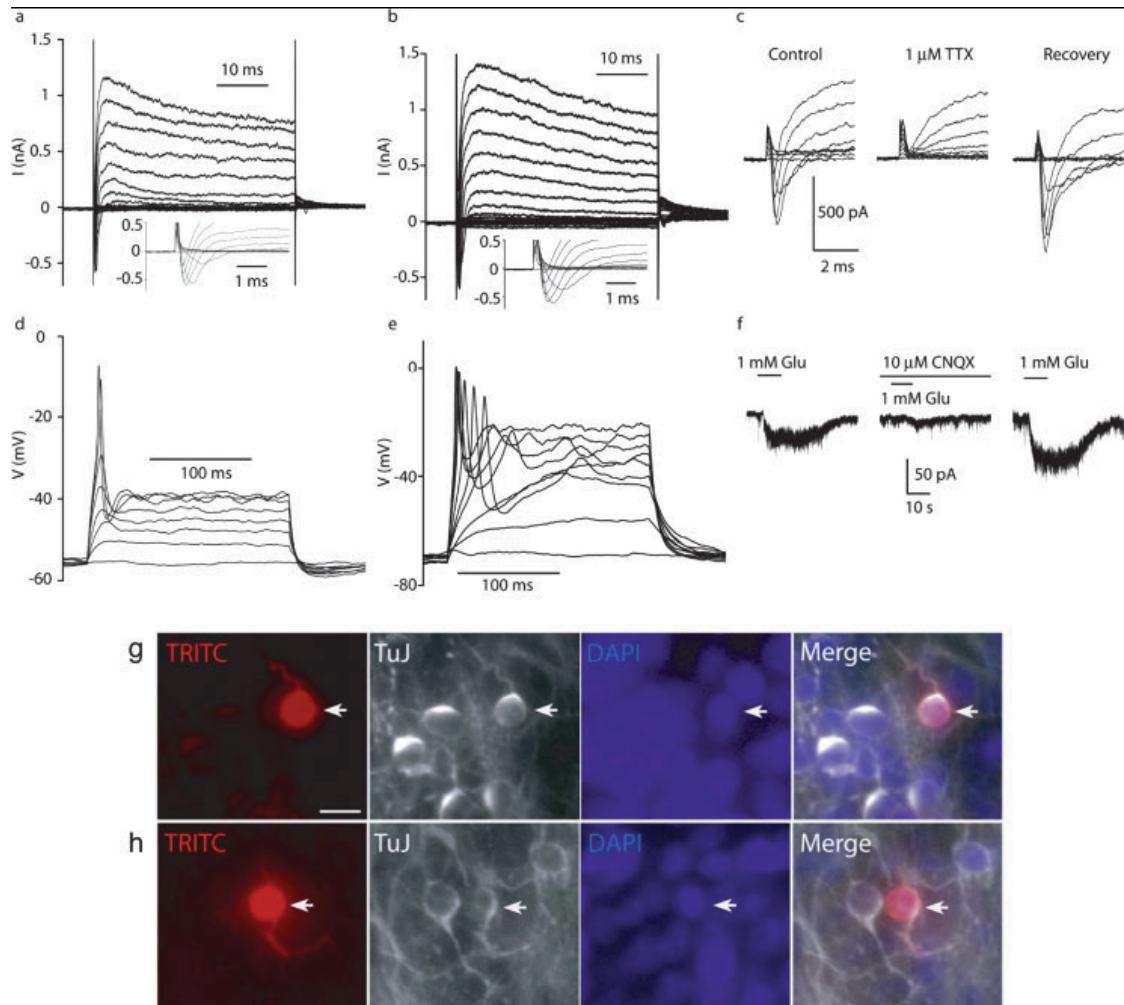


Figura 27. Las células diferenciadas de las células madre tenían características eléctricas de neuronas. a) Relación intensidad (I)-voltaje (V) en una neurona espiroganglionar. b) Relación intensidad (I)-voltaje (V) en una célula madre diferenciada. Se realizaron aumentos de 10mV de potencial desde -104 a +36 mV. Una corriente lenta inactivadora hacia el exterior celular y una corriente rápida activadora e inactivadora hacia el interior celular se observó a 34 mV o más (se muestran cambios del voltaje de -84 a +16 mV). c) La corriente hacia el interior celular en las células madre diferenciadas se inhibía de una manera reversible por 1 μM de tetrodotoxina indicando que es una corriente de Na⁺ voltaje dependiente (I_{Na}). d). Cuando se controla la corriente (I), las inyecciones de corrientes despolarizantes (10-120 pA en incrementos de 10pA) produjeron potenciales de acción en neuronas auditivas y en células madre diferenciadas (e). f) La respuesta de una célula madre diferenciada al glutamato era bloqueada reversiblemente por 10 μM de CNQX. g) Inmunomarcado de una neurona

espiroganglionar a la que se realizó electrofisiología y de un célula madre diferenciada (h) por Alexa Fluor 568 (inyectado tras la grabación) y β III-tubulina. De izquierda a derecha: Alexa Fluor 568, β III-tubulina, DAPI, y la superposición. Las flechas señalan las células grabadas. Barras de medida de 25 μ m.

Nuestros resultados muestran, en definitiva, que las características electrofisiológicas de las células madre diferenciadas y de las neuronas auditivas cultivadas eran muy similares.

3. Trasplante celular en el explante del órgano de Corti denervado tras la neurotoxina.

3.1. Trasplante de neuronas auditivas.

La destrucción de las neuronas y la supervivencia de las células ciliadas en el explante del órgano de Corti tras el tratamiento con β -bungarotoxina nos permitieron el estudio de la reinervación de las células ciliadas por neuronas auditivas trasplantadas. El tejido espiroganglionar de ratones P1 se cultivó en la proximidad del órgano de Corti que se había tratado con β -bungarotoxina. Las neuronas enviaron nuevas prolongaciones que crecieron hacia las células ciliadas (Fig. 28A). Cuando se realizó la disociación de las neuronas espiroganglionares y se transplantaron in Vitro como células únicas al órgano de Corti denervado tratado con β -bungarotoxina, también se observó el crecimiento de prolongaciones nerviosas hacia las células

ciliadas. Estas prolongaciones desarrollaron botones terminales una vez que establecieron el contacto con las células ciliadas (Fig. 28B). Se encontraron aproximadamente 50 neuronas en cada trasplante de un oído de un ratón donante. Estas neuronas establecían un promedio de 10 contactos con las células ciliadas (n=34). En el caso de utilizarse ratones transgénicos *Thy1-CFP*, también se encontraron conexiones similares entre las neuronas donantes y las células ciliadas. En estos ratones transgénicos el marcado de las neuronas con CFP (Cyan Fluorecence Protein) y con el anticuerpo neuronal TuJ mostró que las neuronas procedían del ratón donante (Fig. 28C).

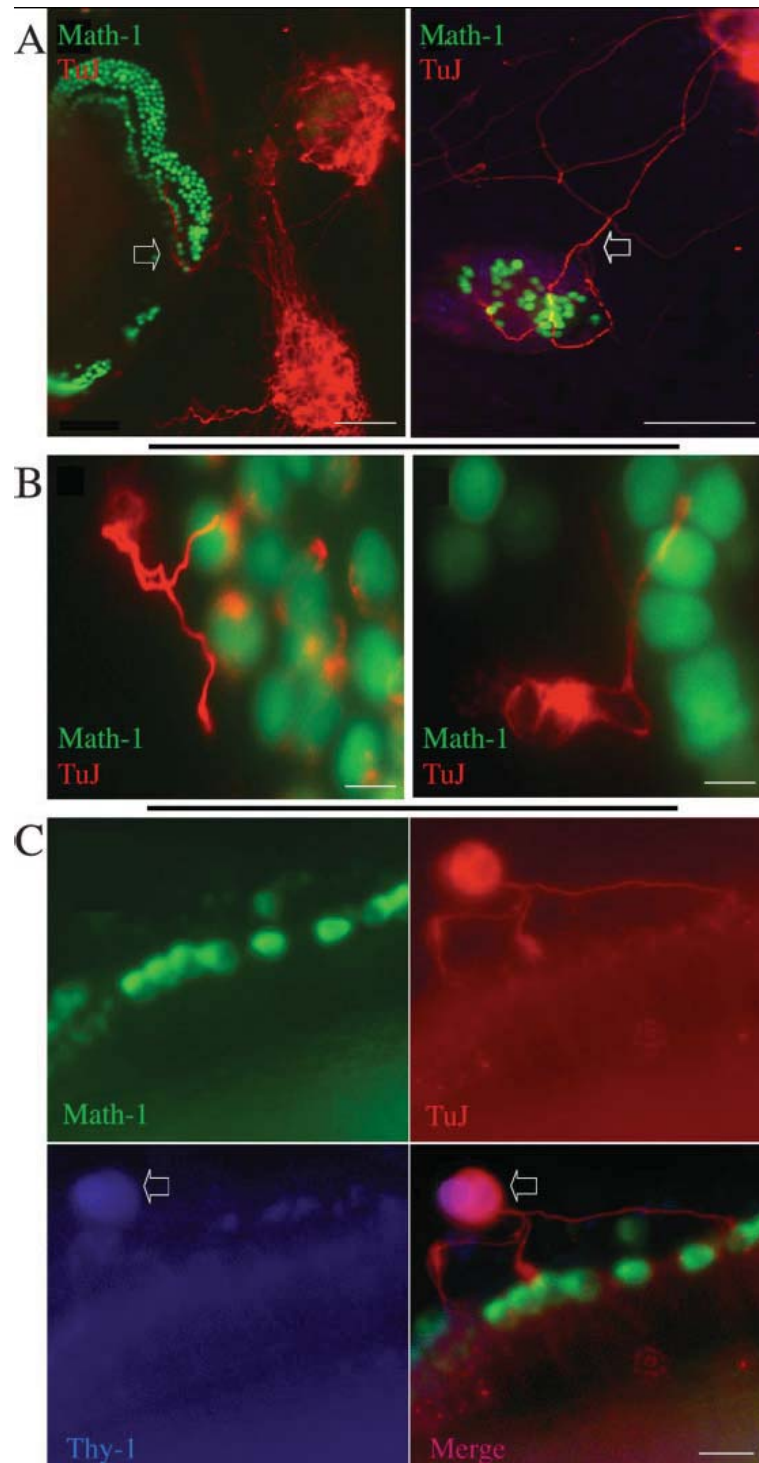


Figura 28. Trasplante *in Vitro* de neuronas auditivas en el órgano de Corti denervado tras β -bungarotoxina. El órgano de Corti de los ratones transgénicos *Math1-nGFP* fue tratado con β -bungarotoxina $0,5\mu\text{M}$ durante dos días, posteriormente se añadió el tejido espiroganglionar procedente de un ratón “wild type” *C57BL/6* (A, B, C) y se cultivó durante 24 horas.

A) Izquierda: las neuronas espiroganglionares (rojo, *BIII-tubulina*) extendieron prolongaciones hacia el órgano de Corti (flecha, en verde las células ciliadas por

la expresión de Math1-nGFP). Derecha: algunas prolongaciones de las neuronas espiroganglionares (flecha) realizaron contactos.

B) Izquierda: una neurona espiroganglionar envía prolongaciones hacia el órgano de Corti donde contacta con las células ciliadas. Derecha: una neurita de una neurona espiroganglionar desarrolla un botón terminal en el punto de contacto con la célula ciliada.

c) Cuando se añadió tejido espiroganglionar disociado procedente de ratones transgénicos Thy1-CFP la expresión de la proteína CFP (azul) permitió el detectar las neuronas trasplantadas. Las flechas muestran una neurona procedente del ratón transgénico Thy1-CFP (marcada con β III-tubulina-rojo y CFP-azul) cuyas prolongaciones establecen contactos con las células ciliadas (verde). Barras son de 100 μ m. en (A); 15 μ m en (B); 20 μ m en (C).

La presencia de proteínas sinápticas en los contactos entre las neuronas auditivas trasplantadas y las células ciliadas se estudió mediante el anticuerpo específico para la sinapsina (Fig. 29). Las neuronas que enviaron prolongaciones hacia el órgano de Corti tenían botones terminales positivos a la sinapsina en los puntos de contacto con las células ciliadas, indicando la presencia de las vesículas sinápticas en el espacio presináptico (Fig. 29C). El inmunomarcado se localizaba en los botones terminales de las neuronas (Fig. 29D). Algunas de las prolongaciones se ramificaban y había un claro crecimiento direccional de estas ramificaciones hacia las células ciliadas individuales. Se observó que los contactos de las neuronas trasplantadas con las células ciliadas externas eran múltiples y con diversas ramificaciones de las prolongaciones terminales. Sin embargo, los contactos con las células ciliadas internas eran únicos y sin ramificaciones en las prolongaciones terminales. Este patrón de inervación cumple una de las básicas diferencias entre la inervación normal aferente de células ciliadas internas y externas por neuronas

auditivas tipo I y tipo II, respectivamente (Berglund and Ryugo, 1987).

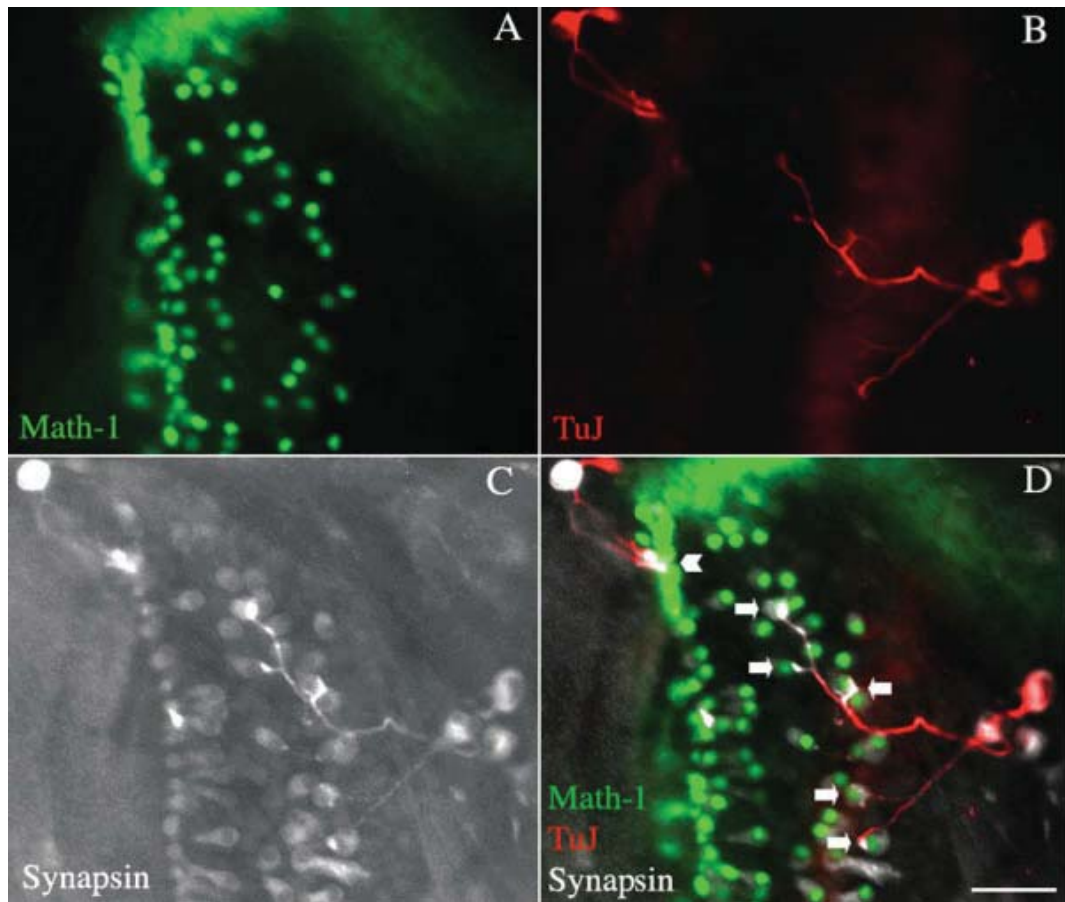


Figura 29. Expresión de un marcador sináptico en los puntos de contacto entre las neuronas auditivas trasplantadas y las células ciliadas en un explante de órgano de Corti denervado. a) Órgano de Corti de un ratón transgénico *Math1-nGFP* tratado con β -bungarotoxina $0,5\mu\text{M}$ durante 2 días. Las células ciliadas se observan en verde (*Math1-nGFP*). b) Tras el trasplante celular *in Vitro* se observan neuronas auditivas procedentes del tejido espiroganglionar de un ratón *C57/BL6*. Neuronas trasplantadas en rojo (β III-tubulina). c) Expresión de la proteína sináptica sinapsina (blanco) en los puntos de contacto entre las prolongaciones nerviosas y las células ciliadas. d) Imagen superpuesta. Las neuronas hicieron varios contactos con las células ciliadas externas (flechas), mientras que hubo contactos únicos con las células ciliadas internas (cabeza de flecha). Barra de medida es de $30\mu\text{m}$.

3.2. Trasplante de células madre del oído interno.

Realizamos un cultivo del explante del órgano de Corti denervado tras la β -bungarotoxina con las células madre procedentes del oído interno (Fig. 30a). Las neuronas diferenciadas de las esferas enviaban prolongaciones que eran atraídas hacia el órgano de Corti en nuestros cultivos (Fig. 30b). Estas neuritas se ramificaban y contactaban con múltiples células ciliadas externas. Los contactos se realizaban principalmente en la base de dichas células (Fig. 30b).

Para poder asegurar el origen de las neuronas donantes, las células madre se marcaron con bromodesoxiuridina (BrdU, marcador mitótico) previamente a su trasplante. De esta manera, las células proliferativas de las esferas incorporaban la BrdU, lo cual hace posible su identificación en la inmunocitología. Las células marcadas con BrdU, una vez trasplantadas, hicieron contacto con las células ciliadas del órgano de Corti (Fig. 30c). Cuando se utilizaron células madre aisladas del oído interno de ratones transgénicos *Thy1-CFP* también se diferenciaron en neuronas que enviaban ramificaciones en la dirección de las células ciliadas donde establecieron contactos con las células ciliadas (Fig. 30d).

Aproximadamente un total de 25 neuronas positivas a la β III-tubulina se diferenciaron por cada 100 esferas cultivadas. Estas neuronas establecieron un promedio de 10 contactos con las células ciliadas tanto internas como externas (n=12).

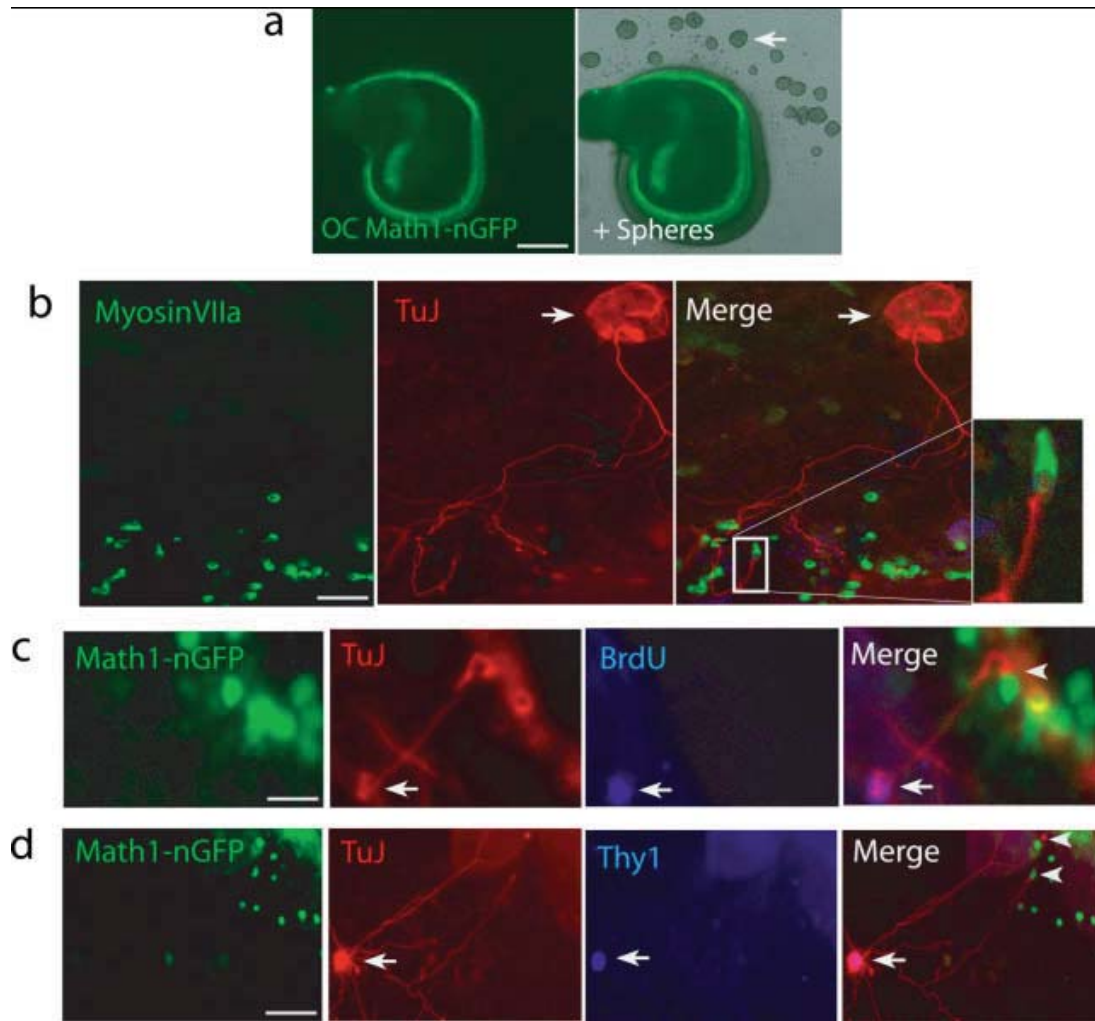


Figura 30. Reinervación del órgano de Corti por las células madre del oído interno diferenciadas en neuronas. a). Esferas cultivadas en proximidad al explante del órgano de Corti denervado por la β -bungarotoxina (la flecha señala la localización de una esfera). Las células ciliadas se muestran en verde (GFP). b). Tras 4-5 días es posible observar neuronas en el interior de las esferas que emiten prolongaciones y contactan con las células ciliadas (la flecha señala la localización de la esfera). c). Las células madre donantes fueron identificadas por la expresión del marcador mitótico BrdU previamente a su trasplante (flecha). La punta de flecha indica el contacto entre la neurona y la célula ciliada. d). Las células madre diferenciadas de ratones Thy1-CFP emitían prolongaciones hacia las células ciliadas. La punta de flecha indica los puntos de contacto. TuJ, anticuerpo con especificidad hacia la β III-tubulina (marcador neuronal). Barras de medida son de 150 μ m (a), 60 μ m (b, d) y 20 μ m (c).

DISCUSIÓN

1. Evolución histórica de la corrección de la hipoacusia neurosensorial.

Uno de los grandes retos en la investigación de la patología del oído interno es encontrar un tratamiento para la sordera neurosensorial. Durante mucho tiempo, se ha intentado corregir la hipoacusia mediante el empleo de numerosos artefactos cuya función consistía en intensificar la señal acústica (Fig. 31). Estos aparatos actuaban sobre los restos funcionales de un órgano deteriorado morfológicamente por la enfermedad.

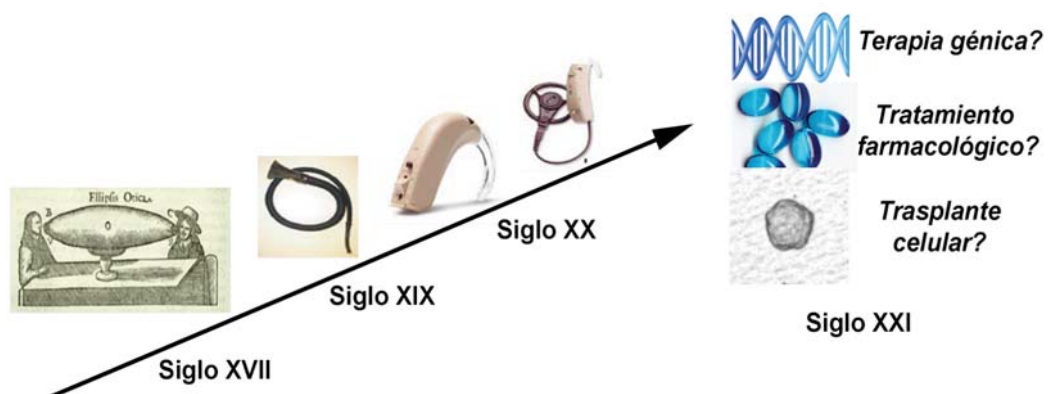


Figura 31. Evolución de la corrección de la hipoacusia neurosensorial. En el siglo XVII-XIX se utilizaban amplificadores mecánicos, en el siglo XX se utilizan las prótesis auditivas electrónicas y el implante coclear. Posible tratamiento de la hipoacusia neurosensorial en el siglo XXI mediante terapia génica, tratamiento farmacológico o trasplante celular.

Durante la primera parte del siglo XX los avances logrados en la investigación de la electricidad y su aplicación en la medicina hizo que surgieran las primeras prótesis auditivas electrónicas. En el año 1953 Djourno y Eyries realizaron la primera inserción de un implante

coclear en un paciente intervenido de un colesteatoma que había erosionado el laberinto (67). Posteriormente House, Michelson y Doyle perfeccionaron las aplicaciones clínicas de la estimulación eléctrica del nervio auditivo y empezaron a plantear la importancia de la inserción del implante coclear temprana debido a la mayor conservación de las neuronas auditivas (68, 69, 70).

Sin embargo, hasta el último tercio del siglo XX, no se plantea la posibilidad de revertir las lesiones cocleares como tratamiento del deterioro del oído interno. Así, en el año 1979, con el conocimiento de la sordera de causa inmunológica, McCabe realiza un tratamiento de la hipoacusia neurosensorial inmunológica con ciclofosfamida y corticoides (71). Posteriormente numerosos estudios experimentales y clínicos intentaron unificar criterios acerca de esta entidad (72).

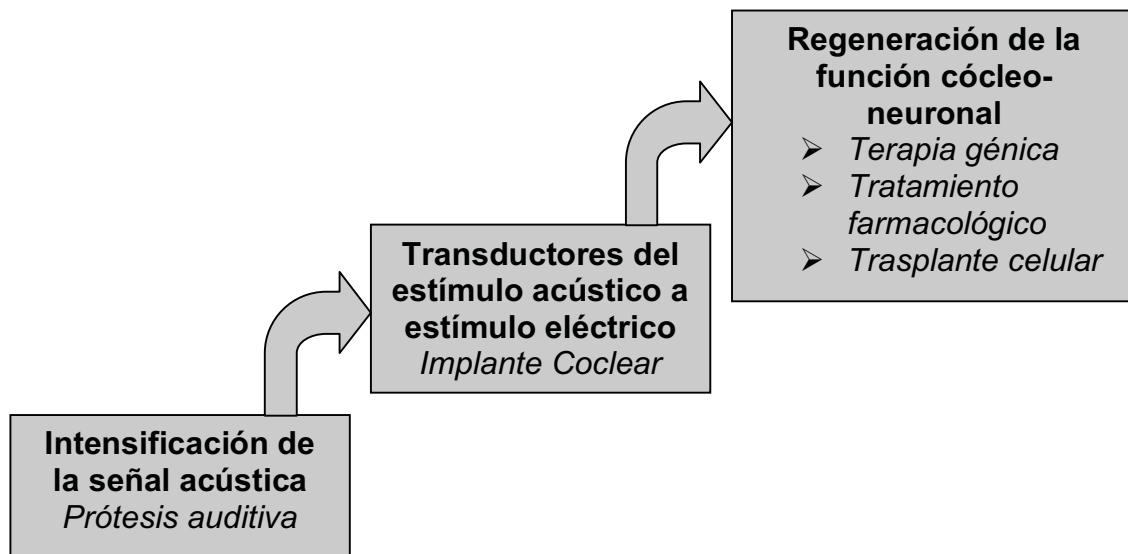


Figura 32. Evolución de las estrategias para el tratamiento de la hipoacusia neurosensorial.

La otología, a pesar de sus intentos por la búsqueda de tratamientos de la hipoacusia neurosensorial, continúa en la época de descripción de los fundamentos patológicos de diferentes

enfermedades de la cóclea. En los últimos años se están descubriendo nuevas alteraciones genéticas y degenerativas celulares que afectan a la función coclear, dando mayor importancia a otros tipos celulares de la cóclea, como por ejemplo las células de soporte (73, 74). Además, la observación de fenómenos apoptóticos en las células de la cóclea abre la opción de evitar dicha apoptosis con antioxidantes y terapia antiapoptótica (75). En el caso de una lesión irreversible de la cóclea el tratamiento ideal en el futuro buscaría la regeneración celular mediante la estimulación de la diferenciación celular de los restos celulares cocleares o mediante el trasplante de células progenitoras.

2. Estado actual de la corrección de la hipoacusia neurosensorial.

Actualmente es posible mejorar la calidad de vida y la inteligibilidad de algunos pacientes con hipoacusia neurosensorial gracias a las prótesis auditivas. Los avances tecnológicos han aumentado la versatilidad y la capacidad de intensificación del sonido de estas prótesis. Sin embargo, continúan sin ser útiles en bastantes casos de hipoacusia neurosensorial. También suponen un importante gasto económico para el paciente y, además, un número grande de los usuarios son personas mayores con dificultades para el manejo de las prótesis. El implante coclear consiste en otra modalidad de tratamiento en el que se convierte la vibración sonora en una señal eléctrica. Esta nueva señal se transmite a las neuronas aferentes residuales de la cóclea que se encargan de, a través de diferentes estaciones sinápticas, alcanzar los centros auditivos del sistema

nervioso central. La implantación de esta tecnología requiere un tratamiento quirúrgico con la apertura del oído interno y la inserción de un electrodo. A pesar de los avances y del aumento de éxitos aún existen numerosos factores desconocidos que influyen en los resultados del implante por lo que el grado de éxito no es predecible. La población neuronal y el estado del nervio auditivo influyen en el resultado del implante coclear, particularmente en la capacidad de inteligibilidad y comprensión verbal tras la implantación protésica. En nuestro estudio creamos un modelo experimental de pérdida neuronal en el órgano de Corti para estudiar la regeneración celular de la población neuronal.

3. Importancia de la población neuronal en el nervio auditivo.

La mayoría de los estudios de hueso temporal en casos de hipoacusia neurosensorial profunda revelan una supervivencia importante de la población de neuronas espiroganglionares. Aunque la supervivencia neuronal varía con la etiología, los estudios histológicos han mostrado que el porcentaje de supervivencia neuronal ronda entre un amplio margen del 10 al 70% del número normal de entre 35.000-40.000 neuronas aferentes cocleares. Estas neuronas supervivientes normalmente están distribuidas a lo largo de las espiras cocleares (76, 77, 78). La supervivencia neuronal tiende a ser mayor en hipoacusias provocadas por ototóxicos y menor en casos de hipoacusias provocadas por infecciones bacterianas. La pérdida neuronal en una persona sana ocurre en un número de unas

2.000 neuronas perdidas por década debido a cambios degenerativos únicamente. En los casos de hipoacusia profunda, pacientes ancianos y en hipoacusias de larga evolución se producen pérdidas mayores en la población de neuronas espiroganglionares (77). La importancia del tamaño de la población celular del ganglio espiral no está aún definida debido a que no existe una clara relación entre la etiología de la hipoacusia y el éxito en la inteligibilidad verbal con un implante coclear (79). Además, la evidencia de la presencia de la población neuronal se basa en estudios con microscopio óptica, la cual suministra solamente una muy limitada información de la funcionalidad de las neuronas auditivas. Otras características de las neuronas como el estado de las prolongaciones periféricas, la mielinización y la existencia de axones no son estudiadas en las muestras de hueso temporal observadas mediante microscopio óptica.

El número mínimo de neuronas aferentes necesarias para conseguir una buena inteligibilidad ha sido estudiado en diferentes artículos en los cuales se ha hallado una correlación entre los resultados en la audiometría verbal y las reservas neuronales. Aproximadamente entre un tercio y un sexto de la población neuronal es necesaria para un reconocimiento verbal socialmente útil (80). Kerr y Schuknecht sugirieron que las neuronas situadas en las regiones de la parte superior de la espira basal y de la segunda espira (15-22 mm. de la membrana de la ventana redonda) eran las más importantes para la preservación de la inteligibilidad verbal (81). Otte y colaboradores concluyeron que por lo menos 10.000 neuronas espiroganglionares, con 3.000 o más en la porción apical de la cóclea, eran requeridas para la preservación de la discriminación verbal en casos de hipoacusia neurosensorial con poblaciones de células

ciliadas residuales (11). El número mínimo de neuronas auditivas necesarias para conseguir un buen reconocimiento verbal con un implante coclear es aún desconocido.

4. Terapia celular.

La posibilidad de un tratamiento biológico para la hipoacusia neurosensorial ha ganado interés en los últimos años. Aunque los resultados funcionales auditivos conseguidos con las modernas ayudas auditivas (prótesis e implantes cocleares), eran impensables hace unos treinta años, existe un considerable esfuerzo en la investigación del oído interno en revertir los daños morfológicos y, en consecuencia, funcionales del órgano de Corti.

En la cóclea es importante el mantenimiento de la organización tonotópica en las nuevas células debido a la importancia para la discriminación y el procesamiento de sonidos. Cada parte de la espira coclear está encargada de transmitir una determinada frecuencia tonal y esta distribución espacial deberá ser conservada tras la terapia celular.

El objetivo de los investigadores en terapia celular es reparar la cóclea dañada mediante:

1. Regeneración celular del tejido dañado, mediante la estimulación de las células endógenas residuales empleando fármacos o vectores virales.
2. Reemplazando el tejido dañado mediante el trasplante celular de células troncales.

Un ejemplo de la regeneración celular a nivel coclear podría ser la diferenciación de células de soporte residuales en células ciliadas, las cuales, mantendrían la tonotopía celular necesaria para la diferenciación del espectro sonoro.

Un ejemplo del reemplazamiento celular sería el trasplante de células troncales en el ganglio espiral. Un beneficio alternativo sería la posibilidad de que estas nuevas células sintetizaran y secretaran factores necesarios para la supervivencia de las células residuales cocleares, como por ejemplo factores neurotróficos (BDNF, NT3...).

Como un inconveniente de ambas técnicas sería la posibilidad de generar células con una alta capacidad proliferativa que provoquen la aparición de posibles tumores celulares (82).

La terapia celular tiene el potencial para convertirse en una herramienta importante para el tratamiento de enfermedades degenerativas como la enfermedad de Parkinson, la diabetes o la hipoacusia neurosensorial. Los resultados iniciales observados con la terapia con células madre para estas enfermedades indican que las células madre pueden formar tipos celulares altamente diferenciados que son activas funcionalmente en modelos animales (65, 83, 84, 85).

El descubrimiento reciente de la existencia de células madre en el oído interno proporciona esperanza a los pacientes con hipoacusia neurosensorial y abre una nueva vía de investigación para el desarrollo de estrategias para restablecer la pérdida auditiva. Uno de los problemas en la investigación del oído interno es la escasez de células que se obtienen en las disecciones del oído interno de animales de experimentación. Con la propagación y diferenciación de las células madre pueden obtenerse un número elevado de células del oído interno. Estas células pueden ser utilizadas para estudios de trasplante celular. Adicionalmente pueden servir para probar nuevos

fármacos que prevengan la muerte celular o para probar terapias génicas previamente a su utilización in vivo (Fig. 33).

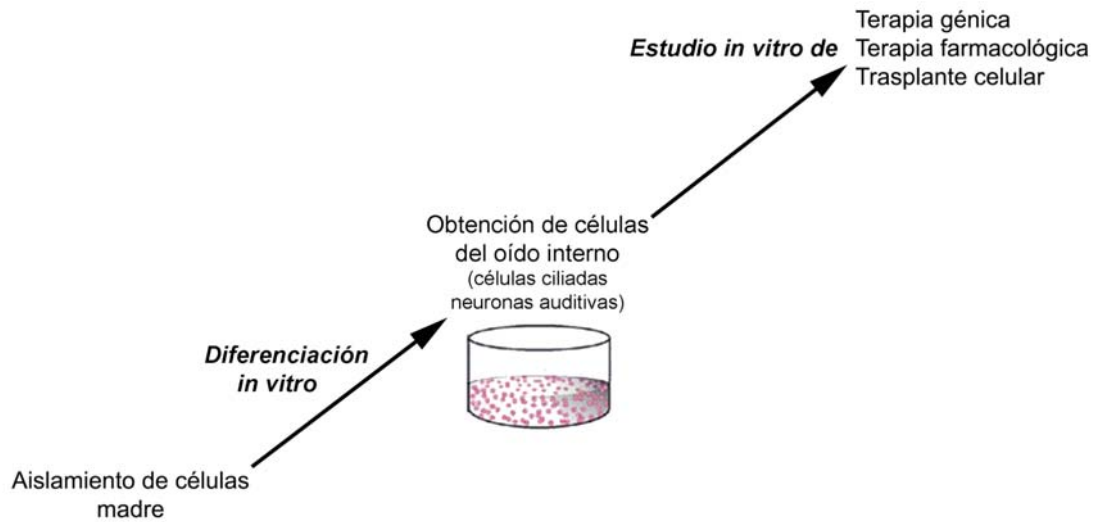


Figura 33. La obtención de células del oído interno mediante la diferenciación de las células madre puede ser utilizada para la búsqueda de nuevos tratamientos como la terapia génica, tratamientos farmacológicos o el trasplante celular.

5. Denervación de un explante del órgano de Corti.

Para realizar el estudio de la regeneración de las neuronas auditivas se plantea la posibilidad de diseñar un modelo experimental en el que se eliminen selectivamente las neuronas auditivas aferentes cocleares sin lesión de las células ciliadas. Aunque existen en la literatura diversos modelos de eliminación de las células ciliadas, aún no se ha descrito un sistema *in Vitro* de eliminación selectiva de las

neuronas espiroganglionares en el órgano de Corti.

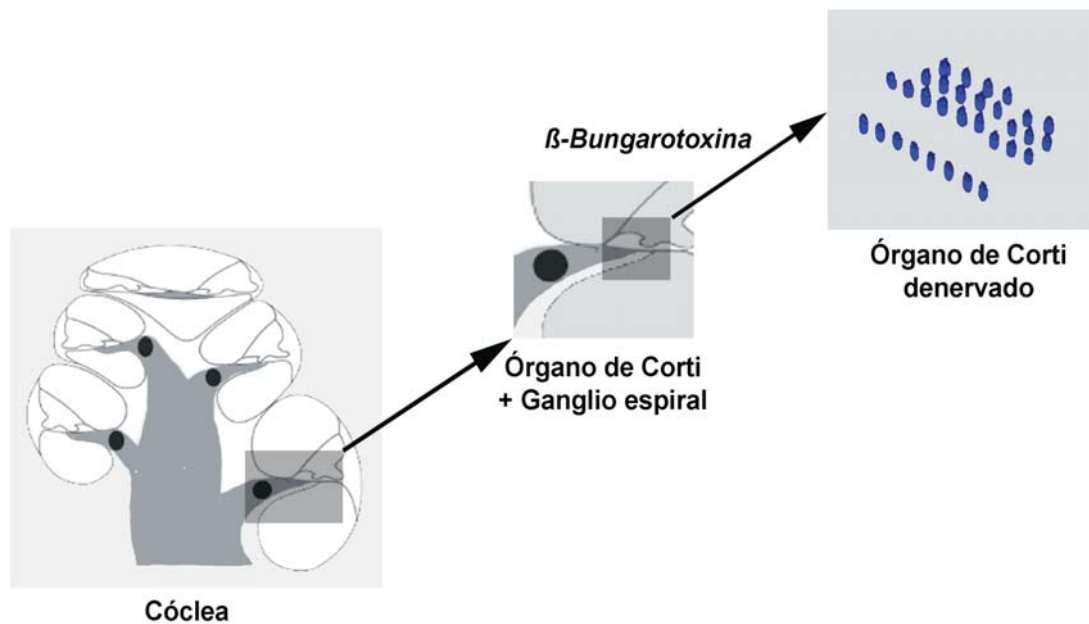


Figura 34. Método para la creación de un modelo experimental de órgano de Corti denervado. Tras la disección del órgano de Corti de la cóclea se aplica β-bungarotoxina que elimina las neuronas auditivas dejando las células ciliadas indemnes. El órgano de Corti se muestra con las tres hileras de células ciliadas externas y la hilera única de células ciliadas internas.

Es conocido que las neuronas espiroganglionares son eliminadas junto a las células ciliadas por el agente citotóxico cisplatino (86, 87). Los aminoglucósidos eliminan las neuronas espiroganglionares pero lo hacen de forma secundaria a la eliminación de las células ciliadas (88) por lo que impide el estudio de la regeneración neuronal hacia las células ciliadas.

Existe un modelo *in vivo* de degeneración neuronal auditiva utilizando la ouabaína como neurotóxico (89, 90); en él, este inhibidor de la bomba ATPasa Na⁺/K⁺ es inyectado en el nicho de la ventana redonda y difunde a través de dicha membrana afectando el nervio auditivo. En un sistema *in Vitro* esta toxina afectaría

posiblemente a las células ciliadas (91).

- Cisplatino (Ding, 1999)
- Aminoglucósidos (McFadden, 2003)
- Ouabaína (Schmiedt, 2002)
- Ácido acetilsalicílico (Zheng y Gao, 1996)
- Ratones transgénicos knockout:
 - TrkB, TrC (Farinas, 1994)
 - NT3 (Ernfors, 1995)
 - BDNF (Schimmang, 1995)
 - Brn3a (Huang, 2001)
 - NeuroD (Kim, 2001)
 - Ngn1 (Ma, 2000).

Tabla IV. Modelos experimentales de degeneración neuronal en el oído interno (86, 88, 89, 82, 50, 51, 19, 93, 52, 45, 65, 94).

El ácido acetilsalicílico también ha sido utilizado en cultivos de órgano de Corti, demostrándose su toxicidad sobre las neuronas auditivas (82). Los ratones transgénicos con mutaciones dirigidas a afectar genes necesarios para la formación del tejido espiroganglionar son modelos potenciales para la creación de un sistema *in Vitro* de degeneración neuronal del órgano de Corti. Algunos de estos animales como el *TrkB*, *TrkC*, *NT3*, *BDNF*, *Brn-3a*, y el *NeuroD knock-out* no han sido útiles debido a que mantienen una innervación parcial de las células ciliadas (50, 51, 19, 94, 52, 45, 65). Otro tipo de ratón transgénico como el *Brn3c knock-out* no es útil debido al desarrollo incompleto de las células ciliadas (96). Los ratones transgénicos con una mutación en el factor de transcripción *ngn1* (95) no desarrollan neuronas auditivas y pueden ser útiles como modelo para estudiar la regeneración celular aunque la cóclea de estos animales es de menor tamaño y de una morfología anormal en el nacimiento (P0). La falta de desarrollo de neuronas auditivas

comparándola con la pérdida de neuronas tras la maduración celular puede ser menos representativa de la hipoacusia neurosensorial en humanos provocada por el daño neuronal. Además, las neuronas degeneradas pueden suministrar señales celulares que no estarían presentes en un oído que nunca fue inervado.

En nuestro modelo experimental, los estudios de regeneración neuronal son posibles debido a que la β -bungarotoxina induce la apoptosis en las neuronas aferentes del órgano de Corti (Fig. 34). La β -bungarotoxina es extraída de una serpiente de procedencia taiwanesa y fue descrita por primera vez como una toxina de la unión neuromuscular que disminuía el número de vesículas presinápticas en la motoneurona. Los estudios realizados con esta toxina en la unión neuromuscular han llevado a considerarla como una toxina con acción presináptica (97). La toxina está formada por dos polipéptidos unidos por un puente disulfuro: subunidad A, la cual es una fosfolipasa A2 Ca^{++} -dependiente, y la subunidad B, que está formada por un canal de K^+ unido a subunidades homólogas de inhibidores de proteasas. Se cree que la toxina actúa uniéndose a canales de K^+ e induciendo un aumento del Ca^{++} intracelular que provoca la muerte celular (60, 98).

En nuestros estudios hemos comprobado que las neuronas espiroganglionares son eliminadas por la β -bungarotoxina mediante una unión específica a las neuronas auditivas seguida de la inducción de la apoptosis. Como se cree que la β -bungarotoxina se une a los canales de K^+ sensibles al voltaje (60), la unión de la toxina a las neuronas auditivas indica que estos canales son expresados en estas células en el momento del nacimiento. La razón por la que las células ciliadas no se afectan a la debida concentración de β -bungarotoxina no está clara, aunque podemos especular que los receptores para esta

toxina se encuentran en una menor concentración en la superficie de las células ciliadas en la cóclea postnatal, antes de la completa diferenciación de las sinapsis de las neuronas aferentes con las células ciliadas. Las células ciliadas expresan canales de K^+ sensibles al voltaje que cambian sus características funcionales en el intervalo entre el nacimiento y la instauración de la audición (99) y por lo tanto es de esperar algún daño celular en estas células también. Sin embargo, en nuestros resultados, encontramos que la β -bungarotoxina no se unía específicamente a las células ciliadas ni causaba su eliminación en la concentración que provocaba la destrucción neuronal. Este hecho, nos permite emplear a esta neurotoxina como un denervador selectivo del órgano de Corti que respeta las células ciliadas.

La endocitosis de la β -bungarotoxina está mediada por un receptor tras la unión a los canales de K^+ o a receptores NMDA (100). Provoca un aumento del Ca^{++} intracelular y la generación de elementos de la cadena oxidativa (ROS, reactive oxygen species) (99). En estudios preliminares se comprobó que la β -bungarotoxina destruía las neuronas auditivas en el pollo (101). Las prolongaciones periféricas de las neuronas espiroganglionares constituyen la parte postsináptica de la sinapsis formada con las células ciliadas, por lo tanto la toxina está actuando en la parte postsináptica de la sinapsis aferente coclear. Tras la administración de la toxina, estas células sufren fenómenos apoptóticos debidos presumiblemente a un aumento del Ca^{++} intracelular y a un aumento en los radicales de oxígeno. El modelo de degeneración neuronal con la β -bungarotoxina es útil como modelo experimental debido a que la apoptosis parece ser el mecanismo por el cual se produce la pérdida neuronal in vivo.

6. Obtención y caracterización de las células madre del oído interno.

En los últimos años la comunidad científica ha prestado una considerable atención a la función terapéutica de las células madre en diferentes enfermedades como la diabetes, las enfermedades cardíacas y la enfermedad de Parkinson entre otras. La mayoría de estas investigaciones se basan en la observación de que las células madre tras el trasplante son capaces de diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares. Por lo tanto, las células madre tienen el potencial para ser utilizadas terapéuticamente para reemplazar los tejidos que han sido perdidos por la enfermedad.

El término “células madre” puede interpretarse como poco definitorio debido a que es aplicado a diferentes tipos celulares. En resumen, una célula madre se define por su capacidad para auto-renovarse y para producir células que se diferencian en distintas estirpes embrionarias (ectodermo, mesodermo, endodermo) (Fig. 35) (102, 103).

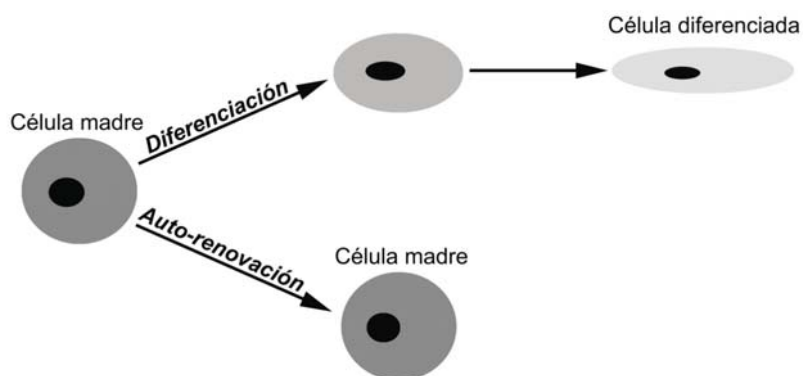
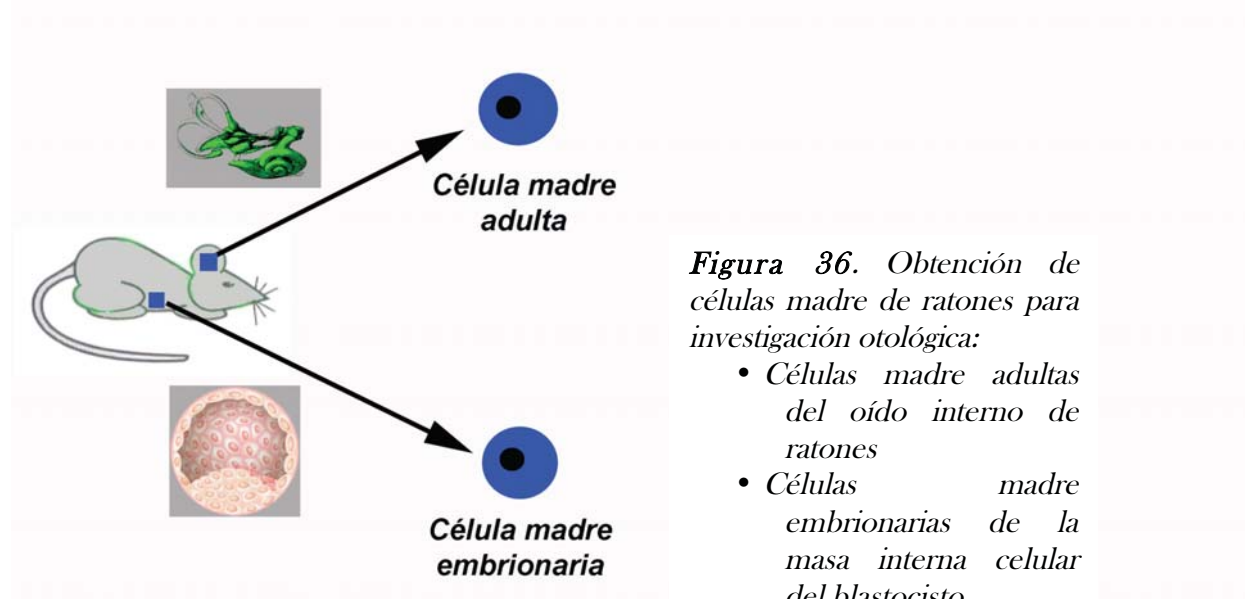


Figura 35. Una célula madre debe ser capaz de dividirse mediante mitosis y producir, en la progenie, una célula similar y una célula que pueda diferenciarse

en las diferentes estirpes embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo).

Las células madre dependiendo de su origen se clasifican en células madre embrionarias y en células madre adultas (Fig. 36).

Las células madre embrionarias se obtienen de la masa celular interna del blastocisto. En este periodo del desarrollo estas células no han empezado a diferenciarse y se describen como “pluripotenciales” debido a que mantienen la capacidad para diferenciarse en células mesodérmicas (óseas, sanguíneas, musculares), endodérmicas (endoteliales) y ectodérmicas (epidérmicas, neuronales) (104).



Células madre adultas. En numerosos tejidos adultos se ha comprobado la existencia de células que comparten las características de las células madre (auto-renovación y diferenciación). Estas células parecen relativamente más limitadas en los tipos de progenitores que pueden formar; se las describe como “multipotenciales” en comparación con el término pluripotenciales de las células embrionarias. Existen evidencias de su existencia en médula ósea

(102, 103), en la retina (105), piel, intestinos, hígado, testículos y placenta (106, 102, 107).

La “transdiferenciación celular” es un mecanismo por el cual las células madre adultas pueden diferenciarse en células de diferentes estirpes embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). Se ha propuesto que esta conversión celular ocurre por la activación de un programa de diferenciación latente que altera la especificidad celular (108).

La observación de esta transdiferenciación de las células madre adultas hace pensar en una aplicación terapéutica de estas células en tejidos con un potencial limitado de regeneración celular.

Respecto a las células madre del oído interno, en nuestros experimentos se ha demostrado que, además de en el aparato vestibular, en la cóclea de los mamíferos también existen células madre (109) (Fig. 37). Estas células son de características diferentes a las células normales postmitóticas presentes en el órgano de Corti y en el sistema vestibular (109, 110, 111, 112).

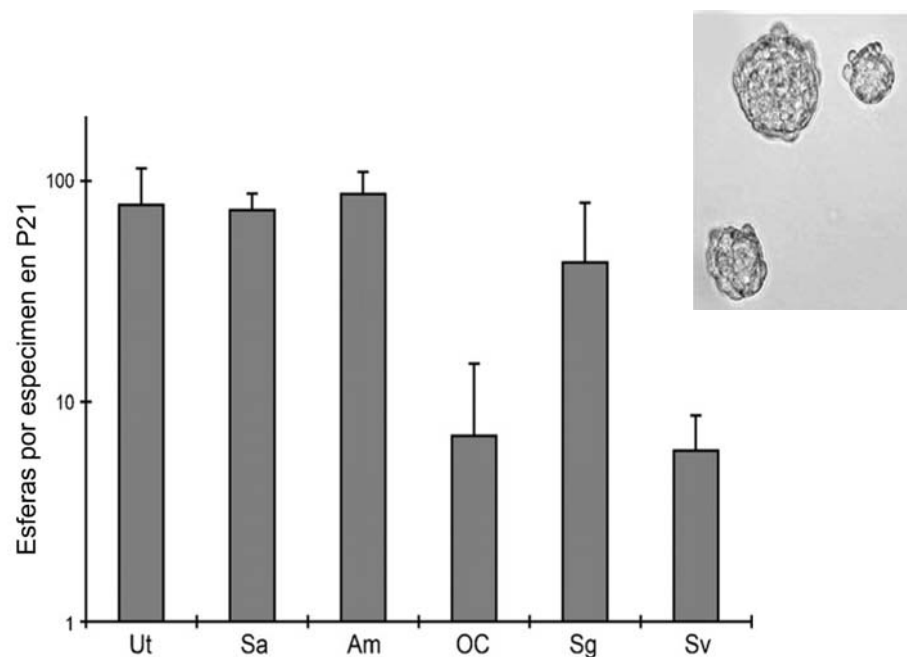


Figura 37. Número de esferas obtenidas en la disección de diferentes

partes del oído interno. *Ut* (utrículo), *Sa* (sáculo), *Am* (ampolla), *OC* (órgano de Corti), *Sg* (tejido espiroganglionar) y *Sv* (estría vascular).

De esta manera las células madre también han sido aisladas del órgano de Corti y del tejido espiroganglionar del ratón (109, 110, 111, 112). En humanos también se han aislado células progenitoras procedentes del ganglio espiral (113).

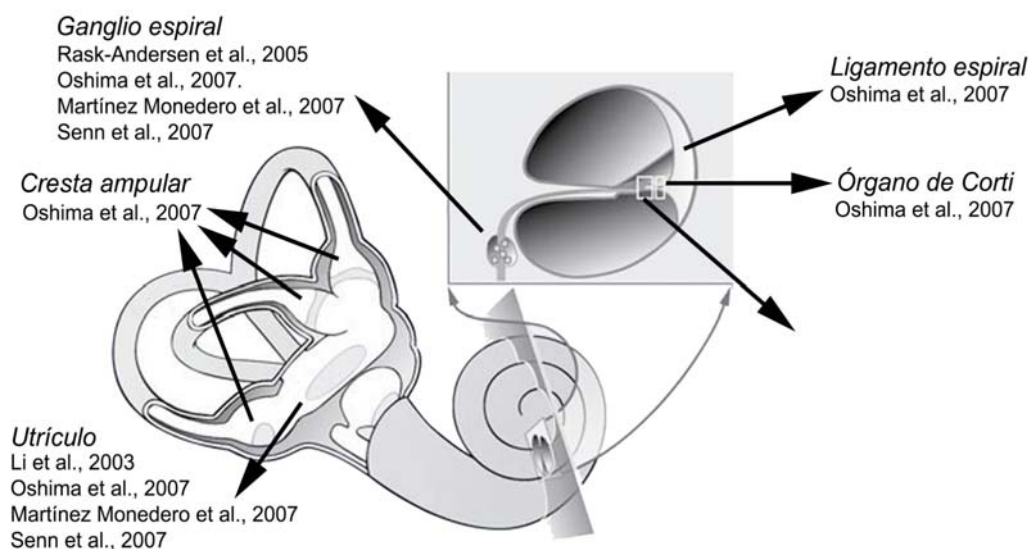


Figura 38. Obtención de células con características de células madre en diferentes localizaciones del oído interno. Modificación de Senn P y Heller S, *HNO* 2008; 56: 21-2.

La capacidad para la formación de las esferas disminuye con la edad. En la cóclea, la formación de esferas puede ser demostrada en embriones y en animales recién nacidos pero, en los adultos, sólo puede formarse un número reducido de esferas (Fig. 39). En el sistema vestibular la formación de esferas se mantiene en el animal adulto, aunque en un menor número. De esta manera, los órganos vestibulares pueden regenerar algunas células ciliadas a lo largo de la

vida mientras que la cóclea no (38).

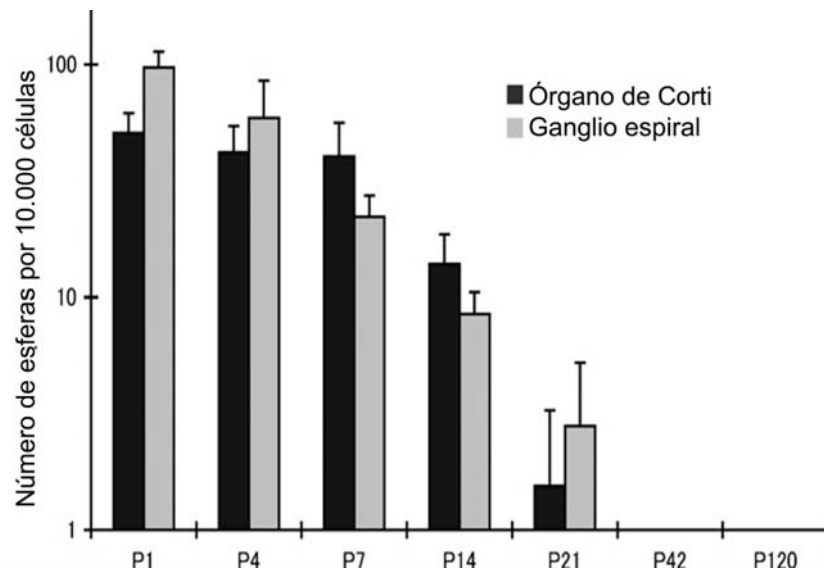


Figura 39. Disminución en la obtención de esferas en el órgano de Corti y en ganglio espiral con la edad. A partir de P21 (21 días postnatal) en el órgano de Corti y en el ganglio espiral no existen células proliferativas y, por lo tanto, no se obtienen esferas.

Las células vestibulares formadoras de esferas se encuentran a lo largo de la vida del ratón, mientras que las células madre cocleares parecen desaparecer en el período postnatal (109).

La inducción de la diferenciación de las células madre del oído interno tiene como resultado la expresión de marcadores para las células ciliadas (109) y, además, estas células se formaban en lugares rodeadas de células con marcadores de células de soporte.

La comunidad científica se pregunta actualmente por el lugar donde se localizan las células que dan lugar a las esferas *in Vitro*. Existen algunas evidencias que sugieren que las células progenitoras se pueden localizar en el gran surco epitelial del oído interno en el recién nacido. En el embrión, la nestina (marcador de progenitores

neuronales) expresada como GFP (green fluorescence protein) se ha encontrado en el gran surco epitelial (114) además de en las células falángicas y las células de Deiters. Postnatalmente, la nestina se ha encontrado en las células de soporte, aunque la expresión fue menor tras el desarrollo y tan solo unas pocas células de Deiters fueron positivas a los 60 días de vida. Existe la posibilidad de que las células de soporte sean los precursores celulares en la cóclea, ya que se ha comprobado que tienen la capacidad para diferenciarse en células ciliadas tras la transducción viral con el gen *Math1* (115, 82). El hallazgo de que las células de soporte tienen la capacidad para dividirse y diferenciarse en células ciliadas *in Vitro* (24) sugiere que pueden jugar un papel en la regeneración celular. Su capacidad para diferenciarse en otros tipos celulares se limita a los ratones recién nacidos y no ocurre en ratones de dos semanas de edad. Esta característica está relacionada con los resultados obtenidos por Oshima y colaboradores, los cuales muestran que el número de células madre disminuye en las primeras semanas tras el nacimiento.

Se desconoce aún si las células del tejido espiroganglionar llevan a cabo divisiones celulares. La formación de esferas procedentes del tejido espiroganglionar de ratones en el periodo postnatal sugiere la posibilidad de que el tejido espiroganglionar pueda tener células con propiedades de células madre (109, 110, 111, 112). Estas células proliferan en esferas y tienen la capacidad para diferenciarse en neuronas *in Vitro*. El protocolo de diferenciación es similar al utilizado con las células madre del órgano de Corti o del epitelio sensorial vestibular. Estas células madre pueden dar origen a células ciliadas, neuronas y células gliales. Por lo tanto, pueden ser similares en su capacidad de diferenciación a los progenitores celulares de la vesícula ótica que se diferencian en células de soporte, células ciliadas

y neuronas en el embrión. Otros autores han demostrado la presencia de progenitores neuronales en el nervio auditivo humano. Estos progenitores eran positivos a la nestina y se dividían y expresaban marcadores de neuronas sensoriales como los receptores de los factores neurotróficos TrkB y TrkC (113).

En nuestros experimentos se investigó el potencial de las células madre procedentes del oído interno para formar neuronas que podrían ser utilizadas para estudios de reinervación de las células ciliadas de la cóclea tras un daño neuronal.

Se estudió, mediante la expresión de marcadores neuronales, el tipo de neuronas obtenido; estando principalmente interesados en la obtención de neuronas sensoriales.

- **Neuronas sensoriales**, sensibles a varios estímulos no neurales. Hay neuronas sensoriales en el oído, ojo, piel, músculos, articulaciones, y órganos internos que indican presión, temperatura, y dolor.
- **Neuronas motoras**, capaces de estimular las células musculares, incluyendo los músculos del corazón, diafragma, intestinos, vejiga, y glándulas.
- **Interneuronas**, proporcionan conexiones entre las neuronas sensoriales y las neuronas motoras, al igual que entre ellas mismas. Las neuronas del sistema nervioso central, incluyendo al cerebro, son todas interneuronas.

Tabla V. Tipos de neuronas según su función.

Para conseguir la regeneración celular se necesitaría producir neuronas auditivas funcionales procedentes de las células madre del oído con la capacidad para formar sinapsis con las células ciliadas. Las células madre del oído interno suponen un potencial suministro para reemplazar cualquier tipo de célula dañada en el oído interno. Nuestros experimentos se centraron en la producción de neuronas. Se consiguió determinar el tipo de neuronas diferenciadas así como

su actividad funcional. Del mismo modo que las células madre procedentes del sistema nervioso central, las del oído interno tienen la capacidad para formar esferas que contienen células multipotenciales que proliferan y expresan marcadores típicos de células madre. Li y colaboradores en el año 2003 demostraron que estas células madre del oído interno pueden diferenciarse en células de las tres estirpes embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) (46). La diferenciación de estas células madre del oído interno en neuronas sensoriales parece tratarse de un programa innato que puede activarse mediante el cultivo in Vitro de las células madre con ácido retinoico y con la ausencia de factores de crecimiento.

Uno de los objetivos de nuestros experimentos fue entender las señales que guían la diferenciación neuronal de las células madre del oído interno (Fig. 40). La proporción de neuronas periféricas y sensoriales se podía aumentar con el tratamiento con ácido retinoico a través de un aumento en la expresión de *Pax2*, un factor de transcripción responsable de la organización de las placodas craneales. *Pax2* es expresado en células progenitoras neuronales embrionarias cuando se desprenden de la vesícula ótica y forman el ganglio vestíbulo-acústico (61, 62, 65). Al ser *Pax2* un marcador temprano de la vesícula ótica, su expresión en las células procedentes de las células madre indicaba que las células habían entrado en un programa característico de los progenitores celulares óticos. De acuerdo con esta hipótesis, estas células en proceso de diferenciación procedentes de las células madre fueron positivas para otros marcadores típicos de neuroblastos de la vesícula ótica del ratón. Así, *Islet1*, *Brn3a*, NeuroD y *GATA3* se expresaban en estas células de la misma manera que todos ellos se encuentran en los progenitores

neuronales de la vesícula ótica (52, 65, 55). Marcadores de diferenciación similares se han observado en líneas celulares derivadas del oído interno en diferentes condiciones de cultivo (116). Las células diferenciadas procedentes de las células madre también expresaron marcadores de neuronas auditivas y vestibulares como TrkB, TrkC y calretinina (117, 50, 51, 62, 63). La comparación de las esferas derivadas del ganglio espiral y de las esferas derivadas del utrículo indicaba que el tratamiento con ácido retinoico provocaba un número similar de neuronas sensoriales en los dos orígenes celulares.

Los genes que se expresan de una manera más amplia en los progenitores neuronales del desarrollo embrionario se encontraron en las células madre procedentes del oído interno en etapas tempranas de la diferenciación. De esta manera se expresaba *Sox2*, un gen que mantiene la pluripotencialidad de las células madre (118) y que es necesario para el desarrollo temprano de las células del oído interno (119), también *Tbx3* y *Tcl1* (120), dos genes requeridos para la auto-renovación de las células madre embrionarias humanas. La *nestina*, una proteína de los filamentos intermedios que se expresa en progenitores neuronales del sistema nervioso central (121), se expresaba en los progenitores celulares que se diferenciaban en neuronas. Las células que expresaban *nestina* en las esferas se encontraban en áreas diferentes a las células que expresaban marcadores de células ciliadas, sugiriendo que la especificación de un destino neuronal o de célula ciliada se había realizado previamente, de una manera similar a la determinación temprana del destino celular en las células precursoras del otocisto (122, 123, 124). La similitud en el tiempo y en la expresión de marcadores en las células madre con la expresión en las células embrionarias de la vesícula ótica sugiere que estas células pueden ser utilizadas como un modelo

para estudiar el desarrollo del oído interno.

En el ratón transgénico *Pax2 knockout* se observó un requerimiento de la expresión de *Pax2* para la formación de neuronas sensoriales, en este animal las neuronas espiroganglionares así como las neuronas en el ganglio olfatorio y óptico no se desarrollaron (61) o desaparecieron tras el desarrollo temprano, mientras que las células ciliadas se desarrollaban (64). Aunque la falta de neuronas espiroganglionares en estos animales se ha atribuido a la pérdida de las células del epitelio sensorial que normalmente suministran los factores necesarios a las neuronas (64), las células espiroganglionares se desarrollan en animales que no expresan *Math1* y no tienen células ciliadas (124) sugiriendo que existe un efecto directo de *Pax2* sobre la falta de neuronas espiroganglionares en el ratón *Pax2 knockout*. El aumento de expresión de *Pax2* con el tratamiento de los cultivos celulares con ácido retinoico se acompañaba de una disminución de la expresión de *Pax6*, consistente con el desarrollo de los progenitores neuronales hacia un fenotipo sensorial. *Pax6* se expresa en los precursores de las motoneuronas que posteriormente expresarán HB9 (125). *Pax2* y *Pax6* juegan unos papeles opuestos en la etapa embrionaria y se regulan de una manera opuesta, con la expresión de *Pax2* disminuye la expresión de *Pax6* mediante una interacción con su promotor (126). Esta acción contraria permite a los dos factores definir fronteras en el desarrollo embrionario como por ejemplo entre la copa y el tallo óptico (126) y entre el cerebro anterior y posterior (127). Ambos genes se necesitan para el desarrollo adecuado del ojo (61) y juegan un origen común en la evolución (128).

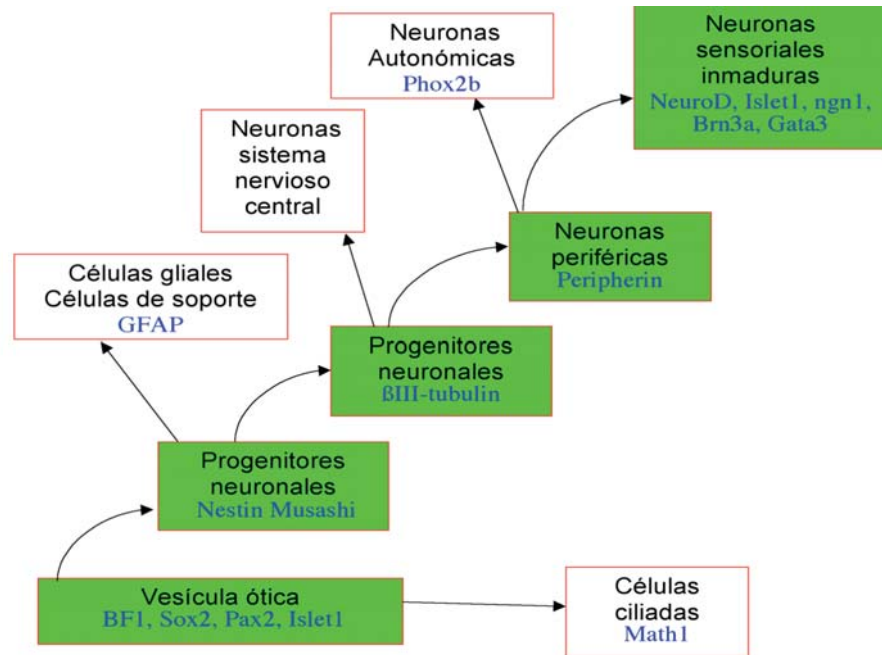


Figura 40. Expresión de marcadores en la diferenciación de los progenitores óticos hacia las neuronas sensoriales auditivas.

En nuestros experimentos aumentamos la formación de neuronas procedentes de las células madre mediante el uso de ácido retinoico. Esto es consistente con el desarrollo embrionario del oído: las enzimas que convierten el retinol en all-trans ácido retinoico, *RALDH2* y *RALDH3* se expresan en las neuronas espiroganglionares de los recién nacidos (129, 130). El ratón transgénico *RALDH2 knockout* tienen una alteración en el desarrollo neuronal. Este efecto parece estar mediado por una disminución de la expresión de *Pax2* (131). Aunque la unión del ácido retinoico al promotor en el intrón 2 disminuye la síntesis de **BMP4** en las líneas celulares del oído interno (132), este mecanismo no parece ser el responsable en nuestros experimentos debido a que la expresión de **BMP4** no cambió; además sonic hedgehog tuvo un efecto pequeño, por lo que el ácido retinoico no debería actuar en esta vía.

El ácido retinoico y el sonic hedgehog han sido utilizados para la diferenciación de células madre de la médula ósea en neuronas sensoriales (133). Efectos de estimulación del desarrollo neuronal con el ácido retinoico han sido observados de forma similar a la nuestra cuando se han empleado células madre del sistema nervioso central (134). Los progenitores de la médula espinal no poseen la capacidad para la generación de motoneuronas *in Vitro* y no forman neuronas funcionales *in vivo* tras el tratamiento con ácido retinoico o sonic hedgehog (135, 136). Nuestros resultados sugieren que el ácido retinoico aumenta la expresión de *Pax2*, la cual puede disminuir la expresión de *Pax6* y, por lo tanto, disminuir la formación de motoneuronas. Sería interesante determinar si el ácido retinoico tiene el mismo efecto sobre las células madre del sistema nervioso central o si esta respuesta al ácido retinoico es específica de los progenitores sensoriales neuronales.

6.1. Registro electrofisiológico de las neuronas diferenciadas de las células madre utriculares.

Las células madre derivadas del oído interno dieron lugar a neuronas con características de neuronas sensoriales en la inmunocitoquímica. Se comprobó su actividad funcional mediante estudios de electrofisiología. Se encontraron corrientes de sodio sensibles a la tetrodotoxina (TTX) y corrientes de potasio de alto voltaje, pudiendo grabarse potenciales de acción en el 40% de las células diferenciadas de las células madre. La aplicación de glutamato (neurotransmisor en la sinapsis célula ciliada-neurona auditiva) provocó la aparición de corrientes mediadas por los receptores AMPA (Tabla VI). Datos más específicos de neuronas

espiroganglionares o de neuronas vestibulares incluyen las corrientes de potasio de bajo voltaje sensibles a la dendrotoxina y corrientes activadas por la hiperpolarización, I_h (137, 138, 139). En nuestros experimentos, los datos electrofisiológicos de las neuronas espiroganglionares y de las células madre diferenciadas con ácido retinoico fueron muy similares y, por lo tanto, estas corrientes iónicas estaban en la mayor parte de los casos ausentes en ambos tipos celulares (Tabla VI) (112). Sin embargo, cuando cultivamos el órgano de Corti y realizamos grabaciones de las neuronas espiroganglionares localizadas en este órgano, estas corrientes pudieron ser halladas (Yi and Glowatzki, pendiente de publicación), lo que sugiere que las neuronas auditivas pierden la funcionalidad de estas corrientes iónicas cuando se cultivan aisladamente. Las corrientes se perdieron en las diferentes condiciones estudiadas, incluyendo la disociación enzimática y mecánica.

Electrograbación de corrientes	<i>Neuronas derivadas de células madre</i>	<i>Neuronas auditivas in Vitro</i>	<i>Neuronas auditivas en órgano de Corti</i>
Corrientes de Na^+ sensibles a TTX	+	+	+
Corrientes de K^+ de alto voltaje	+	+	+
Corrientes activadas por el glutamato	+	+	+
Corrientes de K^+ de bajo voltaje (sensibles a dendrotoxina)	-	-	+
Corrientes de hiperpolarización (I_h)	-	-	+

***Tabla VI.** Comparación de la expresión de diferentes corrientes iónicas en las neuronas derivadas de las células madre del oído interno, en las neuronas auditivas cultivadas in Vitro de forma aislada y en las neuronas auditivas cultivadas de forma organotípica en el explante de órgano de Corti.*

Por lo tanto, la expresión de estas corrientes iónicas es dependiente del desarrollo de las neuronas auditivas en el órgano de Corti y está influenciada por el medio ambiente del cultivo. Por ejemplo, factores neurotróficos como el BDNF y NT3, principalmente liberados por el epitelio sensorial, modulan la expresión de las corrientes de bajo voltaje de potasio en las neuronas auditivas en cultivo (141). Las neuronas derivadas de las células madre no deben expresar estos canales cuando se cultivan sin la influencia del epitelio sensorial. Si la expresión de las corrientes de bajo voltaje de potasio y las corrientes I_h depende de factores externos, su expresión puede ser utilizada como un indicador importante de que las neuronas han desarrollado características importantes que simulan a las neuronas auditivas. Este hecho será útil cuando se creen las condiciones óptimas para la diferenciación de las células madre en neuronas en un cultivo organotípico con tejido del oído interno.

7. Trasplante celular en el explante del órgano de Corti denervado tras la neurotoxina.

7.1. Trasplante de neuronas auditivas (Fig. 41).

La formación de nuevas conexiones sinápticas en nuestros trasplantes *in Vitro* requiere que las neuronas trasplantadas sean capaces de encontrar y reaccionar a las señales de crecimiento axonal para así encontrar su destino, en este caso la célula ciliada, y formar nuevas sinapsis. La sinaptogénesis es el proceso más importante en los estudios de regeneración del sistema auditivo aferente y dependerá en la habilidad de esas neuronas en reconocer y formar conexiones con las células ciliadas. En nuestro modelo de degeneración neuronal hemos demostrado que las neuronas aferentes forman nuevas conexiones con las células ciliadas y que en los puntos de contacto con las células ciliadas las neuronas expresan sinapsina en las sinapsis nacientes. Si estos puntos de contacto son funcionales o no, tendrá que ser determinado en estudios futuros mediante estudios de la respuesta electrofisiológica de las neuronas frente a la estimulación de las células ciliadas.

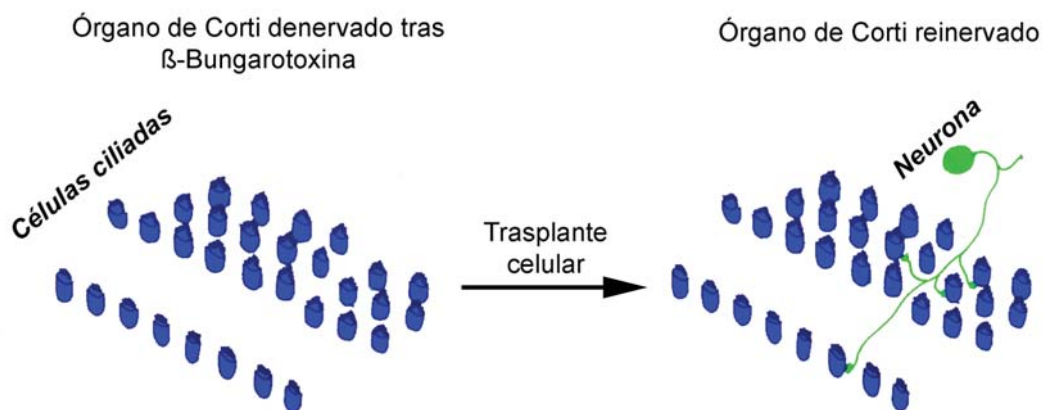


Figura 41. Reinervación del órgano de Corti tras trasplante de neuronas auditivas *in Vitro*. Las neuronas trasplantadas, tras su adhesión a la placa de cultivo, enviaron prolongaciones que crecieron hacia las células ciliadas estableciendo contacto con ellas. En los puntos de contacto entre las

prolongaciones nerviosas y las células ciliadas se produjo la expresión de marcadores sinápticos.

Los contactos de las neuronas auditivas trasplantadas con las células ciliadas externas eran múltiples, mientras que los de las neuronas que contactaban con las células ciliadas internas eran únicos, directos y sin ramificaciones. Esta característica es similar al patrón de inervación que se produce en el desarrollo coclear en animales sanos. Nuestros estudios de reinervación de las células ciliadas con las neuronas trasplantadas sugieren la posible existencia de factores secretados por las células ciliadas que atraen la inervación de una manera única o múltiple.

La observación de la posibilidad de reinervar las células ciliadas y la aparente formación de sinapsis constituye, en nuestro conocimiento, la primera descripción en la literatura en la que las neuronas auditivas forman nuevas sinapsis con células ciliadas que han perdido su inervación aferente (142). Esta característica sugiere la posibilidad de la regeneración de las neuronas aferentes cocleares mediante el trasplante celular o la estimulación endógena de la diferenciación celular. Es conocida la limitada capacidad de regeneración que ocurre espontáneamente tras la muerte de las neuronas auditivas (33, 30). Además un daño exclusivo de las prolongaciones periféricas de estas neuronas puede provocar una hipoacusia neurosensorial al existir una capacidad limitada para el crecimiento de las prolongaciones neuronales (32, 29).

Las prolongaciones procedentes de las neuronas auditivas trasplantadas que contactan con las células ciliadas aparentemente tienen propiedades de fibras presinápticas, incluyendo el inmunomarcado positivo para la sinapsina. La naturaleza de las

prolongaciones neuronales que crecen hacia las células ciliadas es de interés porque las prolongaciones dendríticas se basan en la conducción de las señales desde las células ciliadas hacia el sistema nervioso central. Por tanto, durante el desarrollo las prolongaciones crecen hacia la célula ciliada comportándose como un axón periférico, con su apariencia histológica. Estudios previos han demostrado que las prolongaciones de las neuronas vestibulares (143) son positivas en el inmunomarcado para la sinapsina y la sinaptofisina durante el desarrollo y es posible que la identidad de las prolongaciones periféricas se adquiriera únicamente tras la unión con las células ciliadas. El crecimiento inicial de las neuritas de otros sistemas neuronales se lleva a cabo sin la especificidad de la identidad de la prolongación neuronal como axón o dendrita. En el momento adecuado, una de las prolongaciones empieza a adquirir identidad axonal y expresar marcadores axonales (144). El establecimiento de la polarización parece estar controlado por la inactivación de GSK-3B en los axones y no en las dendritas (145), y por la inactivación de las GTPasa Rap1 y Cdc42 (146). Presumiblemente las neuronas auditivas no han adquirido su estructura bipolar característica en el momento del trasplante y, por lo tanto, podrían expresar proteínas de especialización axonal en las neuritas en proceso de crecimiento. Estas neuritas podrían convertirse en prolongaciones periféricas únicamente cuando establecen un contacto con la célula ciliada. La capacidad de las neuronas para encontrar su destino puede depender de la utilización de moléculas de señalización del crecimiento neuronal para que las prolongaciones neuronales alcancen la célula ciliada. Experimentos futuros deberían investigar si las prolongaciones, una vez alcanzado su destino, pierden sus vesículas presinápticas y se diferencian en terminaciones postsinápticas en la

sinapsis con la célula ciliada.

7.2. Trasplante de células madre del oído interno (Fig. 42).

Las neuronas derivadas de las células madre del sistema nervioso central forman entre ellas múltiples sinapsis in Vitro (147, 148), mientras que las neuronas derivadas de las células madre del oído interno forman contactos con las células ciliadas pero no entre ellas, característica consistente con su comportamiento in vivo (109, 111, 112). En experimentos futuros queda por determinar si las nuevas sinapsis formadas en las células ciliadas denervadas son funcionales mediante la grabación con electrofisiología de las corrientes iónicas de las células diferenciadas de las células madre que inervan a las células ciliadas.

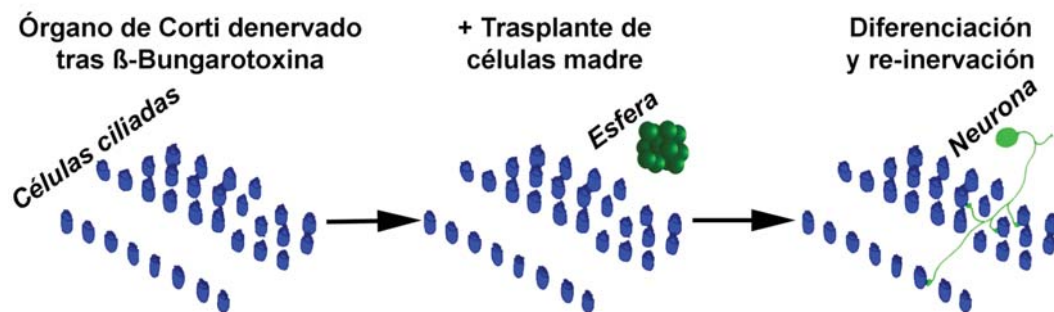


Figura 42. *Trasplante de células madre derivadas del oído interno en el órgano de Corti y diferenciación en neuronas que emiten prolongaciones hacia las células ciliadas con la formación de nuevos contactos.*

Las neuronas sensoriales pueden desarrollarse procedentes de las células madre del oído interno o de otras células madre del animal adulto (43). Las células madre procedentes de la cresta neural, con la

edad, tienen una limitación en su capacidad para diferenciarse en diferentes estirpes celulares. De momento no se ha analizado el cambio en la capacidad de diferenciación con el paso del tiempo de las células madre procedentes del oído interno. En nuestros experimentos hemos demostrado que las células madre del oído interno forman neuronas sensoriales y esta diferenciación puede verse estimulada mediante el tratamiento con ácido retinoico de los cultivos celulares. Estos resultados confirman que las células madre procedentes del oído interno, aunque son multipotenciales, tienen una preferencia por la diferenciación en un fenotipo apropiado al tejido que las origina.

La diferenciación de las células madre del oído interno en neuronas sensoriales, su actividad electrofisiológica similar a las neuronas auditivas y su capacidad para formar nuevos contactos con las células ciliadas puede ser utilizada en un futuro para la creación de nuevas terapias celulares de la pérdida de neuronas auditivas. Las células diferenciadas envían prolongaciones neuronales hacia las células ciliadas, sugiriendo una capacidad para elegir su destino y formar nuevos contactos con estas células tras reconocerlas como células ciliadas externas o internas. Estos estudios, por lo tanto, indican que la regeneración de las neuronas auditivas por las células madre endógenas puede llegar a ser una modalidad de tratamiento de la hipoacusia neurosensorial

CONCLUSIONES

1. La β -bungarotoxina provoca la denervación de las células ciliadas en un explante del órgano de Corti.

Esta neurotoxina actúa mediante una:

- Unión específica a las neuronas auditivas del órgano de Corti.
- Acción dosis dependiente.
- La degeneración neuronal es producida mediante apoptosis.

2. El oído interno de los mamíferos posee células con características típicas de células madre.

2.1. En la cóclea la población de células madre desaparece a partir de la primera semana.

2.2. En el sistema vestibular la población de las células madre permanece a lo largo de la vida.

2.3. La diferenciación de las células madre hacia una estirpe neuronal puede estimularse mediante un tratamiento con ácido retinoico (factor de diferenciación).

Las neuronas obtenidas:

- Expresan marcadores de neuronas sensoriales.
- Son funcionales en los estudios de electrofisiología.

3. El trasplante celular en el explante del órgano de Corti denervado logra reinervar las células ciliadas.

Pueden utilizarse como suministro de células:

- Neuronas auditivas.

- Células madre del oído interno.

Las células madre trasplantadas:

- Se diferencian a neuronas.
- Emiten prolongaciones hacia las células ciliadas.
- Forman nuevos contactos con las células ciliadas.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Gravel JS y Ruben RJ. Auditory deprivation and its consequences: from animals models to humans. En: *Clinical Aspects of Hearing*. Van de Water TR, Popper AN y Fay RR, editores. New York: Springer-Verlag; 1996.
2. Geisler CD. *From sound to synapse. Physiology of the mammalian ear*. New York. Oxford University Press; 1998.
3. Van Beethoven L. *The heiligenstadt testament*. 1802. *The Beethoven compendium: a guide to Beethoven's life and music*. Cooper. New York: Thames&Hudson; 1991.
4. Moráis D, Benito JI, Almaraz A. "El trauma acústico en profesionales de la música clásica". *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2007; 58:401-7.
5. Schuknecht H. Neuroanatomical correlates of auditory sensitivity and pitch discrimination in the cat. *Neural mechanisms of the auditory and vestibular systems*. Rasmussen and Windle, Springfield, Il: Thomas; 1962.
6. Schuknecht HF, Gacek MR. Cochlear pathology in presbycusis, *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1993; 102: 1-12.
7. Cajal SR. *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres*. Paris: Maloine; 1909.
8. Lorente de Nó R. The neural mechanism of hearing. I: Anatomy and physiology. b: The sensory endings of the cochlea. *Laryngoscope*. 1937; 47: 373-7.
9. Spöndlin H. Innervation patterns on the organ of Corti of the cat. *Acta Otolaryngol*. 1969; 67(2):239-54.
10. Hall JG. Hearing and primary auditory centres of the whales. *Acta Otolaryngol*. 1966; Suppl 224:244-50.
11. Otte J, Schuknecht HF y Kerr AG. Ganglion cell populations in normal and pathological human cochleae: implications for cochlear implantation. *Laryngoscope*. 1978; 88: 1231-46.
12. Felder E y Schrott-Fischer A. Quantitative evaluation of myelinated nerve fibres and hair cells in cochleae of humans with age-related high tone hearing loss. *Hear Res*. 1995; 64:1-5.
13. Pauler M, Schuknecht HF, Thornton AR. Correlative studies of cochlear

- neuronal loss with speech discrimination and pure-tone thresholds. *Arch Otorhinolaryngol*. 1986; 243:200-6.
14. Frisina DR, Frisina RD. Speech recognition in noise and presbycusis: relations to posible neural mechanisms. *Hear Res*. 1997; 106: 95-104.
 15. Keithley EM, Croskrey KL. Spiral ganglion cell endings in the cochlear nucleus of young and old rats. *Hear Res*. 1990; 49:169–77.
 16. Keithley EM, Feldman ML. Spiral ganglion cell counts in an age-graded series of rat cochleas. *J Comp Neurol*. 1979; 188:429–42.
 17. Suzuka Y, Schuknecht HF. Retrograde cochlear neuronal degeneration in human subjects. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1988; 450:1–20.
 18. Liberman MC, Kiang NY. Acoustic trauma in cats. Cochlear pathology and auditory-nerve activity. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1978; 358:1–63.
 19. Ernfors P, Van De Water T, Loring J, Jaenisch R. Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron*. 1995; 14:1153–64.
 20. 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*. 2002; 175:138–51.
 21. Stankovic K, Rio C, Xia A, Sugawara M, Adams JC, Liberman MC et al. Survival of adult spiral ganglion neurons requires erbB receptor signaling in the inner ear. *J Neurosci*. 2004. 24:8651–61.
 22. Bok J, Zha XM, Cho YS, Green SH. An extranuclear locus of cAMP-dependent protein kinase action is necessary and sufficient for promotion of spiral ganglion neuronal survival by cAMP. *J Neurosci*. 2003; 23:777–87.
 23. Bao J, Lei D, Du Y, Ohlemiller KK, Beaudet AL, Role LW. Requirement of nicotinic acetylcholine receptor subunit beta2 in the maintenance of spiral ganglion neurons during aging. *J Neurosci*. 2005; 25:3041–5.
 24. White JA, Burgess BJ, Hall RD, Nadol JB. Pattern of degeneration of the spiral ganglion cell and its processes in the C57BL/6J mouse. *Hear Res*. 2000; 141:12–8.
 25. Noben-Trauth K, Zheng QY, Johnson KR. Association of cadherin 23

- with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. *Nat Genet.* 2003; 35:21–3.
26. Starr A, Sininger YS, Pratt H. The varieties of auditory neuropathy. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2000; 11:215–30.
 27. Kujawa SG, Liberman MC. Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth. *J Neurosci.* 2006; 15;26:2115-23.
 28. Puel JL, d'Aldin C, Ruel J, Ladrech S, Pujol R. Synaptic repair mechanisms responsible for functional recovery in various cochlear pathologies. *Acta Otolaryngol.* 1997; 117:214–18.
 29. Sekiya T, Shimamura N, Yagihashi A, Suzuki S. Effect of topically applied basic fibroblast growth factor on injured cochlear nerve. *Neurosurgery.* 2003; 52:900–7.
 30. Sugawara M, Corfas G, Liberman MC. Influence of supporting cells on neuronal degeneration after hair cell loss. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2005; 6:136-47.
 31. Nadol J. Patterns of neural degeneration in the human cochlea and auditory nerve: implications for cochlear implantation. *Otolaryngol Head Neck Sur.* 1997; 117:220–28.
 32. Nadol J, Young Y-S, Glynn, Survival of spiral ganglion cells in profound sensorineural hearing loss: implications for cochlear implantation, *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1989; 98:411-16.
 33. Carnicero E, Knipper M, Tan J, Alonso MT, Schimmang T. Herpes simplex virus type 1-mediated transfer of neurotrophin-3 stimulates survival of chicken auditory sensory neurons. *Neurosci Lett.* 2002; 321:149–52.
 34. Corwin JT. Postembryonic production and aging in inner ear hair cells in sharks. *J Comp Neurol.* 1981; 1; 201:541-53.
 35. Popper AN, Hoxter B. Growth of a fish ear. II. Locations of newly proliferated sensory hair cells in the saccular epithelium of *Astronotus ocellatus*. *Hear Res.* 1990; 45:33-40.
 36. Cotanche DA. Hair cell regeneration in the avian cochlea. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 1997; 168:9-15.
 37. Cruz RM, Lambert PR, Rubel EW. Light microscopic evidence of hair

- cell regeneration after gentamicin toxicity in chick cochlea. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987; 113:1058-62.
38. Corwin JT, Cotanche DA. Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science.* 1988; 24; 240:1772-4.
 39. Montcouquiol M, Corwin JT. Brief treatments with forskolin enhance s-phase entry in balance epithelia from the ears of rats. *J Neurosci.* 2001; 21:974-82.
 40. Barald KF, Kelley MW. From placode to polarization: New tunes in inner ear development. *Development.* 2004; 131:4119–30.
 41. Torres M, Giráldez F. The development of the vertebrate inner ear. *Mech Dev.* 1998; 71:5-21.
 42. Fekete DM, Wu DK. Revisiting cell fate specification in the inner ear. *Curr Opin Neurobiol.* 2002; 12:35–42.
 43. Crane JF, Trainor PA. Neural crest stem and progenitor cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22:267–86.
 44. Satoh T, Fekete DM. Clonal analysis of the relationships between mechanosensory cells and the neurons that innervate them in the chicken ear. *Development.* 2005; 132:1687–97.
 45. Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron.* 2003; 38:17–31.
 46. Li H, Liu H, Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med.* 2003; 9:1293–9.
 47. Hu Z, Ulfendahl M, Olivius MP. NGF stimulates extensive neurite outgrowth from implanted dorsal root ganglion neurons following transplantation into the adult rat inner ear. *Neurobiol Dis.* 2005; 18:184–92.
 48. Hu Z, Wei D, Johansson CB, Holmstrom N, Duan M, Frisen J et al. Survival and neural differentiation of adult neural stem cells trasplanted into the mature inner ear. *Exp Cell Res.* 2005; 302:40–7.
 49. Greenwood AL, Turner EE, Anderson DJ. Identification of dividing, determined sensory neuron precursors in the mammalian neural crest. *Development.* 1999; 126:3545–59.
 50. Farinas I, Jones KR, Backus C, Wang XY, Reichardt LF. Severe sensory

- and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature*. 1994; 369:658–61.
51. Farinas I, Jones KR, Tessarollo L, Vigers AJ, Huang E, Kirstein M et al. Spatial shaping of cochlear innervation by temporally regulated neurotrophin expression. *J Neurosci*. 2001; 21:6170–80.
 52. Huang EJ, Liu W, Fritzscht B, Bianchi LM, Reichardt LF, Xiang M. *Brn3a* is a transcriptional regulator of soma size, target field innervation and axon pathfinding of inner ear sensory neurons. *Development*. 2001; 128:2421–32.
 53. Karis A, Pata I, van Doorninck JH, Grosveld F, de Zeeuw CI, de Caprona D et al. Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear. *J Comp Neurol*. 2001; 429:615–30.
 54. Kim WY, Fritzscht B, Serls A, Bakel LA, Huang EJ, Reichardt LF et al. NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development. *Development*. 2001; 128:417–26.
 55. Radde-Gallwitz K, Pan L, Gan L, Lin X, Segil N, Chen P. Expression of *Islet1* marks the sensory and neuronal lineages in the mammalian inner ear. *J Comp Neurol*. 2004; 477:412–21.
 56. Fritzscht B, Pauley S, Matei V, Katz DM, Xiang M, Tessarollo L. Mutant mice reveal the molecular and cellular basis for specific sensory connections to inner ear epithelia and primary nuclei of the brain. *Hear Res*. 2005; 206:52–63.
 57. Sobkowicz HM, Bereman B, Rose JE. Organotypic development of the organ of Corti in culture. *J Neurocytol*. 1975; 4:543–72.
 58. Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M et al. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*. 2000; 28:41–51.
 59. Jeon SJ, Oshima K, Heller S, Edge A. Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors in Vitro for inner ear hair cells. *Mol Cell Neurosci*. 2007; 34:59–68.
 60. Herkert M, Shakhman O, Schweins E, Becker CM. Beta-bungarotoxin is a potent inducer of apoptosis in cultured rat neurons by receptor-mediated internalization. *Eur J Neurosci*. 2001; 14:821–28.

61. Torres M, Gomez-Pardo E, Gruss P. *Pax2* contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development*. 1996; 122:3381–91.
62. Lawoko-Kerali G, Rivolta MN, Holley M. Expression of the transcription factors *GATA3* and *Pax2* during development of the mammalian inner ear. *J Comp Neurol*. 2002; 442:378–91.
63. Lawoko-Kerali G, Rivolta MN, Lawlor P, Cacciabue-Rivolta DI, Langton-Hewer C, van Doorninck JH et al. *GATA3* and NeuroD distinguish auditory and vestibular neurons during development of the mammalian inner ear. *Mech Dev*. 2004; 121:287–99.
64. Burton Q, Cole LK, Mulheisen M, Chang W, Wu DK. The role of *Pax2* in mouse inner ear development. *Dev Biol*. 2004; 272:161–75.
65. Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*. 2002; 418.
66. Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S, Shimazaki T et al. Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Dev Biol*. 2005; 278:587–606.
67. Djourno A, Eyries C. Prothese auditive par excitation électrique du nerf sensorial a l'aide d'un bolinate inclus à demeure. *Presse Med*. 1957; 65: 1417.
68. House W. Cochlear implants, *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1976; 85 (Suppl. 27): 1-93.
69. Michelson R. The results of electrical stimulation of the cochlea in human sensory deafness. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1971; 80: 914-9.
70. Doyle JH, Doyle JB Jr, Turnbull FM Jr. Electrical stimulation in eight cranial nerve, *Arch Otolaryngol*. 1964; 80: 388-92.
71. McCabe BF. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1979; 88: 585-9.
72. García Berrocal JR, Ramírez-Camacho R. Immune response and immunopathology of the inner ear: an update. *J Laryngol Otol*. 2000; 114:101-7.
73. Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Buján J, Martín-Marero A,

- Trinidad A. Supporting cells as a target of cisplatin-induced inner ear damage: therapeutic implications. *Laryngoscope*. 2004;114:533-7.
74. Ramírez-Camacho R, García-Berrocal JR, Trinidad A, González-García JA, Verdaguer JM, Ibáñez A et al. Central role of supporting cells in cochlear homeostasis and pathology. *Med Hypotheses*. 2006; 67:550-5.
75. García-Berrocal JR, Nevado J, Ramírez-Camacho R, Sanz R, González-García JA, Sánchez-Rodríguez C et al. The anticancer drug cisplatin induces an intrinsic apoptotic pathway inside the inner ear. *Br J Pharmacol*. 2007; 152:1012-20.
76. Hinojosa R, Marion M. Histopathology of profound sensorineural deafness, *Ann NY Acad Sci*. 1983; 405: 495-84.
77. Nadol J. Histological considerations in implant patients, *Arch Otolaryngol*. 1984; 110: 160-3.
78. Ng M, Niparko JK, Nager GT. Inner ear pathology in severe to profound sensorineural hearing loss. En: Niparko JK, Kirk KI, Mellor NK, Robbons AM, Trui DL, Wilson BS, editores. *Cochlear implant: Principles and Practice*. Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia. 2000.
79. Gantz B, McCabe BF, Tyler R. Use of multichannel cochlear implants in obstructed and obliterated cochleas. *Otolaryngol Head and Neck Surg*. 1988; 98: 72-81.
80. Ylikoski J, Savolainen S. The cochlear nerve in various forms of deafness. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1984; 98: 418-27.
81. Kerr A y Schuknecht H. The spiral ganglion in profound deafness, *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1968; 65: 586-98.
82. Zheng JL, Gao WQ. Differential damage to auditory neurons and hair cells by ototoxins and neuroprotection by specific neurotrophins in rat cochlear organotypic cultures. *Eur J Neurosci*. 1996; 8:1897–905.
83. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*. 2001; 292: 1389–94.
84. Bjorklund LM, Sánchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS et al. Embryonic Stem Cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002; 99: 2344–49.
85. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003; 114: 763–76.
86. Ding DL, Wang J, Salvi R, Henderson D, Hu BH, McFadden SL et al. Selective loss of inner hair cells and type-I ganglion neurons in carboplatin-treated chinchillas. Mechanisms of damage and protection. *Ann NY Acad Sci*. 1999; 884:152–70.
87. Lee JE, Nakagawa T, Kim TS, Iguchi F, Endo T, Dong Y et al. A novel model for rapid induction of apoptosis in spiral ganglions of mice. *Laryngoscope*. 2003; 113:994–9.
88. McFadden SL, Ding D, Jiang H, Salvi RJ. Time course of efferent fiber and spiral ganglion cell degeneration following complete hair cell loss in the chinchilla. *Brain Res*. 2004; 997:40–51.
89. Schmiedt RA, Okamura HO, Lang H, Schulte BA. Ouabain application to the round window of the gerbil cochlea: a model of auditory neuropathy and apoptosis. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2002; 3:223–33.
90. Lang H, Schulte BA, Schmiedt RA. Ouabain induces apoptotic cell death in type I spiral ganglion neurons, but not type II neurons. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2005; 6:63–74.
91. Hamada M, Kimura RS. Morphological changes induced by administration of a Na⁺, K⁺-ATPase inhibitor in normal and hydropic inner ears of the guinea pig. *Acta Otolaryngol*. 1999; 119:778–86.
92. Escurat M, Djabali K, Gumpel M, Gros F, Portier MM. Differential expression of two neuronal intermediate-filament proteins, peripherin and the low molecular-mass neurofilament protein (NF-L), during the development of the rat. *J Neurosci*. 1990; 10:764–84.
93. Lumpkin EA, Collisson T, Parab P, Omer-Abdalla A, Haeberle H, Chen P et al. *Math1*-driven GFP expression in the developing nervous system of transgenic mice. *Gene Expr Patterns*. 2003; 3: 389–95.
94. Schimmang T, Minichiello L, Vazquez E, San Jose I, Giraldez F, Klein R et al. Developing inner ear sensory neurons require TrkB and TrkC receptors for innervation of their peripheral targets. *Development*. 1995; 121:3381–91.

95. 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.* 2000; 1:129–43.
96. Xiang M, Gan L, Li D, Chen ZY, Zhou L, O'Malley BW Jr et al. Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:9445–50.
97. Montecucco C, Rossetto O. How do presynaptic PLA2 neurotoxins block nerve terminals? *Trends Biochem Sci.* 2000; 25:266–70.
98. Shakhman O, Herkert M, Rose C, Humeny A, Becker CM. Induction by beta-bungarotoxin of apoptosis in cultured hippocampal neurons is mediated by Ca²⁺- dependent formation of reactive oxygen species. *J Neurochem.* 2003; 87:598–08.
99. Kros CJ, Ruppertsberg JP, Rusch A. Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature.* 1998; 394:281–84.
100. Tseng WP, Lin-Shiau SY. Activation of NMDA receptor partly involved in beta-bungarotoxin-induced neurotoxicity in cultured primary neurons. *Neurochem Int.* 2003; 42:333–44.
101. Hirokawa N. Disappearance of afferent and efferent nerve terminals in the inner ear of the chick embryo after chronic treatment with beta-bungarotoxin. *J Cell Biol.* 1977; 73:27–46.
102. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: A new lease on life. *Cell* 2000; 100: 143-55.
103. Weissman IL. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000; 100:157-68.
104. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem cells.* 2001; 19: 193-204.
105. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000; 287: 2032-6.
106. Anderson D, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med.* 2001; 7: 393-5.
107. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulson R, Wright NA et al. The new stem cell biology: Something for everyone. *Mol*

- Pathol 2003; 56: 86-96.
108. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magl, MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 1999; 283: 534–7.
 109. Oshima K, Grimm CM, Corrales CE, Senn P, Martinez Monedero R, Geleoc GS et al. Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2007; 8:18–31.
 110. Martinez-Monedero R, Edge AS. Stem cells for the replacement of inner ear neurons and hair cells. *Int J Dev Biol*. 2007;51:655-61.
 111. Martinez-Monedero R, Oshima K, Heller S, Edge AS. The potential role of endogenous stem cells in regeneration of the inner ear. *Hear Res*. 2007 May; 227:48-52.
 112. Martinez-Monedero R, Yi E, Oshima K, Glowatzki E, Edge AS. Differentiation of inner ear stem cells to functional sensory neurons. *Dev Neurobiol*. 2008 Apr; 68: 669-84.
 113. Rask-Andersen H, Bostrom M, Gerdin B, Kinnefors A, Nyberg G, Engstrand T et al. Regeneration of human auditory nerve. In vitro/in vivo demonstration of neural progenitor cells in adult human and guinea pig spiral ganglion. *Hear Res*. 2005; 203:180–91.
 114. Lopez IA, Zhao PM, Yamaguchi M, de Vellis J, Espinosa-Jeffrey A. Stem/progenitor cells in the postnatal inner ear of the GFP-nestin transgenic mouse. *Int J Dev Neurosci*. 2004; 22:205–13.
 115. Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, Dolan DF et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med*. 2005; 11:271-6.
 116. Nicholl AJ, Kneebone A, Davies D, Cacciabue-Rivolta DI, Rivolta MN, Coffey P et al. Differentiation of an auditory neuronal cell line suitable for cell transplantation. *Eur J Neurosci*. 2005; 22:343–53.
 117. Heppelmann B, Emson PC. Distribution of calretinin mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia: A study using non-radioactive in situ hybridization histochemistry. *Brain Res*. 1993; 624:312–16.
 118. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP.

- Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005; 122:947–56.
119. Kiernan AE, Pelling AL, Leung KK, Tang AS, Bell DM, Tease C et al. Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature*. 2005; 434:1031–5.
120. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*. 2006; 442:533–8.
121. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990; 60:585–95.
122. Fritsch B, Farinas I, Reichardt LF. Lack of neurotrophin 3 causes losses of both classes of spiral ganglion neurons in the cochlea in a region-specific fashion. *J Neurosci*. 1997; 17:6213–25.
123. Fritsch B, Beisel KW, Hansen LA. The molecular basis of neurosensory cell formation in ear development: A blueprint for hair cell and sensory neuron regeneration? *Bioessays*. 2006; 28:1181–93.
124. Fritsch B, Matei VA, Nichols DH, Bermingham N, Jones K, Beisel KW et al. Atoh1 null mice show directed afferent fiber growth to undifferentiated ear sensory epithelia followed by incomplete fiber retention. *Dev Dyn*. 2005; 233:570–83.
125. Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA et al. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2005; 23:215–21.
126. Schwarz M, Cecconi F, Bernier G, Andrejewski N, Kammandel B, Wagner M et al. Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of *Pax2* and *Pax6*. *Development*. 2000; 127:4325–34.
127. Wurst W, Auerbach AB, Joyner AL. Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: An early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development*. 1994; 120:2065–75.
128. Kozmik Z, Daube M, Frei E, Norman B, Kos L, Dishaw LJ et al. Role of Pax genes in eye evolution: A cnidarian PaxB gene uniting *Pax2* and *Pax6* functions. *Dev Cell*. 2003; 5:773–85.

129. Wagner E, Luo T, Drager UC. Retinoic acid synthesis in the postnatal mouse brain marks distinct developmental stages and functional systems. *Cereb Cortex*. 2002; 12:1244–53.
130. Romand R, Kondo T, Fraulob V, Petkovich M, Dolle P, Hashino E. Dynamic expression of retinoic acid synthesizing and metabolizing enzymes in the developing mouse inner ear. *J Comp Neurol*. 2006; 496:643–54.
131. Niederreither K, Vermot J, Schuhbaur B, Chambon P, Dolle P. Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development*. 2000; 127:75–85.
132. Thompson DL, Gerlach-Bank LM, Barald KF, Koenig RJ. Retinoic acid repression of bone morphogenetic protein 4 in inner ear development. *Mol Cell Biol*. 2003; 23:2277–86.
133. 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*. 2005; 102:4789–94.
134. Ray J, Gage FH. Differential properties of adult rat and mouse brain-derived neural stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2006; 31:560–73.
135. Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Kosako H, Nakatomi H, Yamamoto N et al. Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *J Neurosci*. 2001; 21:9814–23.
136. Brejot T, Blanchard S, Hocquemiller M, Haase G, Liu S, Nosjean A et al. Forced expression of the motor neuron determinant HB9 in neural stem cells affects neurogenesis. *Exp Neurol*. 2006; 198:167–82.
137. Mo ZL, Davis RL. Heterogeneous voltage dependence of inward rectifier currents in spiral ganglion neurons. *J Neurophysiol*. 1997; 78:3019–27.
138. Chabbert C, Chambard JM, Sans A, Desmadryl G. Three types of depolarization-activated potassium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. *J Neurophysiol*. 2001; 85:1017–26.
139. Mo ZL, Adamson CL, Davis RL. Dendrotoxinsensitive K⁺ currents
- 144 Células madre en el oído interno; Trasplante celular en el órgano de Corti.

- contribute to accommodation in murine spiral ganglion neurons. *J Physiol.* 2002; 542:763–78.
140. Risner JR, Holt JR. Heterogeneous potassium conductances contribute to the diverse firing properties of postnatal mouse vestibular ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 2006; 96:2364–76.
141. Adamson CL, Reid MA, Mo ZL, Bowne-English J, Davis RL. Firing features and potassium channel content of murine spiral ganglion neurons vary with cochlear location. *J Comp Neurol.* 2002; 447:331–50.
142. Martinez-Monedero R, Corrales CE, Cuajungco MP, Heller S, Edge AS. Reinnervation of hair cells by auditory neurons after selective removal of spiral ganglion neurons. *J Neurobiol.* 2006; 66:319–31.
143. Scarfone E, Dememes D, Sans A. Synapsin I and Synaptophysin expression during ontogenesis of the mouse peripheral vestibular system. *J Neurosci.* 1991; 11:1173–81.
144. Goslin K, Banker G. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol.* 1989; 108:1507–16.
145. Jiang H, Guo W, Liang X, Rao Y. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. *Cell.* 2005; 120:123–35.
146. Schwamborn JC, Puschel AW. The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci.* 2004; 7:923–9.
147. Song HJ, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci.* 2002; 5:438–45.
148. Englund U, Bjorklund A, Victorin K, Lindvall O, Kokaia M. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99:17089–94.
149. Berglund AM, Ryugo DK. Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. *J Comp Neurol.* 1987; 255:560–7.
150. Li H, Liu H, Sage C, Huang M, Chen ZY, Heller S. Islet-1 expression in the developing chicken inner ear. *J Comp Neurol.* 2004;

477:1–10.

151. Ma W, Fitzgerald W, Liu QY, O'shaughnessy TJ, Maric D, Lin HJ et al. CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in three-dimensional collagen gels. *Exp Neurol.* 2004; 190:276–88.
152. 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.* 2007; 26:3016–23.

ANEXO

Reinnervation of Hair Cells by Auditory Neurons after Selective Removal of Spiral Ganglion Neurons

Rodrigo Martinez-Monedero,^{1,2} C. Eduardo Corrales,^{1,2} Math P. Cuajungco,^{1,2}
Stefan Heller,^{1,2,3} Albert S.B. Edge^{1,2,3*}

¹ Department of Otolaryngology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115

² Tillotson Unit for Cell Biology of the Inner Ear, Eaton-Peabody Laboratory, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, Massachusetts 02114

³ Program in Speech and Hearing Bioscience and Technology, Division of Health Science and Technology, Harvard & MIT, Cambridge, Massachusetts 02139

Received 30 June 2005; accepted 8 October 2005

ABSTRACT: Hearing loss can be caused by primary degeneration of spiral ganglion neurons or by secondary degeneration of these neurons after hair cell loss. The replacement of auditory neurons would be an important step in any attempt to restore auditory function in patients with damaged inner ear neurons or hair cells. Application of β -bungarotoxin, a toxin derived from snake venom, to an explant of the cochlea eradicates spiral ganglion neurons while sparing the other cochlear cell types. The toxin was found to bind to the neurons and to cause apoptotic cell death without affecting hair cells or other inner ear cell types as indicated by TUNEL staining, and, thus, the toxin provides a highly specific means of deafferentation of hair cells. We

therefore used the denervated organ of Corti for the study of neuronal regeneration and synaptogenesis with hair cells and found that spiral ganglion neurons obtained from the cochlea of an untreated newborn mouse reinnervated hair cells in the toxin-treated organ of Corti and expressed synaptic vesicle markers at points of contact with hair cells. These findings suggest that it may be possible to replace degenerated neurons by grafting new cells into the organ of Corti. © 2006

Wiley Periodicals, Inc. *J Neurobiol* 66: 000–000, 2006

Keywords: beta-bungarotoxin; apoptosis; spiral ganglion; transplantation

Correspondence to: A. Edge (albert_edge@meei.harvard.edu).

Contract grant sponsor: Programa nacional para la movilidad de profesores de universidad e investigadores, Secretaria de Estado de Educacion y Universidades, Spain.

Contract grant sponsor: National Institutes of Health; contract grant number: F33 DC006789; contract grant number: R01 DC007174; contract grant number: R01 DC006167; contract grant number: P30 DC05209.

Contract grant sponsor: Hamilton H. Kellogg and Mildred H. Kellogg Charitable Trust.

© 2006 Wiley Periodicals, Inc.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/neu.20232

Sensorineural hearing loss can be caused by a loss of hair cells, the sound transducing sensory cells of the cochlea, or by loss of afferent neurons, the spiral ganglion neurons, that connect the hair cells to the cochlear nucleus in the brainstem. Degeneration of afferent neurons can occur secondarily to the loss of hair cells that normally supply trophic support to these neurons (Lieberman and Kiang, 1978; Keithley and Croskrey, 1990) or from primary neuronal loss involving degeneration of neurons in the absence of hair cell degeneration (Keithley and Feldman, 1979; Suzuka and Schuknecht, 1988). This condition is termed auditory neuropathy when it occurs in the

presence of functional hair cells in humans (Starr et al., 2000). Disruption of function studies in mice have shown that survival of spiral ganglion neurons is dependent on a number of genes such as neurotrophins (Ernfors et al., 1995; Hossain et al., 2002), components of the *erbB* pathway (Stankovic et al., 2004), and cAMP-dependent protein kinase (Bok et al., 2003). Other studies have shown that neuronal degeneration can be pronounced during aging in animals with mutations in the gene encoding the $\beta 2$ subunit of the acetylcholine receptor (Bao et al., 2005) and in an age-related hearing loss gene, which is most likely cadherin 23 (White et al., 2000; Noben-Trauth et al., 2003).

After neuronal degeneration in the auditory system, unlike peripheral neurons of the motor system and some sensory systems, the auditory neurons do not regenerate to any clinically significant extent (Carnicero et al., 2002; Sekiya et al., 2003). However, the possibility that transplanted neurons could regenerate new connections to hair cells has not been explored. Transplantation of dorsal root ganglion neurons and neuronal stem cells demonstrated survival of neurons in the cochlea (Hu et al., 2005a, 2005b), but the processes from these cells extended to other neurons not to hair cells (Hu et al., 2005a). During development, the bipolar spiral ganglion neurons of the cochlea connect to the cochlear nucleus in the CNS and to the sensory cells of the organ of Corti through central and peripheral processes emanating from cell bodies that form the auditory ganglion. Two types of spiral ganglion neurons innervate the cochlear sensory epithelium: type I neurons synapse with single inner hair cells through unbranched processes and type II neurons synapse with several outer hair cells via branched processes. Some aspects of a peripheral process leading to a hair cell are similar to a dendrite, as the electrical signal from the hair cell is transmitted via this postsynaptic process to the spiral ganglion cell body, but other aspects of the peripheral process are more like an axon, as the process is myelinated, has nodes, and developmentally grows much like an axon to the hair cell target. Functional repair of the auditory nerve after injury would be possible only if the transplanted neurons reconstructed both the peripheral and the central connections.

We sought to test the ability of spiral ganglion neurons to grow processes and form connections with hair cells in a postnatal cochlea to determine whether the signals that guide the neurons to the hair cells in the embryo are intact. To do this we induced the degeneration of the spiral ganglion neurons in an organ of Corti explanted from one animal and then isolated neurons from a second animal and trans-

ferred them into the explanted organ of Corti. To induce the degeneration of the neurons we treated the organ of Corti explant with β -bungarotoxin, a toxin that was previously found to destroy the auditory neurons in chick embryos (Hirokawa, 1977).

METHODS

Organ of Corti *In Vitro* Culture

The cochlea was dissected using sterile conditions under a Zeiss Stemi 2000 dissection microscope. Organotypic explant cultures were prepared from the cochleas of 1 to 3 day postnatal C57BL/6 mice or *Atoh1-nGFP* transgenic mice that express green fluorescent protein under the control of the *Atoh1* enhancer (Lumpkin et al., 2003). We used the methods described in detail previously (Sobkowicz et al., 1975) with some modifications, using four to five explants per condition. The head was bisected midsagittally and the cochlea removed and placed in ice cold Hank's balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen). Using two forceps the organ of Corti and the spiral ganglion tissue were gently freed from the capsule and separated from the stria vascularis. The organ of Corti was transferred using a wide-mouth pipette containing a small amount of HBSS from the dissection dish into a 4-well dish (Greiner Labortechnik) coated with fibronectin (BD Bioscience). The tissue was oriented so that the apical surfaces of the hair cells were pointing up and the basilar membrane was directed toward the fibronectin substrate. Excess medium was removed by aspiration. The explanted tissue was allowed to attach to the fibronectin substrate for 12–24 h in a 37°C incubator with 5% CO₂ in a minimum volume of HBSS while avoiding drying of the tissue. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) and F12 (100 μ L, mixed 1:1; Invitrogen), supplemented with N2, B27 (both from Invitrogen), and ampicillin (50 μ g/mL), was deposited gently at the side of the tissue. After the tissue was attached, the plate was again placed in the 37°C incubator and the cultures were kept for up to 2 weeks in a humidified chamber with changes of medium every 2 days.

When dissection of the organ of Corti was performed using *neurogenin* (*ngn*) $I^{-/-}$ mice (Ma et al., 2000), newborn animals were used (these mice do not survive for more than a day). The heterozygous mice (provided by Q. Ma, Dana Farber Cancer Center) were bred to obtain homozygotes that were identified by genotyping by polymerase chain reaction (PCR). All handling of animals was according to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory of Animals.

Treatment of Organ of Corti with β -Bungarotoxin

For the selective elimination of the spiral ganglion neurons, medium for culture of the organ of Corti was supplemented with β -bungarotoxin (Biotium, Inc.) for 24–48 h at concentrations from 0.01 nM to 2 μ M. The organ of Corti was

fixed and examined by immunohistochemistry. Quantification of the outer hair cells, inner hair cells, and spiral ganglion neurons for four organs of Corti divided in segments of 100 μm was performed with Axiovision 4.3 software and the data subjected to analysis of variance (ANOVA) with significance inferred at a p value <0.01 .

Binding of β -Bungarotoxin to Cells of the Organ of Corti

The toxin was labeled with tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate (TRITC; Sigma) prior to addition to the tissue. The β -bungarotoxin (1 mg) was diluted in 200 μL of conjugation buffer (100 mM carbonate/bicarbonate buffer, pH 9), and the toxin was mixed with 35 μL of TRITC in dimethylsulfoxide in a 1.5 mL tube protected from light. After 2 h at room temperature, excess or hydrolyzed TRITC was removed by dialysis in a Slide-A-Lyzer dialysis cassette (Pierce) overnight. Dilutions from 200 to 10,000 of a solution of 212.7 μM TRITC-labeled β -bungarotoxin were added to the organ of Corti from *Atoh1-nGFP* transgenic mice at P0–P2. We assessed binding of TRITC-labeled β -bungarotoxin at intervals of 5 min to 2 h after labeling. Organotypic cultures were rinsed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at 4°C. After washing with PBS, the organ of Corti was examined with a fluorescence microscope.

TUNEL Assay for Cell Death in Organ of Corti Explants

The organ of Corti from a C57BL/6 mouse at P0 was treated with 0.5 μM β -bungarotoxin for 24 h. The tissue was washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min. DNA strand breaks were labeled by terminal deoxynucleotidyl transferase with TUNEL label mix (Roche Molecular Biochemicals). After two washes with PBS, 50 μL of the TUNEL reaction mixture was added to the sample. Negative controls were performed by adding 50 μL of the label solution (without terminal transferase) instead of the TUNEL reaction mixture and by TUNEL staining of the untreated organ of Corti. The organ of Corti was incubated in a 37°C incubator for 60 min and the reaction was stopped by three washes with PBS and analyzed by fluorescence microscopy.

Immunohistochemistry

Organs of Corti were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min. After three washes with PBS we permeabilized and blocked nonspecific binding sites with PBT1 solution [0.1% Triton X-100, 1% BSA (w/v), and 5% heat-inactivated goat serum in PBS] for 20 min. Fixed and permeabilized organs of Corti were incubated with primary antibodies overnight in antiserum diluted in PBT1. Dilutions used were 1:500 for mouse monoclonal TuJ antibody (β -III tubulin; Covance), 1:200 for polyclonal rabbit anti-neurofilament M (145 kD) (Chemicon International),

1:2000 for polyclonal rabbit antibody to parvalbumin 3, 1:500 for polyclonal rabbit anti-synapsin antibody (Chemicon), and 1:500 for mouse monoclonal antibody to SV2 (Developmental Studies Hybridoma Bank). Specimens were washed three times for 15 min each with PBS. FITC, TRITC, and Cy5-conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used to detect primary antibodies. F-actin was labeled with TRITC-conjugated phalloidin (Sigma), and cell nuclei were stained by exposure to 4,6-diamidino-2-phenylindole with Vectashield (Vector Laboratories). Staining was visualized with epifluorescence microscopy (Axioskop 2 Mot AxioCam; Zeiss) or confocal microscopy (TCD; Leica).

Spiral Ganglion Neuron Isolation and Coculture with the *In Vitro* Organ of Corti

Cochlear cartilage was removed with fine forceps and the spiral ganglion tissue was separated from four to five organs of Corti and transferred to ice-cold HBSS. The neurons were from C57BL/6 mice or *thy1-CFP* mice in which the CFP gene is under the control of *thy1* regulatory elements (Feng et al., 2000) resulting in neuronal expression. The tissue was used directly for coculture with the organ of Corti explant or was first dissociated to obtain the neurons. For this dissociation, the tissue was digested with trypsin in a 37°C incubator for 20 min (25 μL /cochlea). After the trypsinization was stopped by addition of DMEM/F12 containing 10% fetal bovine serum (25 μL /cochlea), the spiral ganglion tissue was triturated with a P200 micropipettor set at 180 μL by pipetting up and down 20–30 times gently. DMEM/F12 (1:1) supplemented with N2, B27, and ampicillin was added and the cell suspension was centrifuged at 800 rpm for 5 min. The supernatant was removed and medium (100 μL) containing NT3 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and BDNF (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (both from Chemicon) was added to the cells.

The spiral ganglion neurons obtained from P0–P2 C57/BL6 mice or *thy1-CFP* mice (donors) were added to the denervated organ of Corti explant (recipient) in 100 μL of medium. The recipient organ of Corti was from P0–P2 mice, treated to eliminate spiral ganglion neurons and to leave the hair cells intact either by β -bungarotoxin treatment for 48 h, or from the *ngn1*^{-/-} mouse. The co-culture of cells and organ of Corti was carried out in a 4-well dish in a 37°C incubator for 2 days. Immunohistochemistry was performed to trace the donor cells after coculture.

RESULTS

Removal of Spiral Ganglion Neurons with Neurotoxin

The dissected organ of Corti retained its basic structure *in vitro* for periods of up to 2 weeks and innervation of the hair cells by the radial afferent processes from the spiral ganglion neurons remained intact as

detected by immunohistochemistry using antibodies to β -III tubulin and parvalbumin 3 [Fig. 1(A)]. Increasing concentrations of β -bungarotoxin were tested to determine whether it was possible to destroy spiral ganglion neurons while sparing hair cells so that we could use the cochlear explant as an *in vitro* system for neural regeneration [Fig. 1(B–G)]. In these experiments we observed a dose-dependent induction of cell death by the toxin. At the lowest concentrations of the toxin tested (0.5 nM) most of the neurons at the base of the cochlea were destroyed, but the afferent processes at the apex of the cochlea remained intact after 48 h [Fig. 1(C)]. Neurons at the base of the cochlea were completely eliminated when the concentration was increased to 50 nM, but there were surviving neurons in the apex, indicating only partial destruction of neurons [Fig. 1(D)]. Treatment of the organ of Corti with a concentration of 0.5 μ M β -bungarotoxin destroyed the spiral ganglion neurons throughout the cochlea, but did not affect the hair cells as assessed using hair cells that expressed GFP (*Atoh1-nGFP* mouse) and immunohistochemistry for β -III tubulin [Fig. 1(E)]. The spiral ganglion neurons were eliminated at all concentrations above 1 μ M [Fig. 1(F,G)] but the number of outer hair cells was also decreased.

As shown in Figure 1(F) and (G), the surviving hair cells continued to show green fluorescence from nGFP (*Atoh1-nGFP* mouse). These hair cells appeared intact in the absence of innervation for periods as long as 2 weeks in cultures treated with β -bungarotoxin. These data corroborate the finding that hair cell survival is independent of the innervation by spiral ganglion neurons (Hirokawa, 1977; Fritzsche et al., 1997).

The cell survival, measured using expression of nGFP, decreased with increasing concentrations of β -bungarotoxin and cell counting indicated that the spiral ganglion neurons were markedly decreased even at concentrations of 0.5 nM, whereas inner hair cells were only slightly decreased at a concentration up to 2 μ M and outer hair cells were not significantly decreased (ANOVA, $p < 0.01$) at concentrations up to 0.5 μ M β -bungarotoxin [Fig. 1(I)]. The decrease in spiral ganglion neurons was statistically significant ($p < 0.01$). A concentration of 0.5 μ M yielded an organ of Corti without detectable neuronal cell bodies and radial fibers but with complete survival of hair cells. This concentration was therefore selected for subsequent experiments.

The innervation of cochlear hair cells was completely lacking in newborn *ngn 1* knock-out mice

Figure 1 Organ of Corti explants and treatment of explants with β -bungarotoxin. Organ of Corti explant of a C57BL/6 mouse after 3 days in culture (A). Outer hair cells (OHC) and inner hair cells (IHC) were visualized with an antibody to parvalbumin 3 and secondary FITC-labeled antibody (shown in green), and spiral ganglion neurons (SGNs) were detected with an antibody to β -III tubulin and TRITC-labeled secondary antibody (shown in red). Inset shows a higher magnification of the hair cells. After treatment for 2 days (B–G) in increasing concentrations of toxin (β -BT) organs of Corti of *Atoh1-nGFP* transgenic mice were immunostained with an antibody to β -III tubulin detected with a secondary TRITC-labeled antibody (shown in red) and hair cell nuclei were detectable by nuclear green fluorescence. The apical turns of the cochlea (Apex) are shown in the left column and basal turns (Base) are shown in the right column. (B) Untreated control explants showing intact hair cells and spiral ganglion neurons. Neurons stained for β -III tubulin (indicated by arrows). (C) Treatment with 0.5 nM β -bungarotoxin. Note that neurons at the base of the organ of Corti were eliminated but the neurons of the apex were not lost. (D) Treatment with 50 nM β -bungarotoxin. Note complete elimination of neurons at the base and partial survival in the apical turns. (E) Treatment with 0.5 μ M β -bungarotoxin. There was no evidence of neuronal survival whereas the outer and inner hair cells were intact. (F) Treatment with 1 μ M β -bungarotoxin. At this concentration there was significant loss of outer hair cells in the base of the cochlea and complete elimination of neurons. (G) Treatment with 2 μ M β -bungarotoxin. Note that outer hair cells were nearly completely eliminated but inner hair cells were retained. Neurons were completely absent. (H) Organ of Corti explant of a newborn *ngn 1* knock-out mouse. Immunostaining as above for neurons and with parvalbumin 3 using a FITC-labeled secondary antibody (shown in green) and phalloidin labeled with TRITC (shown in red) for hair cells. There was a complete lack of spiral ganglion neurons and a reduced number of hair cells. Scale bars in (A–H) are 100 μ m. (I) Quantification of surviving outer hair cells, inner hair cells, and neurons from organ of Corti of *Atoh1-nGFP* transgenic mouse in culture for 48 h with different concentrations of β -bungarotoxin. Data are expressed as the mean number of cells \pm SD per 100 μ m of explant length. Higher concentrations of the neurotoxin decreased the number of outer hair cells. β -bungarotoxin (0.5 μ M) for 2 days eliminated the neurons without significant alteration in the number of hair cells. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

[Fig. 1(H)]. Like the β -bungarotoxin treated organ of Corti, there were no detectable neuronal cell bodies and radial fibers in the *ngn1*^{-/-} organ of Corti. How-

ever, this mouse was not used for our replacement studies, because there was an overall reduction in size of the inner ear, the modiolus was nearly absent, and

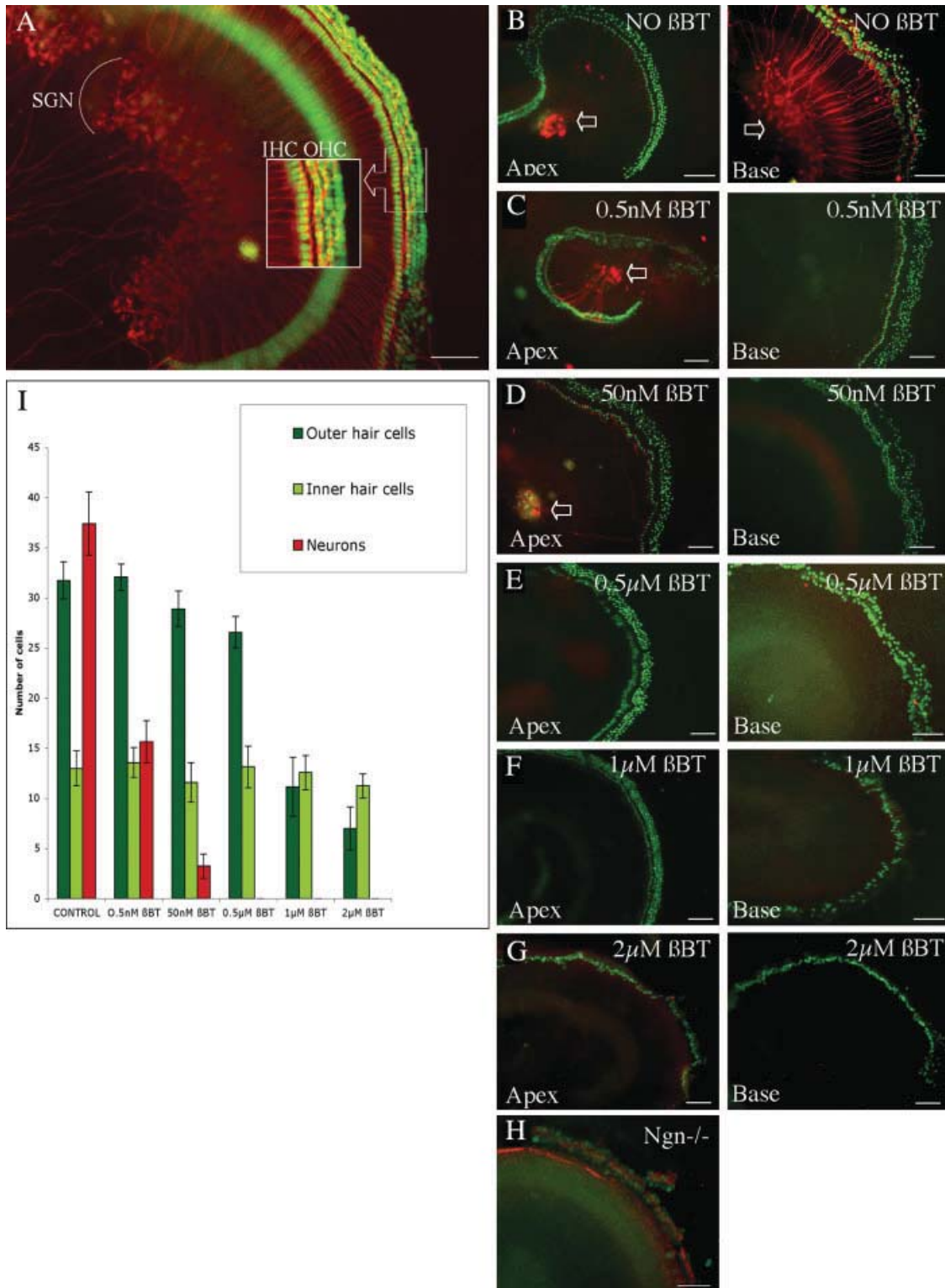


Figure 1

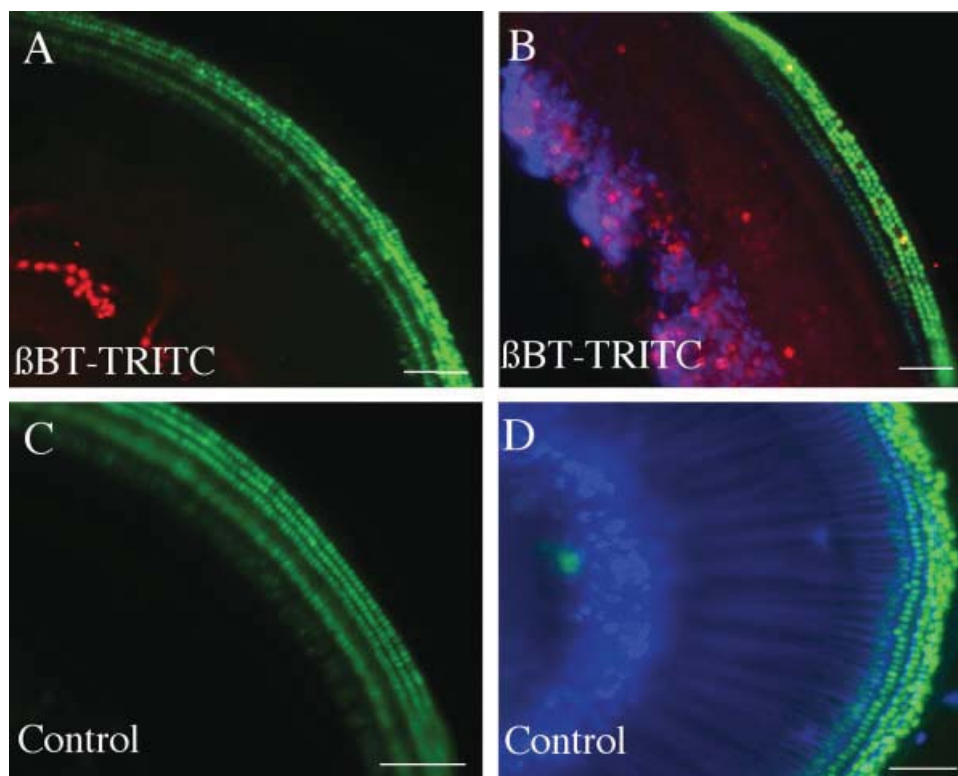


Figure 2 Treatment of newborn mouse organ of Corti with TRITC-labeled β -bungarotoxin. Organs of Corti of *Atoh1-nGFP* transgenic mouse were treated with 50 nM β -bungarotoxin labeled with TRITC (shown in red) for 30 min (A,B). The controls were treated with medium without β -bungarotoxin but containing TRITC (C,D). Tissue was fixed without further staining (A,C) or immunostained with antibody to β -III tubulin followed by a Cy5-labeled secondary antibody [blue, (B,D)]. Note labeling by β -bungarotoxin-TRITC in the spiral ganglion neurons. Scale bars are 100 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

the hair cells were reduced in number compared to the wild-type mouse.

Binding of β -Bungarotoxin by Spiral Ganglion Neurons

Beta-bungarotoxin binds to potassium channels on the surface of neurons (Herkert et al., 2001) and leads to cell death by increasing intracellular Ca^{++} concentrations. We labeled β -bungarotoxin with TRITC and tested the ability of the cochlear cell types to bind or take up the labeled molecule. TRITC-labeled β -bungarotoxin was rapidly and specifically associated with spiral ganglion neurons, and labeled the cell bodies of the neurons without evident distribution into neurites. At the lowest concentration used, extensive labeling of spiral ganglion cell bodies was observed after 30 min (Fig. 2). Controls without β -bungarotoxin showed no staining [Fig. 2(C,D)]. No binding of the labeled toxin was observed in hair cells, Schwann cells, or supporting cells during the labeling period.

Journal of Neurobiology. DOI 10.1002/neu

Apoptosis of Spiral Ganglion Neurons after β -Bungarotoxin Treatment

The organ of Corti after treatment with 0.5 μ M β -bungarotoxin for 24 h was examined for cell death by TUNEL staining. Extensive staining of apoptotic nuclei was observed in neurons [Fig. 3(A)] after a 24 h treatment, but hair cells were not affected by the toxin. In a control without the terminal transferase, no staining was observed in the organ of Corti [Fig. 3(B)]. In a control without β -bungarotoxin treatment, neurons were not labeled by the TUNEL reagent [Fig. 3(C)].

Spiral Ganglion Neurons from Newborn Mice Send Out Neurites that Contact Hair Cells

The destruction of neurons and survival of hair cells in the organ of Corti after β -bungarotoxin treatment allowed us to test for reinnervation of hair cells by spiral ganglion neurons. Intact spiral ganglia from P1 mice were placed in close proximity to the organ of

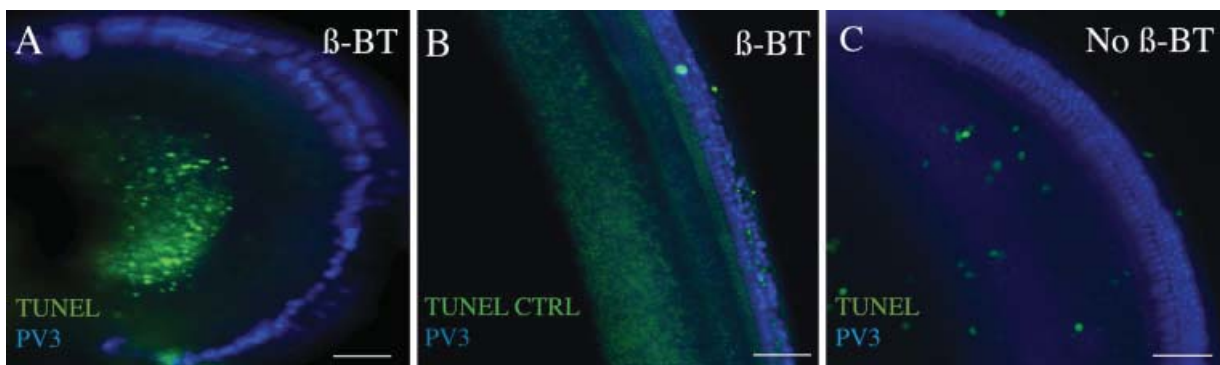


Figure 3 Organ of Corti explants treated with β -bungarotoxin and subjected to TUNEL assay. Organ of Corti of C57BL/6 mouse was treated with $0.5 \mu\text{M}$ β -bungarotoxin for 24 h (A). The treated sample was fixed and tested for TUNEL staining using FITC-labeled dUTP (green) and immunostained with parvalbumin 3 antibody and Cy5-conjugated secondary antibody (blue). (B) Organ of Corti of C57BL/6 mouse treated with control label solution (TUNEL CTRL) lacking terminal deoxynucleotidyl transferase, immunostained with parvalbumin 3 and Cy5-conjugated secondary antibody (blue). (C) A C57BL/6 mouse organ of Corti without β -bungarotoxin treatment was stained by the TUNEL procedure with FITC-labeled dUTP (green) and immunostained with parvalbumin 3 antibody (blue). The β -bungarotoxin treatment (A) caused neuronal cell death without death of the other cell types in the organ of Corti. Scale bars are $100 \mu\text{m}$. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

Corti that had been treated with β -bungarotoxin. The neurons sent out new processes that grew toward hair cells [Fig. 4(A)]. The new processes grew from the side or from the distal region of the organ of Corti and not in the radial direction taken by the original neurons that had been removed by the toxin. This finding was consistent and suggested a repulsion of the processes by the remaining tissue in the spiral lamina after removal of the spiral ganglion neurons. Dissociated spiral ganglion neurons transferred onto the deafferented organ of Corti also sent out neurites toward hair cells and formed terminal swellings once they had established contact with hair cells [Fig. 4(B)]. We found approximately 50 neurons making an average of 10 contacts with hair cells from the isolated neurons from one ear of a donor mouse. Similar connections between neurons from a donor mouse and hair cells in an explanted organ of Corti were found when neurons were taken from the *thy1-CFP* mouse. Staining of the neurons by both CFP and TuJ showed that the neurons had to originate from the donor mice [Fig. 4(C)].

The occurrence of synaptic proteins in contacts between the spiral ganglion neurons and hair cells was evaluated using an antibody to synapsin (Fig. 5). The neurons that sent out processes into the deafferented organ of Corti had synapsin-positive swellings at the connections to hair cells, indicating the presence of synaptic vesicles forming at a presynaptic site [Fig. 5(C)]. Staining was not seen in hair cells under these conditions and was restricted to the terminal

swellings of the neurons [Fig. 5(D)]. Some of the processes were branched and there was clear directional growth of each of these branches to individual hair cells. We observed that neurons contacting the outer hair cells branched to contact numerous targets, whereas branching in the inner hair cell area was more restricted; this pattern recapitulates one of the basic differences between the normal afferent innervation of inner and outer hair cells by type I and type II spiral ganglion cells, respectively (Berglund and Ryugo, 1987). The synaptic endings at the hair cells, furthermore, displayed SV2 immunoreactivity. Again, the staining was closely associated with hair cells, but this was due to the close apposition to the hair cell of the neuron and its terminal swelling [Fig. 6(C,D), open arrow]. The synaptic vesicle protein was almost exclusively found at points of contact with hair cells, and hair cells that had no synaptic contacts were not labeled [Fig. 6(D), closed arrow].

DISCUSSION

We show here that spiral ganglion neurons placed into a cochlea that had been treated with a neurotoxin to remove afferent neurons could grow processes that reinnervated hair cells. Replacement of both hair cells and auditory neurons is an important goal in protocols attempting to regenerate an auditory response after cell degeneration in the inner ear, as sensorineural hearing loss can result from degeneration of hair

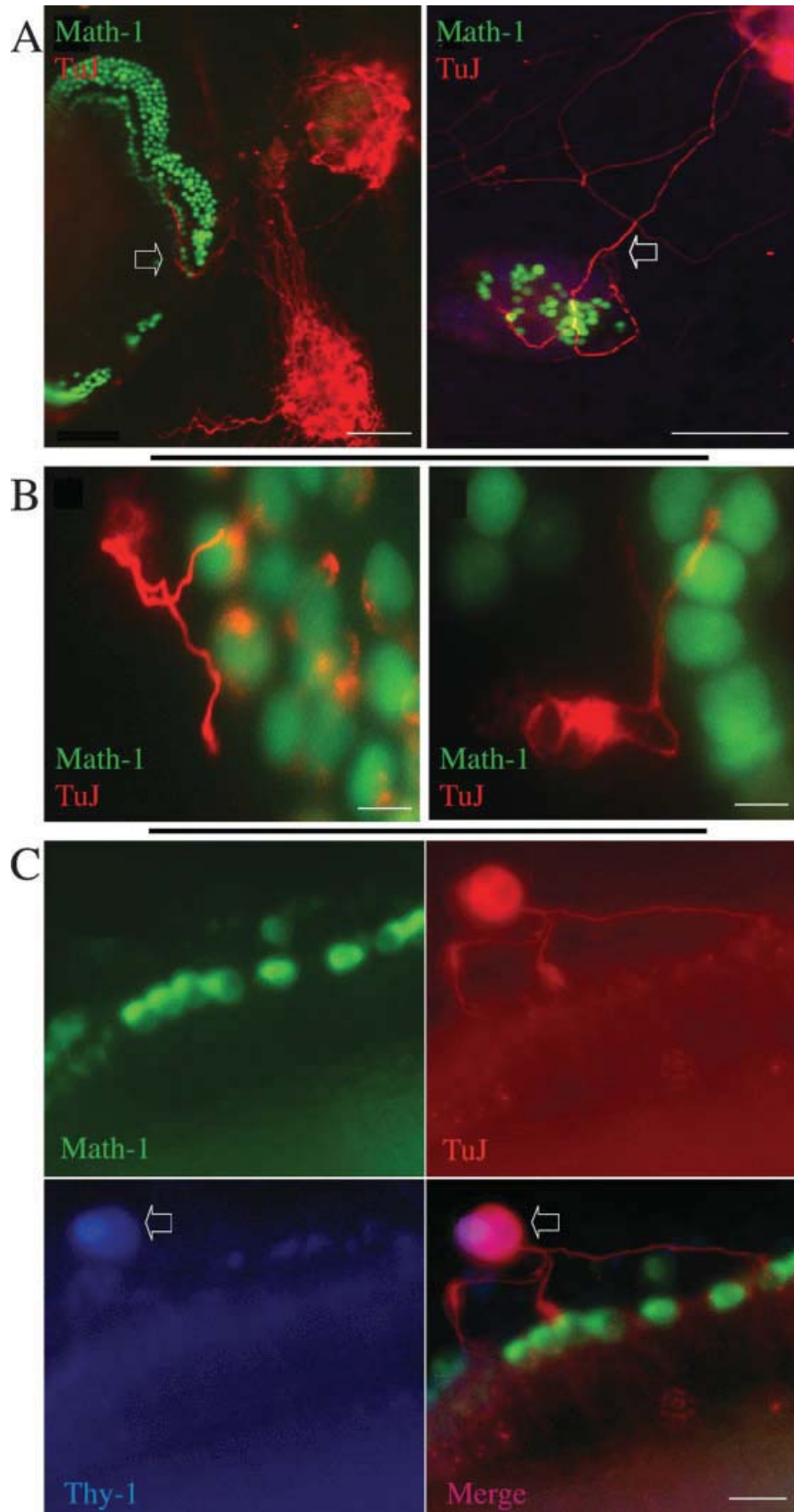


Figure 4

cells, neurons, or both. Selective removal of cochlear afferent neurons with the toxin provides an ideal system in which to better understand auditory nerve regeneration after engraftment of new neurons. Although several specific means for killing hair cells are available, it has been difficult to examine the regeneration of the sensory neuron until a system was available in which the spiral ganglion neurons were lost and hair cells remained intact.

The need for a model system in which auditory neurons could form new connections with hair cells required that we destroy the afferent innervation and spare the hair cells. Spiral ganglion neurons have been reported to be destroyed by cisplatin (Ding et al., 1999; Lee et al., 2003), but this also results in damage to hair cells (Ding et al., 1999). Aminoglycoside antibiotics destroy spiral ganglion neurons but this loss is secondary to the killing of hair cells (McFadden et al., 2004) and thus is not a useful model for nerve regeneration to hair cells. Oubain has been used to kill spiral ganglion neurons in a model of auditory nerve degeneration (Schmiedt et al., 2002; Lang et al., 2005) but the restricted killing of spiral ganglion neurons in the *in vivo* model requires that the toxin be infused directly onto the auditory nerve at some distance from the hair cells and the toxin would probably affect hair cells if it had access (Hamada and Kimura, 1999). Acetylsalicylic acid has also been reported to kill spiral ganglion neurons while sparing hair cells (Zheng and Gao, 1996). Mice with targeted deletions of genes that are needed for development of the sensory ganglia are potential

models for an *in vitro* system for hair cell innervation, but some of these animals such as the *trkB*, *trkC*, *NT-3*, *BDNF*, *Brn3a*, and *NeuroD* knock-outs are not useful for these studies because, despite defects in formation or targeting of these neurons, they retain partial innervation of hair cells (Farinas et al., 1994; Ernfors et al., 1995; Schimmang et al., 1995; Huang et al., 2001; Kim et al., 2001), whereas others, such as the *Brn3c* knock-out, are not useful because they have incomplete development of functional hair cells (Xiang et al., 1997). Mice with a targeted deletion of the transcription factor *ngn 1* (Ma et al., 2000) do not develop auditory neurons and are potentially useful as models for auditory nerve replacement, but, as we show here, the cochlea from this animal is not normal even at P0. Even if the hair cells were completely intact, the lack of development of auditory nerves as compared to loss after maturation of the neurons may be less representative of the human condition involving neuronal loss and, moreover, degenerating neurons may provide cues for the cells that would not be present in an ear that had never been innervated.

These studies of neuronal regeneration were possible because we were able to induce apoptosis in the afferent neurons with β -bungarotoxin. This toxin, from the Taiwanese banded krait, was described in the earliest studies as a toxin that poisoned the neuromuscular junction by depleting presynaptic vesicles in the motor neuron, and these studies focused on its presynaptic activity on motor neuron endings. It has thus been considered a presynaptic toxin (Montecucco and Rossetto, 2000). The toxin consists of two

Figure 4 Coculture of spiral ganglion or dissociated neurons with the denervated organ of Corti. The organ of Corti of an *Atoh1-nGFP* transgenic mouse was treated with $0.5 \mu\text{M}$ β -bungarotoxin for 2 days followed by addition of spiral ganglion tissue dissected at P1 from a C57BL/6 mouse (A) and cultured for 24 h. Immunostaining was with a β -III tubulin antibody followed by a TRITC-labeled secondary antibody (red). Left: spiral ganglion neurons extended processes into the organ of Corti (indicated by the arrow). Right: some processes of the spiral ganglion neurons (arrow) displayed growth toward the hair cells and made contacts after growing across a space between the hair cells and the neurons. (B) The organ of Corti of an *Atoh1-nGFP* transgenic mouse was treated with $0.5 \mu\text{M}$ β -bungarotoxin for 2 days followed by addition of dissociated spiral ganglion dissected from a C57BL/6 mouse at P1. Immunostaining was with a β -III tubulin antibody followed by a TRITC-labeled secondary antibody (shown in red). Hair cells are shown in green expressing nGFP. Left: spiral ganglion neurons sent processes into the organ of Corti where they contacted hair cells. Right: a neurite from a spiral ganglion neuron formed a terminal swelling at a point of contact with a hair cell. (C) The organ of Corti from an *Atoh1-nGFP* mouse was treated with $0.5 \mu\text{M}$ β -bungarotoxin for 2 days followed by addition of dissociated spiral ganglion neurons from a *thy1-CFP* mouse. Hair cells were visualized by expression of nGFP (*Math1*), and cultures were immunostained with an antibody to β -III tubulin (TuJ) followed by a TRITC-labeled secondary antibody (shown in red) and an antibody to CFP followed by a Cy5-conjugated secondary antibody (*Thy1*). Arrows show a neuron from the *thy1-CFP* mouse (stained for β -III tubulin and CFP) whose processes contacted hair cells. Scale bars are $100 \mu\text{m}$ in (A); $15 \mu\text{m}$ in (B); $20 \mu\text{m}$ in (C). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

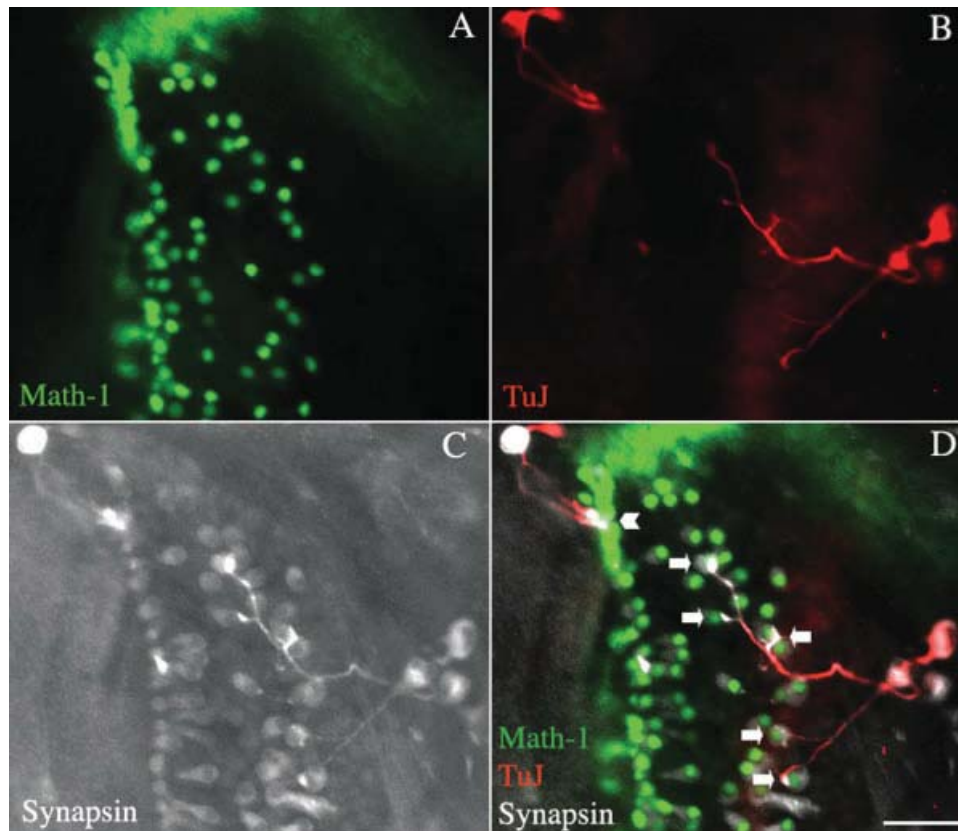


Figure 5 Assessment of synaptic markers at points of contact between spiral ganglion neurons and hair cells in a recipient organ of Corti. The organ of Corti of an *Atoh1-nGFP* transgenic mouse was treated with β -bungarotoxin (A), and after 2 days, spiral ganglion neurons obtained at P1 by dissociation of the tissue from a C57BL/6 mouse were added to the organ of Corti for 2 days. Hair cells visualized by endogenous fluorescence (green). (B) Staining with an antibody to β -III tubulin followed by a TRITC-labeled secondary antibody (shown in red). (C) Staining with antibody to synapsin detected with a Cy5-labeled secondary antibody (shown in white). (D) Merged image. The contacts between transplanted neurons and hair cells were immunopositive for synapsin. Neurons made several contacts with outer hair cells (arrows), while they made single contacts with inner hair cells (arrowhead). Scale bar is 30 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

polypeptides linked by disulfide bonds: subunit A, which is a Ca^{++} -dependent phospholipase A2, and subunit B, which is a potassium channel binding subunit homologous to Kunitz domain protease inhibitors. The toxin is thought to act by binding to potassium channels and inducing an increase in intracellular Ca^{++} that leads to cell death (Herkert et al., 2001; Shakhman et al., 2003). We have found that spiral ganglion neurons are killed by β -bungarotoxin by a mechanism that involves specific binding to the neurons and induction of apoptosis. As the β -bungarotoxin is thought to bind to voltage-gated potassium channels (Herkert et al., 2001) the binding by spiral ganglion neurons indicates that these ion channels are expressed in these cells at the time of birth. The reason that hair cells were spared by the β -bungarotoxin

is not clear, although we speculate that the receptors for the toxin are at a lower concentration on the surface of these cells in the early postnatal cochlea, before complete development of the hair cell synapse to afferent neurons. Hair cells express voltage-gated potassium channels that change their conductance characteristics in the time interval between birth and the onset of hearing (Kros et al., 1998) and therefore we expected some cell death in these cells as well. However, we found that β -bungarotoxin did not bind to hair cells or cause cell death under conditions in which it did destroy the neurons.

Uptake of β -bungarotoxin by receptor-mediated endocytosis after binding to potassium channels or to NMDA receptors (Tseng and Lin-Shiau, 2003) causes an increase in intracellular Ca^{++} concentration and

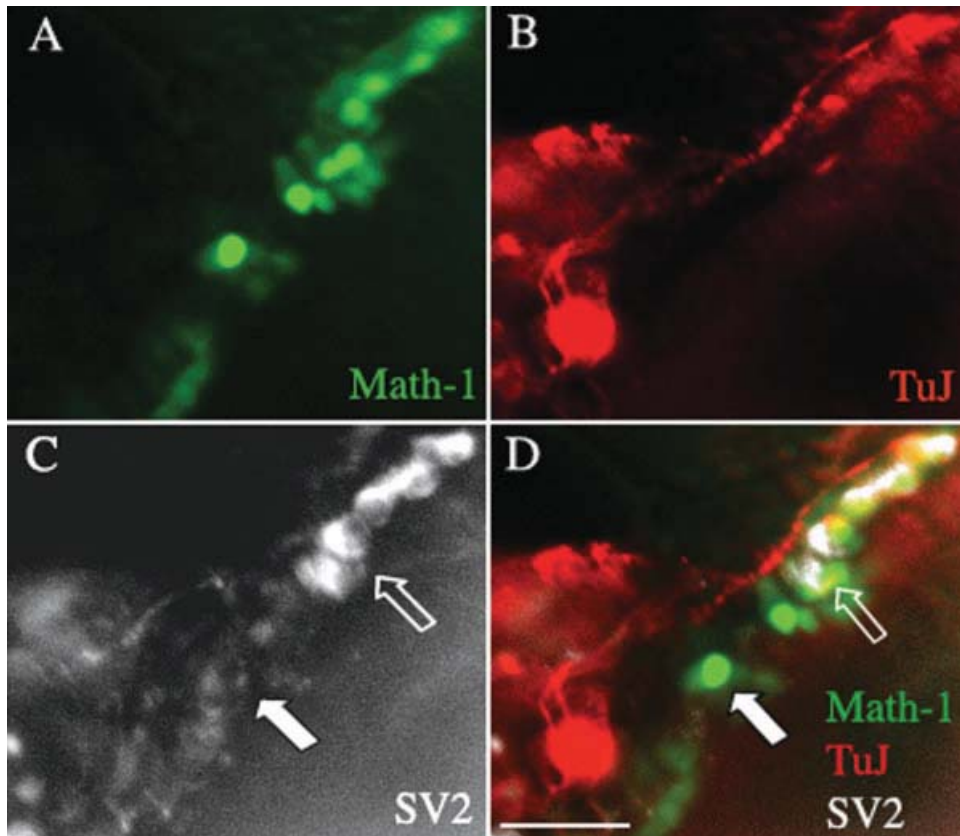


Figure 6 Staining of synaptic markers in neurons cocultured with a β -bungarotoxin treated organ of Corti. An organ of Corti from an *Atoh1-nGFP* transgenic mouse was treated with β -bungarotoxin (A) and dissociated spiral ganglion tissue from a P1 mouse was added for a 2-day culture. Hair cells were positive for endogenous GFP. (B) Staining with an antibody to β -III tubulin followed by a TRITC-labeled secondary antibody (shown in red). (C) SV2 antibody detected with a Cy5-labeled secondary antibody (shown in white). (D) Merged image. Strong staining for SV2 was seen at points of contact between neurons from the C57BL/6 mouse and hair cells from the *Atoh1-nGFP* mouse (open arrow). No staining was seen in hair cells that were not in contact with a neuron (solid arrow). Scale bar is 30 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at <http://www.interscience.wiley.com>.]

generation of reactive oxygen species (Shakhman et al., 2003). In previous studies it had been noted that β -bungarotoxin destroyed the auditory ganglion neurons of the chick (Hirokawa, 1977). The peripheral process of the spiral ganglion neuron is the postsynaptic side of the hair cell synapse, and thus the toxin is acting on the postsynaptic side of the afferent synapse in the cochlea. These cells undergo apoptotic cell death, presumably due to an increase in intracellular Ca^{++} and an increase in oxygen radicals. The β -bungarotoxin model of spiral ganglion cell death is useful because apoptosis appears to be the mechanism by which the neurons are lost *in vivo*.

Formation of new synaptic connections in the *in vitro* situation that we have described requires that the neurons be able to find their targets and undergo synaptogenesis. The formation of new synaptic con-

nections is the key step in regeneration of the auditory afferent system and will depend upon the ability of these neurons to recognize and connect to hair cells. We have shown in this study that afferent neurons connect with hair cells in this model of regeneration and that, at points of contact with hair cells at these nascent synapses, the neurons express synapsin and SV2. Whether these are functional synapses will have to be determined in future studies by testing the electrophysiological response of the neurons to hair cell stimulation. The route taken by the spiral ganglion neurons that contacted outer hair cells was branched, in contrast to the direct, unbranched path taken by spiral ganglion neurons to inner hair cells, and this suggested some specificity in the pathfinding as these patterns are similar to the pattern observed in animals. Our observation of connections between

these cells and apparent synapse formation is novel, because it has not been shown that neurons can form new synapses with hair cells that had lost their afferent innervation, and it does suggest, moreover, the possibility of regeneration of the primary afferent neurons of this sensory system by implantation of new neurons. Little regeneration occurs spontaneously after the death of spiral ganglion neurons (Carnicero et al., 2002; Sekiya et al., 2003), and even damage to the peripheral processes of these neurons, which have limited capacity for regrowth, can lead to hearing loss (Nadol, 1997; Puel et al., 1997).

The processes from the spiral ganglion neurons that contact hair cells appear to have some properties of presynaptic fibers, including synapsin staining and SV2 staining. The nature of the neuronal process that extends to the hair cells is of interest because the process is a dendrite based on the conductance of the signal from the hair cells to the central nervous system, and yet, during development the process extends to the hair cell much like a peripheral axon, which it resembles histologically. Previous work has indicated that the processes of vestibular ganglion neurons (Scarfone et al., 1991) stain for synapsin and synaptophysin during development, and it is possible that the identity of this peripheral process is only acquired after it is connected to the hair cell. Initial outgrowth of neurites from other neurons takes place without specifying their identity as axon or dendrite until one process takes on an axonal identity and expresses axonal markers (Goslin and Banker, 1989). The establishment of polarization appears to be controlled by the inactivation of GSK-3 β in axons but not dendrites (Jiang et al., 2005), and by activation of the small GTPases Rap1 and Cdc42 (Schwamborn and Puschel, 2004). The auditory neurons likely had not acquired their full bipolar character when we transplanted them and therefore may express axonal specializations in the growing neurites, and these may only become afferent peripheral processes when they make a connection to the hair cell. The pathfinding ability of the neurons may depend on use of guidance signals that are used by growing axons so that the neural process can respond to cues from the hair cell. In future experiments we plan to investigate whether these processes lose their synaptic vesicles as they become the postsynaptic side of a functional synapse with the hair cell and we will assess the ability of stem cell-derived neurons to replace damaged spiral ganglion neurons.

The authors thank Qiufu Ma for the *neurogenin 1* knock-out mice and Jane E. Johnson for the *Atoh1-nGFP* mice.

REFERENCES

- Bao J, Lei D, Du Y, Ohlemiller KK, Beaudet AL, Role LW. 2005. Requirement of nicotinic acetylcholine receptor subunit beta2 in the maintenance of spiral ganglion neurons during aging. *J Neurosci* 25:3041–3045.
- Berglund AM, Ryugo DK. 1987. Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. *J Comp Neurol* 255:560–570.
- Bok J, Zha XM, Cho YS, Green SH. 2003. An extranuclear locus of cAMP-dependent protein kinase action is necessary and sufficient for promotion of spiral ganglion neuronal survival by cAMP. *J Neurosci* 23:777–787.
- Carnicero E, Knipper M, Tan J, Alonso MT, Schimmang T. 2002. Herpes simplex virus type 1-mediated transfer of neurotrophin-3 stimulates survival of chicken auditory sensory neurons. *Neurosci Lett* 321:149–152.
- Ding DL, Wang J, Salvi R, Henderson D, Hu BH, McFadden SL, Mueller M. 1999. Selective loss of inner hair cells and type-I ganglion neurons in carboplatin-treated chinchillas. Mechanisms of damage and protection. *Ann NY Acad Sci* 884:152–170.
- Ernfors P, Van De Water T, Loring J, Jaenisch R. 1995. Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron* 14:1153–1164.
- Farinas I, Jones KR, Backus C, Wang XY, Reichardt LF. 1994. Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3. *Nature* 369:658–661.
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, et al. 2000. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28:41–51.
- Fritzsch B, Farinas I, Reichardt LF. 1997. Lack of neurotrophin 3 causes losses of both classes of spiral ganglion neurons in the cochlea in a region-specific fashion. *J Neurosci* 17:6213–6225.
- Goslin K, Banker G. 1989. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 108:1507–1516.
- Hamada M, Kimura RS. 1999. Morphological changes induced by administration of a Na⁺, K⁺-ATPase inhibitor in normal and hydropic inner ears of the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 119:778–786.
- Herkert M, Shakhman O, Schweins E, Becker CM. 2001. Beta-bungarotoxin is a potent inducer of apoptosis in cultured rat neurons by receptor-mediated internalization. *Eur J Neurosci* 14:821–828.
- Hirokawa N. 1977. Disappearance of afferent and efferent nerve terminals in the inner ear of the chick embryo after chronic treatment with beta-bungarotoxin. *J Cell Biol* 73:27–46.
- Hossain WA, Brumwell CL, Morest DK. 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* 175:138–151.
- Hu Z, Ulfendahl M, Olivius MP. 2005a. 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 CB, Holmstrom N, Duan M, Frisen J, Ulfendahl M. 2005b. Survival and neural differentiation of adult neural stem cells transplanted into the mature inner ear. *Exp Cell Res* 302:40–47.
- Huang EJ, Liu W, Fritsch B, Bianchi LM, Reichardt LF, Xiang M. 2001. *Brn3a* is a transcriptional regulator of soma size, target field innervation and axon pathfinding of inner ear sensory neurons. *Development* 128:2421–2432.
- Jiang H, Guo W, Liang X, Rao Y. 2005. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. *Cell* 120:123–135.
- Keithley EM, Croskrey KL. 1990. Spiral ganglion cell endings in the cochlear nucleus of young and old rats. *Hear Res* 49:169–177.
- Keithley EM, Feldman ML. 1979. Spiral ganglion cell counts in an age-graded series of rat cochleas. *J Comp Neurol* 188:429–442.
- Kim WY, Fritsch B, Serls A, Bakel LA, Huang EJ, Reichardt LF, Barth DS, et al. 2001. *NeuroD*-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development. *Development* 128:417–426.
- Kros CJ, Ruppertsberg JP, Rusch A. 1998. Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* 394:281–284.
- Lang H, Schulte BA, Schmiedt RA. 2005. Ouabain Induces Apoptotic Cell Death in Type I Spiral Ganglion Neurons, but not Type II Neurons. *J Assoc Res Otolaryngol* 6:63–74.
- Lee JE, Nakagawa T, Kim TS, Iguchi F, Endo T, Dong Y, Yuki K, et al. 2003. A novel model for rapid induction of apoptosis in spiral ganglions of mice. *Laryngoscope* 113:994–999.
- Liberman MC, Kiang NY. 1978. Acoustic trauma in cats. Cochlear pathology and auditory-nerve activity. *Acta Otolaryngol Suppl* 358:1–63.
- Lumpkin EA, Collisson T, Parab P, Omer-Abdalla A, Haeberle H, Chen P, Doetzlhofer A, et al. 2003. *Math1*-driven GFP expression in the developing nervous system of transgenic mice. *Gene Expr Patterns* 3:389–395.
- Ma Q, Anderson DJ, 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* 1:129–143.
- McFadden SL, Ding D, Jiang H, Salvi RJ. 2004. Time course of efferent fiber and spiral ganglion cell degeneration following complete hair cell loss in the chinchilla. *Brain Res* 997:40–51.
- Montecucco C, Rossetto O. 2000. How do presynaptic PLA2 neurotoxins block nerve terminals? *Trends Biochem Sci* 25:266–270.
- Nadol JB, Jr. 1997. Patterns of neural degeneration in the human cochlea and auditory nerve: implications for cochlear implantation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 117:220–228.
- Noben-Trauth K, Zheng QY, Johnson KR. 2003. Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. *Nat Genet* 35:21–23.
- Puel JL, d'Aldin C, Ruel J, Ladrech S, Pujol R. 1997. Synaptic repair mechanisms responsible for functional recovery in various cochlear pathologies. *Acta Otolaryngol* 117:214–218.
- Scarfone E, Dememes D, Sans A. 1991. Synapsin I and Synaptophysin expression during ontogenesis of the mouse peripheral vestibular system. *J Neurosci* 11:1173–1181.
- Schimmang T, Minichiello L, Vazquez E, San Jose I, Giraldez F, Klein R, Represa J. 1995. Developing inner ear sensory neurons require *TrkB* and *TrkC* receptors for innervation of their peripheral targets. *Development* 121:3381–3391.
- Schmiedt RA, Okamura HO, Lang H, Schulte BA. 2002. Ouabain application to the round window of the gerbil cochlea: a model of auditory neuropathy and apoptosis. *J Assoc Res Otolaryngol* 3:223–233.
- Schwamborn JC, Puschel AW. 2004. The sequential activity of the GTPases *Rap1B* and *Cdc42* determines neuronal polarity. *Nat Neurosci* 7:923–929.
- Sekiya T, Shimamura N, Yagihashi A, Suzuki S. 2003. Effect of topically applied basic fibroblast growth factor on injured cochlear nerve. *Neurosurgery* 52:900–907.
- Shakhman O, Herkert M, Rose C, Humeny A, Becker CM. 2003. Induction by beta-bungarotoxin of apoptosis in cultured hippocampal neurons is mediated by Ca²⁺-dependent formation of reactive oxygen species. *J Neurochem* 87:598–608.
- Sobkowitz HM, Bereman B, Rose JE. 1975. Organotypic development of the organ of Corti in culture. *J Neurocytol* 4:543–572.
- Stankovic K, Rio C, Xia A, Sugawara M, Adams JC, Liberman MC, Corfas G. 2004. Survival of adult spiral ganglion neurons requires *erbB* receptor signaling in the inner ear. *J Neurosci* 24:8651–8661.
- Starr A, Sisinger YS, Pratt H. 2000. The varieties of auditory neuropathy. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 11:215–230.
- Suzuka Y, Schuknecht HF. 1988. Retrograde cochlear neuronal degeneration in human subjects. *Acta Otolaryngol Suppl* 450:1–20.
- Tseng WP, Lin-Shiau SY. 2003. Activation of NMDA receptor partly involved in beta-bungarotoxin-induced neurotoxicity in cultured primary neurons. *Neurochem Int* 42:333–344.
- White JA, Burgess BJ, Hall RD, Nadol JB. 2000. Pattern of degeneration of the spiral ganglion cell and its processes in the C57BL/6J mouse. *Hear Res* 141:12–18.
- Xiang M, Gan L, Li D, Chen ZY, Zhou L, O'Malley BW Jr., Klein W, et al. 1997. Essential role of POU-domain factor *Brn-3c* in auditory and vestibular hair cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9445–9450.
- Zheng JL, Gao WQ. 1996. Differential damage to auditory neurons and hair cells by ototoxins and neuroprotection by specific neurotrophins in rat cochlear organotypic cultures. *Eur J Neurosci* 8:1897–1905.

Minireview

The potential role of endogenous stem cells in regeneration of the inner ear

Rodrigo Martinez-Monedero ^{a,b}, Kazuo Oshima ^d, Stefan Heller ^d, Albert S.B. Edge ^{a,b,c,*}

^a Department of Otolaryngology and Laryngology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, United States

^b Tillotson Unit for Cell Biology, Eaton-Peabody Laboratory, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 243 Charles Street, Boston, MA 02114, United States

^c Program in Speech and Hearing Bioscience and Technology, Division of Health Science and Technology, Harvard and MIT, Cambridge, MA 02139, United States

^d Departments of Otolaryngology-HNS and Molecular and Cellular Physiology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, United States

Received 17 October 2006; received in revised form 20 December 2006; accepted 22 December 2006

Available online 20 January 2007

Abstract

Stem cells in various mammalian organs retain the capacity to renew themselves and may be able to restore damaged tissue. Their existence has been proven by genetic tracer studies that demonstrate their differentiation into multiple tissue types and by their ability to self-renew through proliferation. Stem cells from the adult nervous system proliferate to form clonal floating colonies called spheres *in vitro*, and recent studies have demonstrated sphere formation by cells in the cochlea in addition to the vestibular system and the auditory ganglia, indicating that these tissues contain cells with stem cell properties. The presence of stem cells in the inner ear raises the hope of regeneration of mammalian inner ear cells but is difficult to correlate with the lack of spontaneous regeneration seen in the inner ear after tissue damage. Loss of stem cells postnatally in the cochlea may correlate with the loss of regenerative capacity and may limit our ability to stimulate regeneration. Retention of sphere forming ability in adult vestibular tissues suggests that the limited capacity for repair may be attributed to the continued presence of progenitor cells. Future strategies for regeneration must consider the distribution of endogenous stem cells in the inner ear and whether the tissue retains cells with the capacity for regeneration.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Stem cells; Hair cells; Spiral ganglion; Regeneration

1. Regeneration of inner ear

Potential therapeutic implications have spurred investigation of inner ear progenitor cells. Following reports that hair cells could regenerate in the sensory epithelium of birds and amphibians (Corwin and Cotanche, 1988; Ryals and Rubel, 1988), several investigations had indicated that hair cells could regenerate in the mammalian vestibular system (Forge et al., 1993; Montcouquiol and Corwin, 2001; Warchol et al., 1993). In the vestibular organs, cells that

retain the capacity to divide and differentiate into more specialized cells appear to persist in the adult. However, several investigators have hypothesized that the complex epithelial organization of the organ of Corti only can occur after terminal differentiation and exit of cochlear cells from mitosis (Corwin and Oberholtzer, 1997; Kelley et al., 1995).

In fact, cell division in supporting cells of vestibular organs has been reported (Warchol et al., 1993), but cochlear supporting cells had an extremely limited ability to regenerate hair cells or to undergo cell division in early postnatal mice after lesioning (Kelley et al., 1995). The capacity for supporting cell division in mammalian vestibular organs can be enhanced by treatments with mitogenic growth factors, which are most effective in epithelia from neonates (Lambert, 1994). The differences in response to mitogens between mammals and birds is consistent with

* Corresponding author. Address: Tillotson Unit for Cell Biology, Eaton-Peabody Laboratory, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 243 Charles Street, Boston, MA 02114, United States. Tel.: +1 617 573 4452; fax: +1 617 720 4408.

E-mail address: albert_edge@meei.harvard.edu (A.S.B. Edge).

differences in the ability to regenerate hair cells throughout life (Montcouquiol and Corwin, 2001). The basis for the reoccurrence of hair cells, albeit limited, in the damaged utricle seems to be cell proliferation, which is most readily observed after treatment with mitogenic growth factors. This regenerative ability has been proposed to be due to stem cells that reside in the sensory epithelium of the utricular macula (Li et al., 2003).

Recent studies have shown that adult vestibular stem cells are pluripotent: they differentiate into cell types corresponding to all three germ layers, endoderm, mesoderm, and ectoderm, and this includes neurons and hair cells *in vitro* (Li et al., 2003). This indicates that these endogenous cells are true stem cells. More recent data indicates that stem cells can be isolated from the neonatal cochlea as well (Oshima et al., 2007). The existence of stem cells in the mammalian cochlea opens the possibility that a damaged cochlea could be repaired by proliferation and differentiation of endogenous cells. However, despite the pluripotent differentiation potential of these cells, recovery does not occur to any significant extent after damage to hair cells or neurons in the adult mammalian cochlea raising the possibility that cochlear stem cells disappear after birth or that they lose their stemness (i.e. the capacity to proliferate). The questions that remain are whether there are cells *in vivo* that might be available for replacement of hair cells and what mechanism could lead to proliferation and replacement of these cells. Recent reports on overexpression of a number of genes have provided some hope that adult cochlear cells may have an inherent capacity for regeneration when stimulated by the appropriate signals (Izumikawa et al., 2005), or that persistent stem cells or cells with stem cell-like properties might be directed toward a hair cell phenotype by gene expression in the appropriate spatial and temporal sequence. A new therapeutic approach would be possible if we could harness the pluripotency of potentially dormant progenitor cells to permit regeneration of hair cells in a damaged sensory epithelium or to generate neurons *in situ* that can reinnervate hair cells (Li et al., 2004).

Both neurons and hair cells are usually involved in the pathogenesis of hearing loss. A variety of environmental and genetic causes lead to hair cell loss. Spiral ganglion neurons undergo secondary degeneration in regions of hair cell loss in many types of sensorineural hearing loss (Lieberman and Kiang, 1978), and most hearing loss is permanent. Replacement of these cells will be a vital step in the treatment of inner ear lesions in which spared cells cannot supplant the function of lost cells. To replace lost cells two possible approaches can be envisaged: stem cell transplantation and stimulation of self-repair. For the latter approach endogenous stem cells would undergo proliferation and be converted into new hair cells. The demonstration that inner ear progenitor cells could differentiate into hair cells *in vitro* raises the possibility that they could regenerate in the inner ear. Here, we concentrate on mechanisms that could take advantage of endogenous cells for repair of the inner ear.

2. Adult tissue stem cells

The regeneration capacity of tissues are determined in part by whether they contain endogenous stem cells. Some tissues that have a high turnover rate are thought to replace senescent cells by proliferation and differentiation of tissue stem cells. These tissues have stem cells that constantly replace lost cells in the adult, and their designation as adult tissue stem cells is based on their continued ability to self-renew and differentiate. Adult stem cells can only proliferate for a limited number of generations, and their response to differentiation signals declines after each generation. The failure of cells to regenerate could also be due to a tissue environment that either does not support or prevents regeneration (Horner et al., 2002). Tissues with high turnover as well as the capacity for regeneration, however, do not necessarily have stem cells that account for regeneration. In the liver, where oval cells have been shown to have progenitor cell properties, the regrowth of damaged tissue has been attributed largely to the ability of even fully differentiated cells to undergo mitosis with appropriate signaling (Fausto, 2004). The issue of whether an adult organ contains stem cells has been easier to settle in tissues with high turnover rates such as blood, skin and intestine (Alonso and Fuchs, 2003; Weissman, 2000) but more difficult to decide conclusively for liver, heart, pancreas, and the central and peripheral nervous systems (Bixby et al., 2002; Bonner-Weir and Weir, 2005; Dor et al., 2004; Fausto, 2004; Gage, 2002; Rubart and Field, 2006; Urbanek et al., 2005). Both routes of replacement have been proposed in the pancreas: an absence of stem cells with only occasional cell division by existing pancreatic beta-cells (Dor et al., 2004); and replacement of lost cells from a usually quiescent progenitor cell compartment (Bonner-Weir and Weir, 2005).

Regrowth of fibers after tissue damage is known to occur in the peripheral nervous system. Olfactory neurons have been shown to regrow spontaneously (Pasterkamp et al., 1998), and motor neurons can regrow to their original targets (McMahan, 1990) at the motor endplate, but in these examples, the neuron survives the injury and damaged axons regrow to their targets. In contrast, replacement of lost neural cells has rarely been demonstrated. In the central nervous system, although there is little normal turnover, cells can be recruited to replace lost neurons (Gage, 2002). Neural stem cells are present in the subventricular zone of the lateral ventricles and in the dentate gyrus. These cells are capable of replacing lost neurons by cell division followed by migration and differentiation. The presence of these cells may contribute to the formation of new connections during normal activity, as well as permitting some extent of repair after neuronal injury and loss. The discovery of cells that could undergo self-renewal and cell division in the adult opened the way to understanding regeneration as well as growth of new circuitry in the adult central and peripheral nervous systems.

Thus, stem cells have been demonstrated in many adult tissues, but cell regeneration does not necessarily prove the

existence of stem cells. The existence of populations of cells that proliferate and are capable of differentiation to multiple cell types can be demonstrated by cell recruitment, proliferation and differentiation in response to injury *in vivo*, usually by use of a genetic tracer to follow the lineage of a cell (Gage, 2002; Reynolds and Weiss, 1992), but this can be difficult to demonstrate without the necessary tracers for a tissue specific stem cell. The existence of stem cells can now also be demonstrated by several *in vitro* criteria: in addition to the capacity for cell division and differentiation, these include expression of markers of stem cells, and the capacity to form neurospheres (Reynolds and Weiss, 1992).

3. Progenitors for hair cells

Are hair cells capable of regeneration after damage from toxins or noise? Recovery of normal thresholds suggests that limited damage to hair cells after acoustic trauma may be repaired by the cell (Gale et al., 2002; Harding et al., 2002). However, no evidence for cell division leading to replacement of hair cells has been reported for the adult mammalian cochlea.

In addition to the vestibular system, the mammalian cochlea in neonates contains cells that have properties of stem cells based on sphere formation and self-renewal (Oshima et al., 2007) (Fig. 1). These cells differ from the normal post-mitotic cells present in the organ of Corti and vestibular system (Oshima et al., 2007). The cells formed clonal spheres that could be propagated in culture and had from 1 to 3 stem cells per sphere. The capacity for sphere formation decreased with age: in the cochlea, sphere formation could be demonstrated in embryonic and newborn animals but few spheres were produced from the adult (Fig. 2). This is consistent with the finding that vestibular organs can regenerate some hair cells throughout life

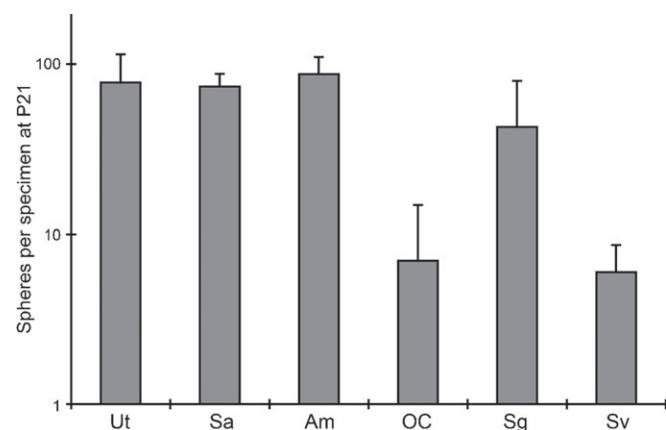


Fig. 1. Inner ear stem cells from the vestibular and auditory systems of a P21 mouse. Spheres were generated from vestibular (Utricle, Ut; Sacculus, Sa; Ampulla, Am) and cochlear (organ of Corti, oC; Spiral ganglion, Sg; Stria vascularis, Sv) organs by culture of dissociated cells for 7 days. The number of spheres was counted and expressed per single specimen (Ut, Sa, oC, Sc, Sv) or per 3 ampullae. Data reproduced with kind permission from Springer Science and Business Media from Oshima et al. (2007).

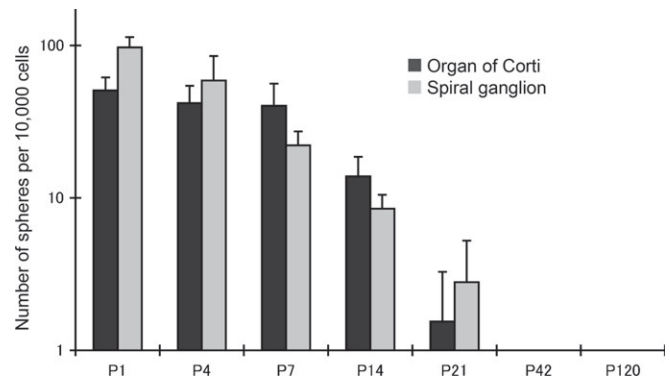


Fig. 2. Number of spheres generated from cochlear tissues in newborn and postnatal mice. Formation of spheres from dissociated cells was quantified after 7 days in culture and was expressed as spheres per 10^4 cells. The generation of spheres from the organ of Corti decreased in the first few postnatal days. Data reproduced with kind permission from Springer Science and Business Media from Oshima et al. (2007).

whereas the cochlea does not (Corwin and Oberholtzer, 1997; Kelley et al., 1995; Warchol et al., 1993).

Induction of differentiation of these cells resulted in the expression of markers for hair cells (Oshima et al., 2007), and these cells occurred in patches surrounded by cells with markers of supporting cells (Fig. 3).

Where are the precursor cells that give rise to spheres *in vitro*? Several lines of evidence suggest that progenitor cells may be in the greater epithelial ridge in the newborn. GFP expressed under the control of the nestin promoter was found in the GER (Lopez et al., 2004) as well as in border cells, phalangeal cells and Deiters cells. Nestin was found in supporting cells postnatally, although the expression level was lower at later time points and only a few Deiters cells were positive at P60. Could supporting cells be precursors? Supporting cells have the capacity to develop hair cell characteristics upon viral transduction with Atoh1 (Izumikawa et al., 2005; Zheng and Gao, 2000). The recent finding that supporting cells from the cochlea have the capacity to divide and differentiate into hair cells *in vitro* (White et al., 2006) further suggests that they could play a role in regeneration, but their ability to differentiate into other cell types in the cochlea was limited to newborn mice and did not occur in 2 week old mice. This is consistent with our data that showed that stem cell numbers decreased in the first few postnatal weeks.

4. Progenitor cells in spiral ganglion

Degeneration of the spiral ganglion cell and its processes may occur as a secondary or a primary event (Zimmermann et al., 1995). Secondary cochlear neuronal degeneration is thought to follow a variety of insults to the cochlea. Primary cochlear neuronal degeneration has been described in a variety of pathologies that cause direct damage to neurons (Starr et al., 1996; Varga et al., 2003), and can occur in mice exposed to sound pressure levels that do not cause hair cell loss (Kujawa and Liberman, 2006).

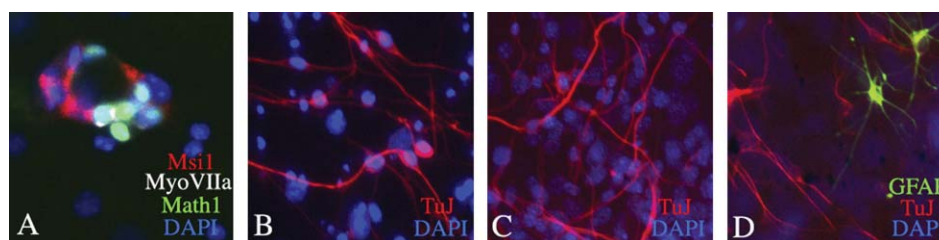


Fig. 3. Differentiation of inner ear cells after culture of spheres. (A) Generation of hair cell-like cells from organ of Corti spheres. Musashi 1 positive supporting cells appeared to be adjacent to each cell expressing myosin VIIa and Math1 (hair cell marker positive cells) in this sphere differentiated for 2 weeks in culture. (B) Differentiation of neurons from spheres obtained from spiral ganglion. The appearance of cells that were positive for β -III tubulin (stained with antibody TuJ) and had a neuronal morphology is shown after 1 week in culture. (C) Neuronal differentiation from spheres derived from utricle. Neurons obtained from utricular spheres were β -III tubulin positive. (D) Utricular spheres contained stem cells that differentiated to become β -III tubulin-positive neurons and GFAP-positive glia. Some of the data in this figure reproduced with kind permission from Springer Science and Business Media from Oshima et al. (2007).

Spiral ganglion neurons have been reported to regrow fibers to varying extent after damage in different animal models. Several studies have suggested that the endings regrow after damage by glutamate toxicity in guinea pigs (Puel et al., 1997; Sekiya et al., 2003). Experimental sectioning of the auditory nerve in mice leads to extensive regrowth of fibers into the cochlea (Sugawara et al., 2005). However, in humans, the extent of regrowth is not sufficient to be clinically significant (Nadol, 1997).

Do endogenous cells undergo cell division in the spiral ganglion? The formation of spheres from spiral ganglion of mice in the early postnatal period suggests the possibility that the ganglion may have cells with stem cell properties (Oshima et al., 2007). These cells proliferate in spheres and have the capacity to differentiate into neurons *in vitro* (Fig. 3). In addition we find neurons after a similar differentiation protocol with spheres prepared from the organ of Corti or from the vestibular sensory epithelia (Fig. 3). These stem cells can give rise to hair cells and neurons and glia (Fig. 3) and, thus, may be similar in their capacity for differentiation to endogenous otocyst progenitors that appear to give rise to supporting cells, hair cells and neurons in the embryo. Others have demonstrated the presence of neural progenitor cells in the adult human auditory nerve. These were nestin-positive cells that divided and expressed markers found in inner ear sensory neurons such as TrkB and TrkC (Rask-Andersen et al., 2005).

Replacement of spiral ganglion neurons and reformation of neural connections to hair cells has been demonstrated using tissue from newborn animals as well as embryonic stem cells as sources of neurons for transplantation into *in vitro* (Martinez-Monedero et al., 2006) and *in vivo* models (Corrales et al., 2006).

Acknowledgements

Supported by grants F33 DC006789, RO1 DC007174, and DC006167 as well as P30 DC05209 from the National Institute on Deafness and other Communicative Disorders (NIDCD).

References

- Alonso, L., Fuchs, E., 2003. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev.* 17, 1189–1200.
- Bixby, S., Kruger, G.M., Mosher, J.T., Joseph, N.M., Morrison, S.J., 2002. Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron* 35, 643–656.
- Bonner-Weir, S., Weir, G.C., 2005. New sources of pancreatic beta-cells. *Nat. Biotechnol.* 23, 857–861.
- Corrales, C.E., Pan, L., Li, H., Liberman, M.C., Heller, S., 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.
- Corwin, J.T., Cotanche, D.A., 1988. Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 240, 1772–1774.
- Corwin, J.T., Oberholtzer, J.C., 1997. Fish n' chicks: model recipes for hair-cell regeneration? *Neuron* 19, 951–954.
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., Melton, D.A., 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41–46.
- Fausto, N., 2004. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 39, 1477–1487.
- Forge, A., Li, L., Corwin, J.T., Nevill, G., 1993. Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science* 259, 1616–1619.
- Gage, F.H., 2002. Neurogenesis in the adult brain. *J. Neurosci.* 22, 612–613.
- Gale, J.E., Meyers, J.R., Periasamy, A., Corwin, J.T., 2002. Survival of bundleless hair cells and subsequent bundle replacement in the bullfrog's saccule. *J. Neurobiol.* 50, 81–92.
- Harding, G.W., Bohne, B.A., Ahmad, M., 2002. DPOAE level shifts and ABR threshold shifts compared to detailed analysis of histopathological damage from noise. *Hear. Res.* 174, 158–171.
- Horner, P.J., Thallmair, M., Gage, F.H., 2002. Defining the NG2-expressing cell of the adult CNS. *J. Neurocytol.* 31, 469–480.
- Izumikawa, M., Minoda, R., Kawamoto, K., Abrashkin, K.A., Swiderski, D.L., Dolan, D.F., Brough, D.E., Raphael, Y., 2005. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat. Med.* 11, 271–276.
- Kelley, M.W., Talreja, D.R., 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.
- Kujawa, S.G., Liberman, M.C., 2006. Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth. *J. Neurosci.* 26, 2115–2123.
- Lambert, P.R., 1994. Inner ear hair cell regeneration in a mammal: identification of a triggering factor. *Laryngoscope* 104, 701–718.

- Liberman, M.C., Kiang, N.Y., 1978. Acoustic trauma in cats. Cochlear pathology and auditory-nerve activity. *Acta Otolaryngol. (Suppl 358)*, 1–63.
- Li, H., Liu, H., Heller, S., 2003. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat. Med.* 9, 1293–1299.
- Li, H., Corrales, C.E., Edge, A., Heller, S., 2004. Stem cells as therapy for hearing loss. *Trends Mol. Med.* 10, 309–315.
- Lopez, I.A., Zhao, P.M., Yamaguchi, M., de Vellis, J., Espinosa-Jeffrey, A., 2004. Stem/progenitor cells in the postnatal inner ear of the GFP-*nestin* transgenic mouse. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 205–213.
- Martinez-Monedero, R., Corrales, C.E., Cuajungco, M.P., Heller, S., Edge, A.S., 2006. Reinnervation of hair cells by auditory neurons after selective removal of spiral ganglion neurons. *J. Neurobiol.* 66, 319–331.
- McMahan, U.J., 1990. The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55, 407–418.
- Montcouquiol, M., Corwin, J.T., 2001. Brief treatments with forskolin enhance s-phase entry in balance epithelia from the ears of rats. *J. Neurosci.* 21, 974–982.
- Nadol Jr., J.B., 1997. Patterns of neural degeneration in the human cochlea and auditory nerve: implications for cochlear implantation. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 117, 220–228.
- Oshima, K., Grimm, C., Corrales, C.E., Senn, P., Martinez-Monedero, R., Geleoc, G.S.G., Edge, A., Holt, J.R., 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.
- Pasterkamp, R.J., De Winter, F., Holtmaat, A.J., Verhaagen, J., 1998. Evidence for a role of the chemorepellent semaphorin III and its receptor neuropilin-1 in the regeneration of primary olfactory axons. *J. Neurosci.* 18, 9962–9976.
- Puel, J.L., d'Aldin, C., Ruel, J., Ladrech, S., Pujol, R., 1997. Synaptic repair mechanisms responsible for functional recovery in various cochlear pathologies. *Acta Otolaryngol.* 117, 214–218.
- Rask-Andersen, H., Bostrom, M., Gerdin, B., Kinnefors, A., Nyberg, G., Engstrand, T., Miller, J.M., 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, 180–191.
- Reynolds, B.A., Weiss, S., 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Rubart, M., Field, L.J., 2006. Cardiac regeneration: repopulating the heart. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 29–49.
- Ryals, B.M., Rubel, E.W., 1988. Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail. *Science* 240, 1774–1776.
- Sekiya, T., Shimamura, N., Yagihashi, A., Suzuki, S., 2003. Effect of topically applied basic fibroblast growth factor on injured cochlear nerve. *Neurosurgery* 52, 900–907, discussion 907..
- Starr, A., Picton, T.W., Sininger, Y., Hood, L.J., Berlin, C.I., 1996. Auditory neuropathy. *Brain* 119 (Pt 3), 741–753.
- Sugawara, M., Corfas, G., Liberman, M.C., 2005. Influence of supporting cells on neuronal degeneration after hair cell loss. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 6, 136–147.
- Urbanek, K., Torella, D., Sheikh, F., De Angelis, A., Nurzynska, D., Silvestri, F., Beltrami, C.A., Bussani, R., Beltrami, A.P., Quaini, F., Bolli, R., Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P., 2005. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8692–8697.
- Varga, R., Kelley, P.M., Keats, B.J., Starr, A., Leal, S.M., Cohn, E., Kimberling, W.J., 2003. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. *J. Med. Genet.* 40, 45–50.
- Warchol, M.E., Lambert, P.R., Goldstein, B.J., Forge, A., Corwin, J.T., 1993. Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans. *Science* 259, 1619–1622.
- Weissman, I.L., 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157–168.
- White, P.M., Doetzlhofer, A., Lee, Y.S., Groves, A.K., Segil, N., 2006. Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. *Nature* 441, 984–987.
- Zheng, J.L., Gao, W.Q., 2000. Overexpression of *Math1* induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nat. Neurosci.* 3, 580–586.
- Zimmermann, C.E., Burgess, B.J., Nadol Jr., J.B., 1995. Patterns of degeneration in the human cochlear nerve. *Hear. Res.* 90, 192–201.

Stem cells for the replacement of inner ear neurons and hair cells

RODRIGO MARTINEZ-MONEDERO^{1,2} and ALBERT S.B. EDGE^{*,1,2,3}

¹Department of Otolaryngology, Harvard Medical School, Boston, MA ²Tillotson Unit for Cell Biology, Eaton-Peabody Laboratory, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA and ³Program in Speech and Hearing Bioscience and Technology, Division of Health Science and Technology, Harvard & MIT, Cambridge, MA, USA

ABSTRACT Stem cells in the nervous system have some capacity to restore damaged tissue. Proliferation of stem cells endows them with self-renewal ability and accounts for *in vitro* formation of neurospheres, clonally derived colonies of floating cells. However, damage to the nervous system is not readily repaired, suggesting that the stem cells do not provide an easily recruited source of cells for regeneration. The vestibular and auditory organs, despite their limited ability to replace damaged cells, appear to contain cells with stem cell properties. These inner ear stem cells, identified by neurosphere formation and by their expression of markers of inner ear progenitors, can differentiate to hair cells and neurons. Differentiated cells obtained from inner ear stem cells expressed sensory neuron markers and, after co-culture with the organ of Corti, grew processes that extended to hair cells. The neurons expressed synaptic vesicle markers at points of contact with hair cells. Exogenous stem cells have also been used for hair cell and neuron replacement. Embryonic stem cells are one potential source of both hair cells and sensory neurons. Neural progenitors made from embryonic stem cells, transplanted into the inner ear of gerbils that had been de-afferented by treatment with a toxin, differentiated into cells that expressed neuronal markers and grew processes both peripherally into the organ of Corti and centrally. The regrowth of these neurons suggests that it may be possible to replace auditory neurons that have degenerated with neurons that restore auditory function by regenerating connections to hair cells.

KEY WORDS: *cell therapy, hearing, guidance, regeneration*

Endogenous stem cells provide regenerative capacity to adult tissues by their ability to continually self-renew and differentiate and these properties allow them to replace cells lost through normal turnover or after tissue damage. A number of studies have demonstrated the occurrence of stem cells in the central nervous system (Doetsch *et al.*, 1999, Gage, 2000, Kondo and Raff, 2000, Lie *et al.*, 2004, Pevny and Rao, 2003, Rietze *et al.*, 2001, Temple, 2001), and, although there is little constitutive turnover, stem cells can be recruited to replace lost neurons (Bauer *et al.*, 2003, Kempermann *et al.*, 2004, Otori *et al.*, 2006). Neural stem cells are present in the subventricular zone of the lateral ventricles and in the dentate gyrus (Taupin and Gage, 2002, Watts *et al.*, 2005) and have also been demonstrated in the peripheral nervous system (Dromard *et al.*, 2007, Hjerling-Leffler *et al.*, 2005). Progenitors for peripheral neurons arise from the neural crest (Crane and Trainor, 2006, Greenwood *et al.*, 1999, Tomita *et al.*, 2005) and derivatives of the

neural crest that can give rise to autonomic and sensory neurons persist in adult tissues. The existence of stem cells in the peripheral and central nervous systems has been demonstrated by *in vivo* studies using genetic tracers to reveal the origin of differentiated cells and by *in vitro* criteria, such as the expression of markers of stem cells and the capacity to form neurospheres (Reynolds and Weiss, 1992). However, the capacity for regeneration by stem cells in the nervous system is limited, and, therefore, little recovery is seen after damage in the CNS. Even at sites where stem cells that undergo cell division *in vitro* have been identified, regeneration is modest (Kempermann *et al.*, 2004, Taupin and Gage, 2002).

Our aim in this review is to cover the evidence for hair cell and neuronal regeneration in the inner ear both from endogenous stem cells and by transplantation of exogenous stem cells. These are covered in two sections. In the section on endogenous stem cells, we confine our discussion to the generation

*Address correspondence to: Albert Edge, Eaton-Peabody Laboratory, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 243 Charles Street, Boston, MA 02114, USA. Fax: +1-617-720-4408. e-mail: albert_edge@meei.harvard.edu

of cells from progenitors and do not include regeneration by division of preexisting hair cells (Sage *et al.*, 2005) or by differentiation of other mature, defined cochlear cells to hair cells (Izumikawa *et al.*, 2005, White *et al.*, 2006). It is possible that these two routes to generation of hair cells – from stem cell progenitors and from other cell types – will turn out to be very similar processes when more has been learned about the identity of the progenitor cells. In the second section on cell transplantation, we look at recent evidence for cell replacement in the cochlea.

Repair of lesioned peripheral nerves can also be accomplished by the regeneration of motor and sensory neuronal processes (Brushart, 1993, Mi *et al.*, 2007). Interactions with extracellular factors from glial cells as well the targets of the growing axon have been shown to have an influence on the regrowth of these processes and formation of new synapses (Fraher, 2000, Harel and Strittmatter, 2006, Hata *et al.*, 2006, Pasterkamp and Verhaagen, 2006).

Formation of inner ear cells from endogenous stem cells

The formation of spheres from individual cells dissociated from the utricular epithelium was used to demonstrate that stem cells were present in the inner ear (Li *et al.*, 2003a). The spheres were clonal (Li *et al.*, 2003a) and differentiated into cell

types corresponding to all three germ layers, endoderm, mesoderm and ectoderm (Li *et al.*, 2003a), indicating that the stem cells were pluripotent (Fig. 1). We generated spheres from cochlear sensory epithelia and spiral ganglia of mice (Oshima *et al.*, 2007). The stem cells in spheres proliferated, as required for self-renewal and they had the capacity to differentiate into neurons and hair cells (Martinez-Monedero *et al.*, 2007, Oshima *et al.*, 2007). The demonstration that inner ear progenitor cells could differentiate into hair cells and neurons *in vitro* raised the possibility that they could be induced to differentiate *in vivo* as the basis for future therapies to replace cells in the inner ear.

The sphere-forming capacity of both cochlear and vestibular organs diminished after the early postnatal period (Oshima *et al.*, 2007), consistent with the idea that the number of stem cells decreased after birth or that they lost their capacity to proliferate. In the vestibular organs, cells that retained the capacity to divide and differentiate into more specialized cells persisted longer than in the cochlea.

A postnatal loss of stem cells has been observed in adult eyes with a similar time frame as the inner ear. Retinal stem cells that give rise to retinal ganglion cells are found postnatally but diminish in number during early postnatal life in the rodent (Reh and Fischer, 2006). In contrast, others have demonstrated the presence of neural progenitor cells in the adult human auditory nerve, with the expression of nestin-positive neural progenitors that divided and expressed markers found in inner ear sensory neurons like TrkB and TrkC (Rask-Andersen *et al.*, 2005). It is possible that some stem cells are left as an animal matures, but that they proliferate less rapidly in the adult.

Despite the pluripotent differentiation potential of these cells, however, recovery doesn't occur to any significant extent after damage to hair cells or neurons in the mammalian cochlea. This is in contrast to adult vestibular organs where some cells with the capacity to divide and differentiate into hair cells are retained (Forge *et al.*, 1993, Warchol *et al.*, 1993). Regeneration of cochlear neurons is not observed after degeneration (Carnicero *et al.*, 2002, Sekiya *et al.*, 2003) and damage to neurons therefore leads to permanent deafness. Even if the cell bodies and central axons survive, loss of hearing can still result from degeneration of peripheral processes (Nadol, 1997). Primary cochlear neuronal degeneration has been described in a variety of pathologies (Starr *et al.*, 1996, Varga *et al.*, 2003) and can occur due to insults to the cochlea, such as exposure to sound pressure levels that do not cause hair cell loss (Kujawa and Liberman, 2006).

Secondary degeneration commonly follows sen-

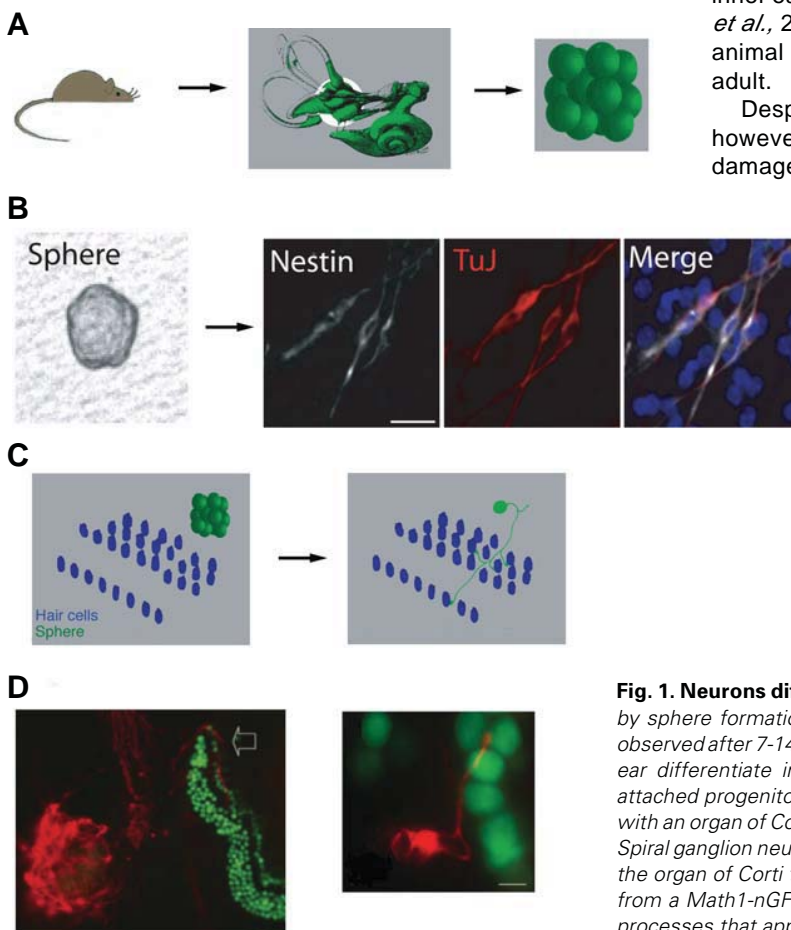


Fig. 1. Neurons differentiated from inner ear stem cells. (A) Stem cells isolated by sphere formation from the vestibular organs of a mouse. Clonal spheres are observed after 7–14 days in nonadherent culture. (B) Spheres derived from the inner ear differentiate into nestin and β -III tubulin-positive neurons upon culture as attached progenitor cells in a dish. (C) Schematic of an inner ear sphere in culture with an organ of Corti showing growth of neural processes to contact hair cells. (D) Spiral ganglion neurons (stained for β -III tubulin) placed in culture with an explant of the organ of Corti that had been denervated with β -bungarotoxin (green hair cells from a *Math1-nGFP* mouse). The neurons isolated from a newborn mouse grow processes that appear to be attracted by and form contacts with hair cells.

sory epithelial degeneration and neuronal cell death occurs due to a lack of trophic support (Fritzsche *et al.*, 1997). Disruption of function studies in mice have shown that survival of spiral ganglion neurons is dependent on a number of genes such as the neurotrophins (Ernfors *et al.*, 1995, Hossain *et al.*, 2002), components of the erbB pathway (Stankovic *et al.*, 2004) and cAMP-dependent protein kinase (Bok *et al.*, 2003). Protection of auditory neurons by a variety of interventions has been demonstrated and neurotrophins have been shown to augment neuronal survival in the ear (Miller *et al.*, 1997, Wise *et al.*, 2005).

Although the neurons do not regenerate once they are lost, spiral ganglion neurons have been shown to regrow fibers to varying extents after damage in different animal models. Several studies suggested that the endings reconnected to hair cells (Puel *et al.*, 1997, Sekiya *et al.*, 2003) and that these new connections were functional (Puel *et al.*, 1997). Experimental sectioning of the auditory nerve in mice led to extensive regrowth of fibers into the cochlea (Sugawara *et al.*, 2005). However, in humans, the extent of regrowth does not appear to be clinically significant (Nadol, 1997). Regrowth of these processes may be increased by NT-3 and BDNF, which were reported to increase peripheral connections in guinea pigs, even when administered 33 days after kanamycin treatment to damage neurons and hair cells (Wise *et al.*, 2005).

The existence of endogenous stem cells in the mammalian cochlea opens the door to new approaches to repair of a damaged cochlea by cell proliferation and differentiation. A potential new approach could be envisaged if the pluripotency of these progenitor cells could be harnessed. Stem cells or cells with stem cell-like properties might be directed toward a hair cell phenotype or a neuronal phenotype to replace degenerated neurons and hair cells and restore function to the inner ear.

Characterization of the differentiation capacity of inner ear stem cells revealed that proliferating cells that were positive for BrdU staining expressed neural stem cell markers, *Musashi* and *nestin* and embryonic stem cell markers (Ivanova *et al.*, 2006), *Sox2*, *Tbx3* and *Tcl1* (Martinez-Monedero *et al.*, 2007). These cells could be obtained from cochlear and vestibular organs and gave rise to hair cells, based on marker identification and on electrophysiology that demonstrated the current-voltage relationships of an E16 utricular hair cell (Oshima *et al.*, 2007). The presence of inner ear cells that could give rise to hair cells has been demonstrated from neonatal mouse and rat cochlea (Doetzlhofer *et al.*, 2004, Malgrange *et al.*, 2002, White *et al.*, 2006, Yerukhimovich *et al.*, 2007, Zhai *et al.*, 2005) and supporting cells can act as progenitors of hair cells *in vitro* during this early postnatal period (Doetzlhofer *et al.*, 2004, Malgrange *et al.*, 2002, White *et al.*, 2006). Inner ear hair cells produced from a cochlear cell line showed a response to mechanical vibrations (Liu *et al.*, 2006).

These progenitors had the capacity to give rise to a broad array of neuronal types. Thus, the stem cells could be converted to dopamine neurons, cholinergic neurons and serotonergic neurons (Martinez-Monedero *et al.*, 2007). However, the largest number of inner ear stem cell-derived neurons were glutamatergic and had glutamate receptors. These neurons expressed markers of sensory neurons, both immature (*Brn3a*, *Ngn1* and *NeuroD*) and mature (*TrkB*, *TrkC* and

peripherin) and markers of developing auditory neurons like *GATA3*. They also expressed genes associated with the embryonic inner ear like *Pax2* and *islet1*. Differentiation of these cells as functional neurons was further confirmed by electrophysiological activity (Martinez-Monedero *et al.*, 2007).

Immortalized cochlear cell lines have also been shown to differentiate to cells with many of the characteristics of auditory neurons (Nicholl *et al.*, 2005). These cells may recapitulate the early developmental steps in spiral ganglion formation and can be expanded indefinitely, making them potentially useful for cell transplantation experiments in the inner ear.

The neurons derived by differentiation of inner ear stem cells grow processes that contacted hair cells in an explant of the organ of Corti that had been denervated by β -bungarotoxin (Martinez-Monedero *et al.*, 2007). This was similar to what had been observed previously in this *in vitro* model system using newborn spiral ganglion neurons (Martinez-Monedero *et al.*, 2006) (Fig. 1). Neurons had not been previously shown to regenerate synapses with hair cells, but we found that neurons from spiral ganglia of newborn mice contacted hair cells and expressed synapsin and SV2 at the sites of contact. The formation of new afferent connections is the key step in regeneration of a sensory organ and these new contacts suggested that primary afferent neurons might reform these connections. The new neurons appeared to have some properties of presynaptic neurons during synaptogenesis: the expression of synaptic markers was localized to the neuronal side at the actual contact with the hair cell (Martinez-Monedero *et al.*, 2006). The processes of spiral ganglion neurons that extend to hair cells during development stain for synapsin and synaptophysin (Scarfone *et al.*, 1991) and it is possible that the identity of this peripheral process as a dendrite is only acquired after it forms a connection to the hair cell. Neurite outgrowth has been shown to occur before the identity of axons and dendrites is specified. A single process can then take on an axonal identity and express axonal markers (Jiang *et al.*, 2005, Schwamborn and Puschel, 2004). After making the first contact, hair cell signaling may provide the key to further development of the neuron. The influence of the synaptic contact on further differentiation of the neuron as well as the electrophysiology of the synapses formed by these new processes remain to be studied.

The formation of connections requires that neurons be able to find their targets. The pathfinding ability of the neurons may depend on the recognition of guidance signals by growing axons so that the neural process can respond to cues from hair cells, or these cues could be from glial and other nonneuronal cells that prevent growth to incorrect targets by expression of repulsive guidance cues (Dickson, 2002). Since targeted growth is observed in this system, the importance of a guidance molecule can be determined by the effect of gain or loss-of-function of the candidate gene.

Neuronal replacement will become increasingly important if attempts to regenerate hair cells are successful. Extensions from spiral ganglion neurons have been reported to re-form connections with hair cells that were generated from supporting cells after overexpression of *Math1* using an adenovirus (Kawamoto *et al.*, 2003), suggesting that neural processes may be attracted by the new cells. Excitation of hair cells that had been generated from an otocyst-derived cell line *in vitro* caused

a response in cocultured neurons, indicating regrowth of functional connections to hair cells (Liu *et al.*, 2006).

Regeneration of auditory neurons and hair cells from exogenous stem cells

Attempts to make both auditory neurons and hair cells from mouse ES cells have been reported. Hair cells were obtained from mouse ES cells by addition of EGF, bFGF and IGF-1 (Li *et al.*, 2003b). These cells expressed markers of developing and mature hair cells, *Math1*, *Brn3c* and *myosin VIIa* and had stereociliary bundles that labeled for *espin* and *F-actin*. Sensory neurons or neurons with characteristics of auditory neurons have also been produced from ES cells (Coleman *et al.*, 2007, Corrales *et al.*, 2006). Human ES cells could be converted to progenitors that had the same markers as embryonic precursors of sensory neurons in the neural crest and sensory placodes, and these cells could be differentiated to neurons that had many of the characteristic markers of sensory neurons (Shi *et al.*, 2007).

Hair cells have also been generated by application of growth factors to mesenchymal stem cells from bone marrow, followed by co-culture with the otocyst from chick (Jeon *et al.*, 2007). Expression of *Math1* in the progenitor cells obtained from mesenchymal stem cells resulted in their conversion to hair cells (Jeon *et al.*, 2007). In addition, recent reports have used other adult stem cells as a source of hair cells. Expression of hair cell markers was reported after co-culture of olfactory progenitors with supernatants from cochlear cultures (Doyle *et al.*, 2007).

Bone marrow stem cells have been used to generate neurons with many of the characteristics of auditory afferent neurons (Kondo *et al.*, 2005). The neurons expressed transcription factors of sensory neurons, *GATA3* and *Sox10*, as well as AMPA receptors after treatment with retinoic acid and sonic hedgehog. The sensory neuron marker, *Brn3a*, was detected only after the neurons were cultured with a conditioned medium from E10 hindbrain/somite/otocyst, and these neurons extended processes in the direction of hair cells.

Exogenous stem cells have been used in attempts to replace degenerated auditory nerve. We found that progenitor cells derived from exogenous stem cells were effective in replacing the spiral ganglion neurons in an animal model of primary neuronal degeneration (Fig. 2) and that these neurons grew fibers into the organ of Corti where they appeared to contact hair cells (Corrales *et al.*, 2006). The cell bodies of the engrafted neurons were within the track normally occupied by spiral ganglion axons and extended their processes both centrally and peripherally. The peripheral fibers grew in an apical direction in the nerve trunk and in fasciculating bundles of neurites that left the cochlear axis in a radial direction to Rosenthal's canal and through the osseous spiral lamina into the organ of Corti. The fibers thus grew peripherally from an ectopic location (the cochlear nerve trunk) to the site of the original cell bodies and from there to the hair cells and central fibers grew into the brainstem (Shi *et al.*, 2007). Whether these neurons could restore function was not established.

Neurites from dorsal root ganglion cells transplanted into rats did not grow toward sensory cells (Hu *et al.*, 2005a) and no

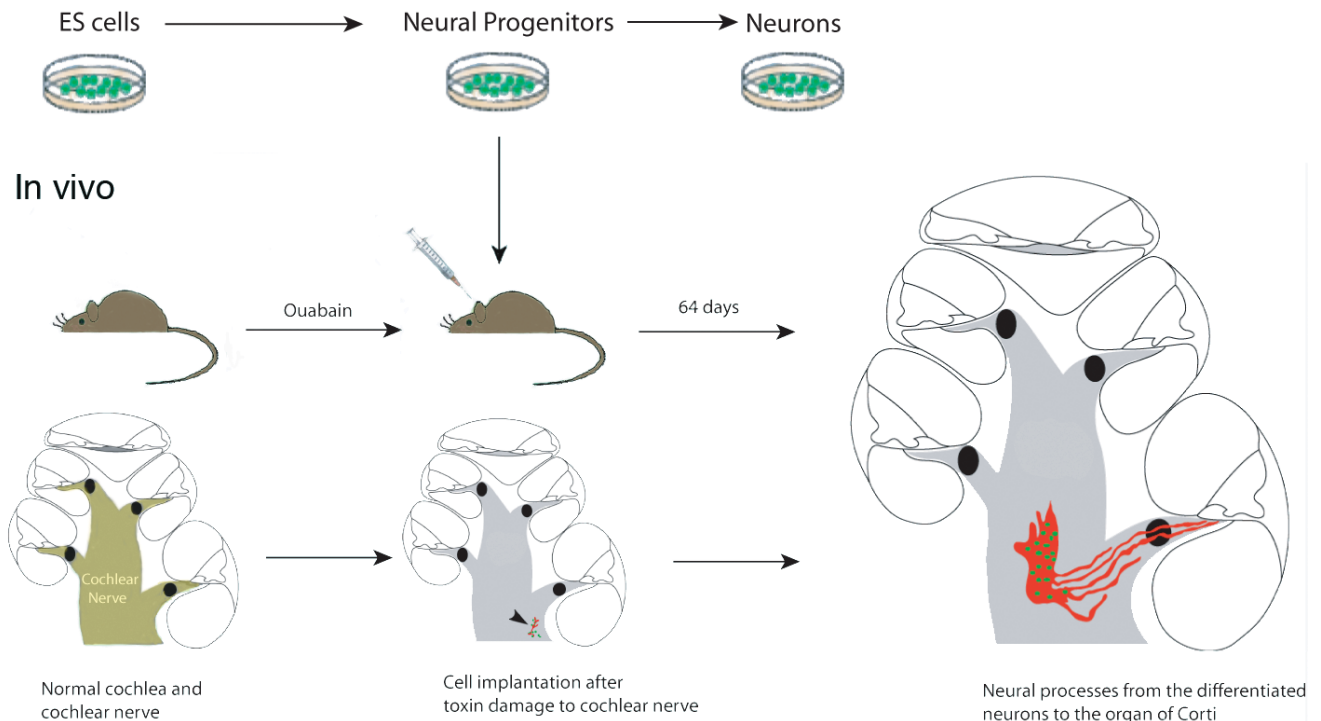


Fig. 2. Transplantation of neural progenitors derived from ES cells into the cochlea. When stem cell derived neural progenitors are injected into an ear that has had its auditory nerve removed by a toxin, the cells form a graft at the base of the cochlea and differentiate into neurons. The engrafted cells can be identified by endogenous EYFP and processes extending from these cells can be followed both apically within the modiolus of the cochlea and radially to the organ of Corti. They can be labeled for neuronal markers by immunofluorescence. The black circles indicate the location of Rosenthal's canal where the cell bodies of the afferent neurons are located in the normal animal.

evidence was presented of neurite outgrowth toward hair cells from neural stem cells transplanted into the inner ear of guinea pigs (Hu *et al.*, 2005b). However, the neurons of the host animal were not removed and the cells were placed in the scala tympani, which makes it difficult to assess whether central and peripheral processes of the spiral ganglia could be regenerated. Neural stem cells have been used for transplantation into the cochlea of a mouse that had been treated with cisplatin to remove endogenous neurons and the cells were present in the cochlea two weeks after grafting (Tamura *et al.*, 2004). ES cell-derived neural progenitors made contacts with vestibular hair cells (Kim *et al.*, 2005) and ES cell transplantation into guinea pig cochlea resulted in growth of processes, although the processes did not appear to grow toward the organ of Corti (Okano *et al.*, 2005). ES cells transplanted into the cochlear modiolus of animals with damaged spiral ganglion neurons grew fibers along the remaining neurons and to the organ of Corti (Sekiya *et al.*, 2006).

The task of replacing hair cells with transplanted cells has been difficult to achieve. There has been little information on integration or function of stem cells transplanted into sensory epithelia, despite some reports of cells recovered in the organ of Corti, but there have been advances in ways to obtain hair cells from stem cells that should lead to progress by improving their availability (Jeon *et al.*, 2007, Minoda *et al.*, 2004, Tateya *et al.*, 2003).

Possible approaches to future regeneration of neurons and hair cells

How can the regrowth of neurons to their targets in the cochlea and brainstem be improved? One key to regrowth may lie in overcoming inhibition imposed by factors in the extracellular space of the cochlea. In neuronal regeneration in the eye, olfactory system and spinal cord, inhibitors of axonal growth have been shown to prevent regenerating neurons from extending processes to their targets (Fraher, 2000, Pasterkamp and Verhaagen, 2006, Shirvan *et al.*, 2002). Blocking the inhibitory molecules has been partially successful in achieving regrowth of these axons. For example, an inhibitor of semaphorin 3a that overcame its repulsive effect increased axonal growth in injured spinal cord (Kaneko *et al.*, 2006), a semaphorin 3a antibody increased optic nerve regeneration (Shirvan *et al.*, 2002) and siRNAs that blocked signaling by semaphorin 3a prevented axonal growth cone collapse (Hengst *et al.*, 2006). An antibody to Nogo or a dominant-negative form of the Nogo receptor also had an effect on the regeneration of spinal cord neurons (Liebscher *et al.*, 2005) and visual system neurons (Fischer *et al.*, 2004). An antibody to RGMA led to corticospinal neuron regeneration in injured spinal cord (Hata *et al.*, 2006).

Many factors that block regrowth have a guidance function during development that prevents incorrect routing of embryonic axons. In the olfactory system, semaphorin 3a has this function and its expression in glial scars prevents axon regeneration (Pasterkamp *et al.*, 1998, Pasterkamp and Verhaagen, 2006, Schwarting *et al.*, 2004). Determination of which guidance molecules are expressed in the adult mouse inner ear would make it possible to test the effect on axonal regeneration of overcoming this inhibition.

Because endogenous stem cells of the cochlea and vestibular system can be differentiated into sensory neurons and these

neurons can make new connections to hair cells, it is possible to envisage these endogenous stem cells as precursors *in vivo* for spiral ganglion neuron replacement. The synapses formed must be further characterized by recording the activity of hair cells and neurons at newly formed synapses. If the cells can be induced to differentiate into sensory neurons as they have been *in vitro*, they could repair damaged tissue. It might be possible to manipulate these cells with drugs or gene therapy so that they become responsive to signals from degenerating cells and enter the cell cycle.

Activation of endogenous stem cells could prove to be the most promising avenue for replacement of hair cells. Several recent studies show that gene silencing or overexpression can result in hair cell formation *in vivo*. Manipulations of developmental pathways that lead to extra hair cell formation in mouse models (Chen and Segil, 1999; Izumikawa *et al.*, 2005; Sage *et al.*, 2005) suggest options for hair cell differentiation that can be studied using inner ear stem cells. Genetic manipulation and drug therapy are both possible routes to activation of selected cells leading to hair cell regeneration.

Cell transplantation appears to hold great promise but there are critical issues that must be addressed: the choice of cell type, the timing of infusion relative to the damage and the stage of differentiation of the transplanted cells at the time of infusion. The stage at which hair cell progenitors are transplanted could have a major effect on their ability to interact with the proper cells in the sensory epithelium so that they can regenerate the correct cell-cell contacts. For neuronal regrowth, placement of cells to avoid scar and allow the neurons to grow to peripheral and central targets can be a problem, particularly for cells that are placed peripherally and need to grow centrally through the Schwann-glia border (Fraher, 2000, Pasterkamp *et al.*, 1998). The neural regeneration results suggest that neurons may be able to remake connections to hair cells, and it may, therefore, be possible to restore function if neuronal regeneration is combined with therapies to replace hair cells.

Acknowledgements

Supported by grants RO1 DC007174 and P30 DC05209 from the National Institute on Deafness and other Communicative Disorders (NIDCD). RMM was sponsored by the Programa nacional para la movilidad de profesores de Universidad e investigadores, Secretaria de Estado de Educacion y Universidades, Spain and by the National Organization of Hearing Research (NOHR).

References

- BAUER, S., RASIKA, S., HAN, J., MAUDUIT, C., RACCURT, M., MOREL, G., JOURDAN, F., BENAHMED, M., MOYSE, E. and PATTERSON, P.H. (2003). Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium. *J Neurosci* 23: 1792-803.
- BOK, J., ZHA, X.M., CHO, Y.S. and GREEN, S.H. (2003). An extranuclear locus of cAMP-dependent protein kinase action is necessary and sufficient for promotion of spiral ganglion neuronal survival by cAMP. *J Neurosci* 23: 777-87.
- BRUSHART, T.M. (1993). Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *J Neurosci* 13: 2730-8.
- CARNICERO, E., KNIPPER, M., TAN, J., ALONSO, M.T. and SCHIMMANG, T. (2002). Herpes simplex virus type 1-mediated transfer of neurotrophin-3 stimulates survival of chicken auditory sensory neurons. *Neurosci Lett* 321: 149-52.
- CHEN, P. and SEGIL, N. (1999). p27Kip1 links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development* 126: 1581-1590.

- 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: 232-43.
- 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: 1489-500.
- CRANE, J.F. and TRAINOR, P.A. (2006). Neural crest stem and progenitor cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 267-86.
- DICKSON, B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298: 1959-64.
- DOETSCH, F., CAILLE, I., LIM, D.A., GARCIA-VERDUGO, J.M. and ALVAREZ-BUYLLA, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97: 703-16.
- DOETZLHOFER, A., WHITE, P.M., JOHNSON, J.E., SEGIL, N. and 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: 432-47.
- 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: 621-7.
- DROMARD, C., BARTOLAMI, S., DELEYROLLE, L., TAKEBAYASHI, H., RIPOLL, C., SIMONNEAU, L., PROMÉ, S., PUECH, S., TRAN, V.B., DUPERRAY, C. *et al.* (2007). NG2 and Olig2 expression provides evidence for phenotypic deregulation of cultured central nervous system and peripheral nervous system neural precursor cells. *Stem Cells* 25: 340-53.
- ERNFORS, P., VAN DE WATER, T., LORING, J. and JAENISCH, R. (1995). Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron* 14: 1153-64.
- FISCHER, D., HE, Z. and BENEWITZ, L.I. (2004). Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J Neurosci* 24: 1646-51.
- FORGE, A., LI, L., CORWIN, J.T. and NEVILL, G. (1993). Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science* 259: 1616-9.
- FRAHER, J.P. (2000). The transitional zone and CNS regeneration. *J Anat* 196 (Pt 1): 137-58.
- FRITZSCH, B., FARINAS, I. and REICHARDT, L.F. (1997). Lack of neurotrophin 3 causes losses of both classes of spiral ganglion neurons in the cochlea in a region-specific fashion. *J Neurosci* 17: 6213-25.
- GAGE, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433-8.
- GREENWOOD, A.L., TURNER, E.E. and ANDERSON, D.J. (1999). Identification of dividing, determined sensory neuron precursors in the mammalian neural crest. *Development* 126: 3545-59.
- HAREL, N.Y. and STRITTMATTER, S.M. (2006). Can regenerating axons recapitulate developmental guidance during recovery from spinal cord injury? *Nat Rev Neurosci* 7: 603-16.
- HATA, K., FUJITANI, M., YASUDA, Y., DOYA, H., SAITO, T., YAMAGISHI, S., MUELLER, B.K. and YAMASHITA, T. (2006). RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury. *J Cell Biol* 173: 47-58.
- HENGST, U., COX, L.J., MACOSKO, E.Z. and JAFFREY, S.R. (2006). Functional and selective RNA interference in developing axons and growth cones. *J Neurosci* 26: 5727-32.
- HJERLING-LEFFLER, J., MARMIGERE, F., HEGLIND, M., CEDERBERG, A., KOLTZENBURG, M., ENERBACK, S. and ERNFORS, P. (2005). The boundary cap: a source of neural crest stem cells that generate multiple sensory neuron subtypes. *Development* 132: 2623-32.
- HOSSAIN, W.A., BRUMWELL, C.L. and 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: 138-51.
- HU, Z., ULFENDAHL, M. and OLIVIVUS, N.P. (2005a). NGF stimulates extensive neurite outgrowth from implanted dorsal root ganglion neurons following transplantation into the adult rat inner ear. *Neurobiol Dis* 18: 184-92.
- HU, Z., WEI, D., JOHANSSON, C.B., HOLMSTROM, N., DUAN, M., FRISEN, J. and ULFENDAHL, M. (2005b). Survival and neural differentiation of adult neural stem cells transplanted into the mature inner ear. *Exp Cell Res* 302: 40-7.
- IVANOVA, N., DOBRIN, R., LU, R., KOTENKO, I., LEVORSE, J., DECOSTE, C., SCHAFER, X., LUN, Y. and LEMISCHKA, I.R. (2006). Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442: 533-8.
- 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: 271-6.
- 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, H., GUO, W., LIANG, X. and RAO, Y. (2005). Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. *Cell* 120: 123-35.
- KANEKO, S., IWANAMI, A., NAKAMURA, M., KISHINO, A., KIKUCHI, K., SHIBATA, S., OKANO, H.J., IKEGAMI, T., MORIYA, A., KONISHI, O. *et al.* (2006). A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* 12: 1380-9.
- 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: 4395-400.
- KEMPERMANN, G., WISKOTT, L. and GAGE, F.H. (2004). Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 14: 186-91.
- KIM, T.S., NAKAGAWA, T., KITA, T., HIGASHI, T., TAKEBAYASHI, S., MATSUMOTO, M., KOJIMA, K., SAKAMOTO, T. and ITO, J. (2005). Neural connections between embryonic stem cell-derived neurons and vestibular hair cells in vitro. *Brain Res* 1057: 127-33.
- 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: 4789-94.
- KONDO, T. and RAFF, M. (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289: 1754-7.
- KUJAWA, S.G. and LIBERMAN, M.C. (2006). Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth. *J Neurosci* 26: 2115-23.
- LI, H., LIU, H. and HELLER, S. (2003a). Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 9: 1293-9.
- 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: 13495-500.
- LIE, D.C., SONG, H., COLAMARINO, S.A., MING, G.L. and GAGE, F.H. (2004). Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 399-421.
- LIEBSCHER, T., SCHNELL, L., SCHNELL, D., SCHOLL, J., SCHNEIDER, R., GULLO, M., FOUAD, K., MIR, A., RAUSCH, M., KINDLER, D. *et al.* (2005). Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. *Ann Neurol* 58: 706-19.
- LIU, J.J., SHIN, J.H., HYRC, K.L., LIU, S., LEI, D., HOLLEY, M.C. and BAO, J. (2006). Stem cell therapy for hearing loss: Math1 overexpression in VOT-E36 cells. *Otol Neurotol* 27: 414-21.
- MALGRANGE, B., THIRY, M., VAN DE WATER, T.R., NGUYEN, L., MOONEN, G. and 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: 1744-57.
- 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: 319-31.
- MARTINEZ-MONEDERO, R., YI, E., GLOWATZKI, E. and EDGE, A.S.B. (2007). Neurons derived from inner ear stem cells form synapses with de-afferented hair cells. *Association for Research in Otolaryngology Annual Meeting*.
- MI, R., CHEN, W. and HOKE, A. (2007). From the Cover: Pleiotrophin is a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 4664-9.
- MILLER, J.M., CHI, D.H., O'KEEFE, L.J., KRUSZKA, P., RAPHAEL, Y. and

- ALTSCHULER, R.A. (1997). Neurotrophins can enhance spiral ganglion cell survival after inner hair cell loss. *Int J Dev Neurosci* 15: 631-43.
- MINODA, R., IZUMIKAWA, M., KAWAMOTO, K. and RAPHAEL, Y. (2004). Strategies for replacing lost cochlear hair cells. *Neuroreport* 15: 1089-92.
- NADOL, J.B., JR. (1997). Patterns of neural degeneration in the human cochlea and auditory nerve: implications for cochlear implantation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 117: 220-8.
- 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: 343-53.
- OHORI, Y., YAMAMOTO, S., NAGAO, M., SUGIMORI, M., YAMAMOTO, N., NAKAMURA, K. and NAKAFUKU, M. (2006). Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord. *J Neurosci* 26: 11948-60.
- OKANO, T., NAKAGAWA, T., ENDO, T., KIM, T.S., KITA, T., TAMURA, T., MATSUMOTO, M., OHNO, T., SAKAMOTO, T., IGUCHI, F. *et al.* (2005). Engraftment of embryonic stem cell-derived neurons into the cochlear modiolus. *Neuroreport* 16: 1919-22.
- 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.
- PASTERKAMP, R.J., DE WINTER, F., HOLTMAAT, A.J. and VERHAAGEN, J. (1998). Evidence for a role of the chemorepellent semaphorin III and its receptor neuropilin-1 in the regeneration of primary olfactory axons. *J Neurosci* 18: 9962-76.
- PASTERKAMP, R.J. and VERHAAGEN, J. (2006). Semaphorins in axon regeneration: developmental guidance molecules gone wrong? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1499-511.
- PEVNY, L. and RAO, M.S. (2003). The stem-cell menagerie. *Trends Neurosci* 26: 351-9.
- PUEL, J.L., D'ALDIN, C., RUEL, J., LADRECH, S. and PUJOL, R. (1997). Synaptic repair mechanisms responsible for functional recovery in various cochlear pathologies. *Acta Otolaryngol* 117: 214-8.
- 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: 180-91.
- REH, T.A. and FISCHER, A.J. (2006). Retinal stem cells. *Methods Enzymol* 419: 52-73.
- REYNOLDS, B.A. and WEISS, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-10.
- RIETZE, R.L., VALCANIS, H., BROOKER, G.F., THOMAS, T., VOSS, A.K. and BARTLETT, P.F. (2001). Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 412: 736-9.
- 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. *et al.* (2005). Proliferation of functional hair cells in vivo in the absence of the retinoblastoma protein. *Science* 307: 1114-8.
- SCARFONE, E., DEMEMES, D. and SANS, A. (1991). Synapsin I and Synaptophysin expression during ontogenesis of the mouse peripheral vestibular system. *J Neurosci* 11: 1173-81.
- SCHWAMBORN, J.C. and PUSCHEL, A.W. (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci* 7: 923-9.
- SCHWARTING, G.A., RAITCHEVA, D., CRANDALL, J.E., BURKHARDT, C. and PUSCHEL, A.W. (2004). Semaphorin 3A-mediated axon guidance regulates convergence and targeting of P2 odorant receptor axons. *Eur J Neurosci* 19: 1800-10.
- 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.
- SEKIYA, T., SHIMAMURA, N., YAGIHASHI, A. and SUZUKI, S. (2003). Effect of topically applied basic fibroblast growth factor on injured cochlear nerve. *Neurosurgery* 52: 900-7; discussion 907.
- SHI, F., CORRALES, C.E. and EDGE, A.S.B. (2007). Sensory neurons produced by induction of human ES cells with BMP4: engraftment in the organ of Corti. *Association for Research in Otolaryngology Abstract, Annual Meeting*.
- SHIRVAN, A., KIMRON, M., HOLDENGREBER, V., ZIV, I., BEN-SHAUL, Y., MELAMED, S., MELAMED, E., BARZILAI, A. and SOLOMON, A.S. (2002). Antisemaphorin 3A antibodies rescue retinal ganglion cells from cell death following optic nerve axotomy. *J Biol Chem* 277: 49799-807.
- STANKOVIC, K., RIO, C., XIA, A., SUGAWARA, M., ADAMS, J.C., LIBERMAN, M.C. and CORFAS, G. (2004). Survival of adult spiral ganglion neurons requires erbB receptor signaling in the inner ear. *J Neurosci* 24: 8651-61.
- STARR, A., PICTON, T.W., SININGER, Y., HOOD, L.J. and BERLIN, C.I. (1996). Auditory neuropathy. *Brain* 119 (Pt 3): 741-53.
- SUGAWARA, M., CORFAS, G. and LIBERMAN, M.C. (2005). Influence of supporting cells on neuronal degeneration after hair cell loss. *J Assoc Res Otolaryngol* 6: 136-47.
- TAMURA, T., NAKAGAWA, T., IGUCHI, F., TATEYA, I., ENDO, T., KIM, T.S., DONG, Y., KITA, T., KOJIMA, K., NAITO, Y. *et al.* (2004). Transplantation of neural stem cells into the modiolus of mouse cochleae injured by cisplatin. *Acta Otolaryngol Suppl* 65-8.
- 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: 1677-81.
- TAUPIN, P. and GAGE, F.H. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69: 745-9.
- TEMPLE, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414: 112-7.
- TOMITA, Y., MATSUMURA, K., WAKAMATSU, Y., MATSUZAKI, Y., SHIBUYA, I., KAWAGUCHI, H., IEDA, M., KANAKUBO, S., SHIMAZAKI, T., OGAWA, S. *et al.* (2005). Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* 170: 1135-46.
- VARGA, R., KELLEY, P.M., KEATS, B.J., STARR, A., LEAL, S.M., COHN, E. and KIMBERLING, W.J. (2003). Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. *J Med Genet* 40: 45-50.
- WARCHOL, M.E., LAMBERT, P.R., GOLDSTEIN, B.J., FORGE, A. and CORWIN, J.T. (1993). Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans. *Science* 259: 1619-22.
- WATTS, C., MCCONKEY, H., ANDERSON, L. and CALDWELL, M. (2005). Anatomical perspectives on adult neural stem cells. *J Anat* 207: 197-208.
- 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: 984-7.
- 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: 147-65.
- YERUKHIMOVICH, M.V., BAI, L., CHEN, D.H., MILLER, R.H. and ALAGRAMAM, K.N. (2007). Identification and characterization of mouse cochlear stem cells. *Dev Neurosci* 29: 251-60.
- 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. *Eur J Neurobiol* 65: 282-93.

Related, previously published *Int. J. Dev. Biol.* articles

See our Special Issue ***Ear Development*** edited by Fernando Giraldez and Bernd Fritsch at:
<http://www.ijdb.ehu.es/web/contents.php?vol=51&issue=6-7>

Neural differentiation from human embryonic stem cells in a defined adherent culture condition

Hossein Baharvand, Narges-Zare Mehrjardi, Maryam Hatami, Sahar Kiani, Mahendra Rao and Mahdi-Montazer Haghighi
Int. J. Dev. Biol. (2007) 51: 371-378

Pax7 identifies neural crest, chromatophore lineages and pigment stem cells during zebrafish development

Ana M Lacosta, Jesús Canudas, Cristina González, Pedro Muniesa, Manuel Sarasa and Luis Domínguez
Int. J. Dev. Biol. (2007) 51: 327-331

Axon guidance in the inner ear

Donna M. Fekete and Andrea M. Campero
Int. J. Dev. Biol. (2007) 51 doi: 10.1387/ijdb.072341df

Analysis of Netrin 1 receptors during inner ear development

Tanja Matilainen, Maarja Haugas, Jordan A. Kreidberg and Marjo Salminen
Int. J. Dev. Biol. (2007) 51: 409-414

Cell proliferation during the early compartmentalization of the *Xenopus laevis* inner ear

Quincy A. Quick and Elba E. Serrano
Int. J. Dev. Biol. (2007) 51: 201-210

Enhanced development of porcine embryos cloned from bone marrow mesenchymal stem cells

Hai-Feng Jin, B. Mohana Kumar, Jung-Gon Kim, Hye-Jin Song, Yeon-Ji Jeong, Seong-Keun Cho, Sivasankaran Balasubramanian, Sang-Yong Choe and Gyu-Jin Rho
Int. J. Dev. Biol. (2007) 51: 85-90

Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro

Hossein Baharvand, Seyed M. Hashemi, Saeid Kazemi Ashtiani and Ali Farrokhi
Int. J. Dev. Biol. (2006) 50: 645-652

Common culture conditions for maintenance and cardiomyocyte differentiation of the human embryonic stem cell lines, BG01 and HUES-7

Chris Denning, Cinzia Allegrucci, Helen Priddle, Maria D. Barbadillo-Muñoz, David Anderson, Tim Self, Nigel M. Smith, C. Tony Parkin and Lorraine E. Young
Int. J. Dev. Biol. (2006) 50: 27-37

Expression of regulatory genes for pancreas development during murine embryonic stem cell differentiation

Josué K. Mfopou, Erik Willems, Luc Leyns and Luc Bouwens
Int. J. Dev. Biol. (2005) 49: 915-922

Differentiation of Inner Ear Stem Cells to Functional Sensory Neurons

Rodrigo Martinez-Monedero,^{1,2} Eunyoung Yi,³ Kazuo Oshima,^{1,2}
Elisabeth Glowatzki,³ Albert S.B. Edge^{1,2,4}

¹ Department of Otolaryngology and Laryngology, Harvard Medical School, Boston Massachusetts 02115

² Eaton-Peabody Laboratory, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, Massachusetts 02114

³ Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, Maryland

⁴ Program in Speech and Hearing Bioscience and Technology, Division of Health Science and Technology, Harvard and MIT, Cambridge, Massachusetts 02139

Received 30 July 2007; revised 3 December 2007; accepted 14 December 2007

ABSTRACT: Inner ear stem cells can be isolated by neurosphere formation from the vestibular organs and the cochlea. The cells are pluripotent, with the potential to become hair cells and neurons, the cochlear cell types whose loss causes deafness. Here we describe the control of cell fate decisions that determine the phenotype adopted by these progenitors, and we determine whether differentiation to sensory neurons is preferred over other types of neurons. Differentiation of progenitor cells recapitulated developmental pathways of embryonic sensory neurons. Based on marker expression, retinoic acid increased the yield of neurons and the percentage of sensory neurons obtained and caused a sharp increase in *Pax2*, a key transcription factor of cranial placodes. Markers of embryonic auditory and other sensory neurons, *GATA3*, *Brn3a*, and *islet1*, could be

detected after 3 days of differentiation of the cells, and markers of the sensory phenotype, *peripherin*, *calretinin*, *TrkC*, and *TrkB* were expressed after 10 days. The differentiated cells had tetrodotoxin-sensitive sodium currents and fired action potentials, and recordings revealed functional AMPA type-glutamate receptors, further indicating that these cells had developed neuronal features. Neurons differentiated from these stem cells grew processes to hair cells *in vitro*. Development of functional activity in cells with the markers of sensory neurons suggested that the inner ear stem cells might have the capacity to replace cells lost due to neural degeneration. © 2008 Wiley Periodicals, Inc. *Develop Neurobiol* 68: 669–684, 2008

Keywords: neural progenitor; sodium current; regeneration; deafness; auditory; spiral ganglion

This article contains supplementary material available via the Internet at <http://www.mrw.interscience.wiley.com/suppmat/1932-8451/suppmat/>

Correspondence to: A. Edge (albert_edge@meei.harvard.edu).

Contract grant sponsor: National Institute on Deafness and other Communicative Disorders (NIDCD); contract grant numbers: R01 DC007174, R01 DC006476, P30 DC05209.

© 2008 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 15 February 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/dneu.20616

INTRODUCTION

Recent studies have shown that stem cells of the inner ear can give rise to a variety of cell types including muscle, kidney, heart, liver, and skin cells (Li et al., 2003). The stem cells could be isolated as neurospheres from the vestibular organs of the inner ear (Li et al., 2003; Oshima et al., 2007) and generated inner ear cells such as hair cells and neurons after isolation. Stem cells were also isolated from the mouse organ

of Corti and spiral ganglion (Oshima et al., 2007), where progenitor cells have also been demonstrated in the adult human (Rask-Andersen et al., 2005). The vestibular sphere-forming cells are found throughout life in the mouse, but the cochlear stem cells appear to be lost in the postnatal period (Oshima et al., 2007). Given that neurons and sensory cells of the cochlea do not normally regenerate, a source of cells for cochlear repair is needed and inner ear stem cells could potentially serve this role in hearing loss caused by damage of neurons and hair cells.

The otic placode, one of the cranial placodes that form the paired sensory organs of the head, consists of an ectodermal thickening that invaginates to form the otocyst. Progenitor cells of the otocyst give rise to all of the specialized structures of the inner ear (Barald and Kelley, 2004). The auditory nerve is formed by placode-derived neuroblasts that undergo a series of programmed steps to form sensory neurons (Fekete and Wu, 2002; Barald and Kelley, 2004) whose origin is therefore distinct from that of sensory neurons derived from the neural crest (Crane and Trainor, 2006). Progenitor cells in the developing embryo that form the auditory and vestibular neurons and hair cells may display some degree of overlap (Sato and Fekete, 2005). By analogy to the neural crest, the placodal stem cells may include cells that have the capacity to differentiate into neurons and glia and are therefore bipotent, and cells that differentiate only into sensory neurons (Kim et al., 2003; Crane and Trainor, 2006).

For these stem cells to be used for approaches to regeneration as well as serving as a model system for the differentiation of placodally derived neurons, it will be important to determine whether the cells follow the developmental steps taken by otic placode progenitors in the embryo and whether the progenitor cells differentiate into mature neurons with the electrophysiological characteristics of inner ear neurons.

We show here that the inner ear stem cells form sensory neurons of an inner ear phenotype based on marker expression and on their electrophysiological activity. The neurons respond to glutamate, the neurotransmitter that activates inner ear neurons at the hair cell synapse, and they fire action potentials. We have also tested whether neurons differentiated from the stem cells would make connections to denervated hair cells. We find that the neurons send out processes to the organ of Corti after removal of spiral ganglion neurons (Martinez-Monedero et al., 2006) and form connections that would be appropriate for regenerating the neural circuitry of the intact tissue.

To determine whether the stem cells followed established differentiation pathways, we compared their programs of temporal expression of markers to

those occurring in the embryo. A number of transcription factors (*GATA3*, *Brn3a*, *Ngn1*, *NeuroD*, *islet1*) as well as receptors for neurotrophins (*TrkB* and *TrkC*) have been defined as markers for early auditory and vestibular neurons (Greenwood et al., 1999; Fariñas et al., 2001; Huang et al., 2001; Karis et al., 2001; Kim et al., 2001, 2003; Radde-Gallwitz et al., 2004; Fritzsche et al., 2005). We find that these markers are expressed in the differentiating stem cells and that *Pax2*, a transcription factor required for neurogenesis in the otocyst, is sharply upregulated in the stem cells after stimulation by retinoic acid (RA), an agent that we have used to increase the number of neurons obtained from the stem cells.

These data suggest that inner ear stem cells have the capacity to form sensory neurons by a differentiation pathway that recapitulates the steps taken by embryonic progenitors during inner ear development and that these cells have the potential to replace degenerated afferent neurons.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Utricle-Derived Stem Cells

All animal studies were conducted under an approved institutional protocol according to National Institutes of Health guidelines. For each experiment we dissected 4–10 utricular maculae in HBSS from age 1–3 day C57BL/6 mice, *Thy1-CFP* transgenic mice (both from Jackson Labs), or *Atoh1-nGFP* transgenic mice (provided by Jane E. Johnson), which express green fluorescent protein under the control of the *Atoh1* enhancer (Lumpkin et al., 2003). The remains of subepithelial tissue and the overlying otolithic membrane were removed and the cells from the utricle were dissociated using trypsin (0.25%) for 15–20 min in PBS at 37°C. The enzymatic digestion was stopped by addition of 10% FBS in DMEM-high glucose medium. The tissue was washed twice and gently triturated. The cells were diluted using DMEM-high glucose and F12 (mixed 1:1) supplemented with N2 and B27 (Invitrogen), EGF (20 ng/mL; Chemicon), bFGF (10 ng/mL; Chemicon), IGF-1 (50 ng/mL; Chemicon), and heparan sulfate (50 ng/mL; Sigma). The cell suspension was then passed through a 70- μ m cell strainer (BD Labware) to remove cell aggregates and debris.

We cultured dissociated single cells in Petri dishes (Greiner) for 5–7 d to obtain spheres (Oshima et al., 2007), termed first generation spheres, from the floating cells. For cell propagation 50–100 individual spheres were collected and dissociated as described (Oshima et al., 2007) using NeuroCult chemical dissociation kit (StemCell Technologies). The new cell suspensions were cultured in F12/DMEM (1:1) with the same growth factors in Petri dishes to obtain new spheres, termed second generation, and propagation was repeated in 5–7 d. Secondary, tertiary, and subsequent sphere formation always occurred within 5–7 d

of culturing single cells, and the size of the spheres was the same as previously described [average of 33 cells per sphere (Oshima et al., 2007)]. The spheres used in these experiments were all from the second or third generation. Proliferating cells in the spheres were labeled with 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of BrdU by incubation during the period of sphere formation or differentiation.

Differentiation of Stem Cells

The second or third generation spheres were transferred to polyornithine-laminin treated 4-well plates (Greiner) and allowed to attach for ~ 10 h in 10% FBS in DMEM-high glucose. After the cell attachment was complete, based on microscopic inspection, the medium was replaced with serum free DMEM-high glucose and F12 (mixed 1:1) with N2 and B27 (Invitrogen), NT-3 (50 ng/mL; Chemicon), and BDNF (100 ng/mL; Chemicon). Cells were treated with RA (1 μM ; Sigma), noggin (0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$; R+D Systems), sonic hedgehog (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; R+D Systems) or medium without further additives (as a control) for 2 d and cultured for the indicated length of time, with replacement of 80% of the medium every second day. Differentiated cells were analyzed by total RNA preparation followed by RT-PCR or by immunocytochemistry. Quantification of the differentiated neurons, glia or hair cells was performed using Axiovision 4.3 software and cell counts were expressed as mean \pm standard deviation (sd). Each experiment was conducted on spheres prepared from a separate mouse. An average of 1000 cells were counted in each experiment. Percentages were compared between groups using analysis of variance (ANOVA) and Student-Newman-Keul test, with $p < 0.05$ taken as significant.

β -Bungarotoxin Treatment of Organ of Corti in Culture *In vitro*

Organotypic explant cultures were prepared from the cochleas of 1–3 d postnatal C57BL/6 mice or *Atoh1-nGFP* transgenic mice. We used the methods described in detail previously (Sobkowicz et al., 1975; Martinez-Monedero et al., 2006), using four to five explants per condition. The organ of Corti and spiral ganglion tissue were freed from the capsule and separated from the stria vascularis. For the selective elimination of the remaining spiral ganglion neurons, medium for culture of the organ of Corti (DMEM-high glucose and F12 (mixed 1:1) with N2, B27) was supplemented with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ β -bungarotoxin for 24 h in a 37°C incubator. After the treatment with neurotoxin, the culture was washed five times with medium for 10 min each.

Co-Culture of Denervated Organ of Corti with Spheres

Approximately 200 donor spheres isolated from utricles from C57/BL6 mice or *Thy1*-CFP mice were added to the

recipient denervated organ of Corti explants (four to five per well) in 100 mL of DMEM-high glucose and F12 (mixed 1:1) containing N2, B27, NT-3 (50 ng/mL), and BDNF (100 ng/mL) in a 4-well dish in a 37°C incubator. The spheres attached to the plate during the first night of culture. RA (1 μM) was added for 2 d and the cultures were kept for a total of 6–10 d. Immunohistochemistry was performed to trace donor cells after co-culture.

Immunohistochemistry

The cells and organs of Corti were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature. After three washes with PBS cells were permeabilized and non-specific binding sites were blocked with PBT1 solution (0.1% Triton X-100, 1% BSA (w/v) and 5% heat inactivated goat serum in PBS) for 20 min. Fixed, blocked, and permeabilized tissue was incubated overnight at 4°C with primary antibodies in PBT1. Dilutions used were 1:1000 for polyclonal rabbit antibody against myosin VIIa (Proteus Bioscience), 1:500 for polyclonal rabbit antibody to Musashi-1 (courtesy of Dr. H. Okano, Keio University), 1:500 for polyclonal rabbit antibody against GFAP (Dako), 1:500 for monoclonal mouse antibody against neuron-specific β -III tubulin (TuJ, MMS-435P; Covance), 1:200 for polyclonal chicken antibody against β -III tubulin (TuJ, NeuroMics), 1:500 for polyclonal rabbit antibody to synapsin (Chemicon), 1:500 for monoclonal antibody against BrdU (Sigma), 1:500 for monoclonal antibody to nestin (Developmental Studies Hybridoma Bank), 1:2000 for polyclonal rabbit antibody to choline acetyltransferase (Abcam), 1:500 for monoclonal antibody to tyrosine hydroxylase (Sigma), 1:500 for monoclonal antibody 81.5C10 (HB9, Developmental Studies Hybridoma Bank), 1:500 for polyclonal rabbit antibody to Brn3a (Sigma) (Shi et al., 2007), 1:500 for polyclonal goat antibody to TrkC, 1:2000 for polyclonal rabbit antibody against TrkB (Chemicon), 1:500 for polyclonal rabbit antibody to glutamate (Sigma), 1:2000 for polyclonal goat antibody against calretinin (Chemicon), 1:500 for polyclonal rabbit antibody to GluR2/R3 (Chemicon), 1:2000 for polyclonal rabbit antibody to serotonin (5-hydroxytryptamine), 1:500 for polyclonal rabbit antibody to Pax2 (Covance), 1:100 (Li et al., 2004) for monoclonal antibody to islet1 (Developmental Studies Hybridoma Bank), 1:500 for polyclonal rabbit antibody to peripherin (Chemicon).

Cy5-, TRITC-, and FITC-conjugated antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used to detect primary antibodies. Cell nuclei were labeled by exposure to 4,6-diamidino-2-phenylindole with Vecta-shield (Vector Laboratories). Staining was visualized with epifluorescence microscopy (Axioskop 2 Mot AxioCam, Zeiss) or confocal microscopy (TCD, Leica).

RNA Isolation and RT-PCR

Total RNA was isolated from utricle spheres and differentiated spheres generated as described above, using RNeasy

Mini Kits (Qiagen) and reverse transcribed into cDNA with Superscript III (Invitrogen). PCR analysis was performed using cDNA as template with the following oligonucleotides in PCR reactions conducted as described (Jeon et al., 2007): glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) sense, AACGGGAAGCCCATCACCATCTT, GAPDH antisense, CAGCCTTGGCAGCACCAGTGG; Pax2 sense, CCAAAGTGGTGGACAAGATTGCC, Pax2 antisense, GGATAGGAAGGACGC TCAAAGAC; Pax6 sense, AGACTTTAACCAAGGGCGGT, Pax6 antisense, TAGCCAGGT TGCGAAGAAGT; Sox2 sense, CACCCGGGCTCAACGCTCACG, Sox2 antisense, TCCCTTCTCCAGTTCGCAGTCCA; Oct4 sense, ATGGCTGGACACCTGGCTTCAG, Oct4 antisense, TTAACCCCAAAGCTCCAGGTT; GATA3 sense, CCTCCGACGGCAGGAGTC, GATA3, antisense, ACCGTAGCCCTGACGGAGTTT, *islet1* sense, CCCGGGGGCCACTATTTG, *islet1* antisense, GTCGGCTGCAGGCTACACA, NANOG sense, AAGTACCTCAGCCTCCAG, NANOG antisense, AGAAA GTCCTCCCGAAG, Tc11 sense, TCGGCTGCCTTGGTT, Tc11 antisense, ACTGCCTGGCCTCTTGT Tbx3 sense, CA GCCGCGGTCCCACATCG, Tbx3 antisense, GGCCGT GCTCCTCCTGTCT.

Electrophysiology

For electrophysiological experiments, stem cells were transferred to polyornithine-laminin coated glass coverslips, differentiated by application of RA for 3–4 days (in the medium described above) and cultured for 1–6 more days without RA until recording. For comparison, spiral ganglion neurons were isolated and cultured. For isolation, spiral ganglions were dissected from C57BL/6 mice (d 1–3). Neurons were dissociated using trypsin (0.25%, 20–30 min, 37°C), redispersed in 10% FBS in DMEM-high glucose, transferred to polyornithin-laminin coated coverslips and allowed to attach overnight. The medium was replaced with serum-free DMEM-high glucose and F12 (mixed 1:1) containing N2, B27 (Invitrogen), NT-3 (50 ng/mL), and BDNF (100 ng/mL). Cells were cultured with daily replacement of 80% of the medium for 3–5 days until recording. Coverslips with plated differentiated stem cells or spiral ganglion neurons were moved into a recording chamber mounted on an upright microscope (Axioskop2 FS plus, Zeiss). Cells were continuously superfused with (in mM): KCl, 5.8; NaCl, 144; MgCl₂, 0.9; CaCl₂, 1.3; NaH₂PO₄, 0.7; HEPES, 10; glucose, 5.6 (pH 7.4, NaOH, 300 mOsm) at 2–3 mL/min. Cells were visualized through a 40× water immersion objective and 4× magnification using green light, DIC optics, and a Newvicon camera (Dage, MTI). Recording pipettes were fabricated from 1 mm borosilicate glass (B100F, WPI), coated with Sylgard[®] (Dow Corning), and had tip resistances of 3–5 MΩ. Internal solution contained (mM) KCl 135, MgCl₂ 3.5, CaCl₂ 0.1, EGTA 5, HEPES 5, ATP-Na₂ 2.5 (pH 7.3, KOH, 290 mOsm). In some experiments, the composition of the internal solutions was modified to (mM); KCl 131, MgCl₂ 3.5, CaCl₂ 0.1, EGTA 5, HEPES 5, ATP-Na₂ 5, sodium phosphocreatine 10 (pH 7.3,

KOH, 295 mOsm). Liquid junction potentials (–4 mV for both internal solutions) were corrected off-line. To trace the recorded cells for immunostaining, 50 nM Alexa Fluor[®] 568 hydrazide sodium salt (Molecular Probes) was added to the internal solution. Tetrodotoxin (TTX) (Alomone Labs) and 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt (CNQX) (Tocris) were diluted daily from frozen stocks and applied via a gravity-driven flow pipette (100-μm diameter) placed near the cells, connected with a 6 channel valve controller (Warner). All other chemicals were purchased from Sigma (St. Louis). Voltage and current clamp recordings were done with a Multiclamp 700A amplifier and CV-7B head stage (Axon Instruments), digitized at 10–50 kHz, and filtered at 2–10 kHz. Series resistances were about 20 MΩ, and not compensated for. During current clamp pipette capacitance neutralization and bridge balance were used to compensate the errors from pipette capacitance and tip resistance. Data analysis was done off-line using pClamp 9 software package (Axon Instruments) and Origin 7.5 (OriginLab). Statistical significance was tested using SigmaStat 3.1 (Systat). Values are presented as mean ± sd.

RESULTS

Stimulation of Neuron Formation by Treatment with RA

To assess differentiation to neurons, spheres from utricle were plated on polyornithine-laminin-coated tissue culture plates in the absence of growth factors. The floating spheres prior to differentiation were undergoing cell division as revealed by incubation with BrdU which was incorporated into $87.4 \pm 5\%$ ($n = 3$) of the cells based on staining with antibody against BrdU [Fig. 1(a,b)]. The spheres expressed Sox2 [Fig. 1(e)], a marker observed in adult stem cells as well as ES cells, and other markers that have been shown to correspond to the stem cell phenotype in mouse ES cells, such as Tbx3 and Tc11 [Fig. 1(e)], but not Nanog [Fig. 1(e)] and Oct4. Stem cells differentiated for 10 d formed neurons that stained for β -III tubulin (TuJ) and had a variety of morphologies, including bipolar and multipolar, as well as glial cells that stained for GFAP [Fig. 1(c)]. When the cells were made from *Math1-nGFP* mice, developing hair cells were apparent in the spheres based on the expression of green fluorescence and expression of myosin VIIa in some cells [Fig. 1(d)], whereas others were at an earlier stage and had not yet started to express myosin VIIa. Prior to transfer of the spheres onto plates, no expression of β -III tubulin, GFAP, Math1, or myosin VIIa was detected.

Neurons identified by the neuronal marker β -III tubulin accounted for $5.04 \pm 1.2\%$ ($n = 7$) of the

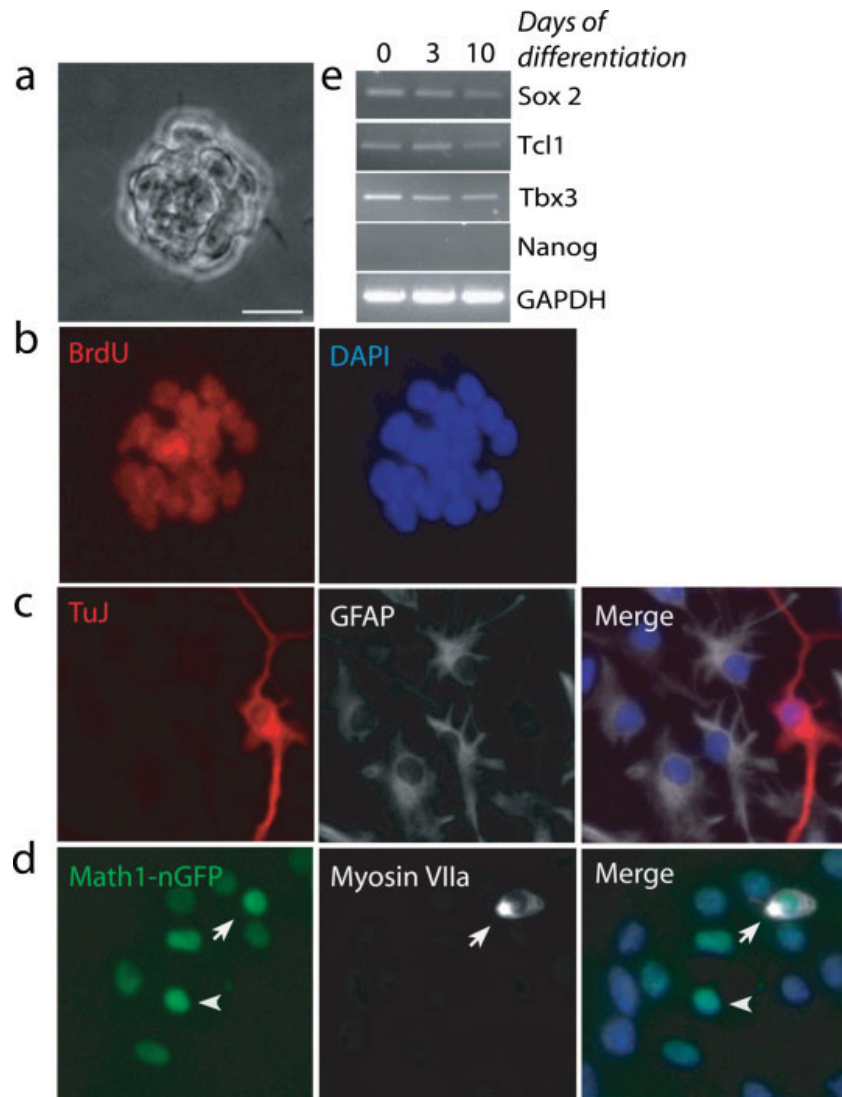


Figure 1 Sphere-derived stem cells from utricle developed into a variety of cells. (a) A floating sphere from utricle prior to plating. (b) Spheres were immunostained for BrdU after growth of floating spheres for 24 h in BrdU. Nuclei are labeled with DAPI. (c) After removal of growth factors, culture was stained with antibodies to β -III tubulin (shown in red) and GFAP (shown in white) after 10 d in culture. (d) Inner ear stem cells isolated from a *Math1-nGFP* mouse differentiated to hair cells. Plated spheres were stained with an antibody to myosin VIIa (arrow, shown in white) after 10 d in culture GFP allowed visualization of *Math1*-positive cells (arrowhead). (e) Gene expression in floating spheres and spheres differentiated for 3 d and 10 d. After RNA isolation and reverse transcription, the stem cell genes were amplified by PCR. Genes are indicated to the right and days after starting differentiation are shown at the top. Scale bar is 40 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

total cells. The percentage of neurons was increased by treatment of the cultures with RA (see Fig. 2) as well as noggin and sonic hedgehog. The yield was highest with RA, with the neurons accounting for $12.87 \pm 2.1\%$ ($n = 7$) of the total cells, while the per-

centage of neurons after noggin treatment was $6.42 \pm 1.7\%$ ($n = 7$), and after sonic hedgehog was $8.00 \pm 2.1\%$ ($n = 7$). Our results suggest that RA at 1μ M had a significant effect on promoting β -III tubulin-positive cells ($p < 0.05$) compared to culture without

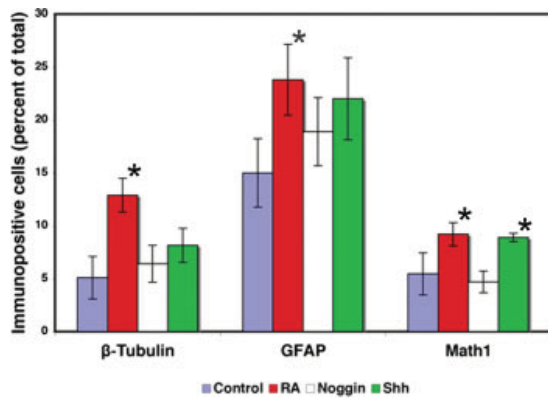


Figure 2 Percentage of hair cells and neurons obtained after treatment of the cultures with various agents. Treatment of plated spheres with retinoic acid (RA), noggin, or sonic hedgehog for 2 d was followed by immunostaining after culture for a total of 10 d. Results of 7 experiments are shown. The cells were counted as a percentage of DAPI stained cells. The number of neurons is based on staining for β -III tubulin; hair cell number is based on expression of *GFP* in spheres from the *Math1-nGFP* mouse. The number of glial cells is based on GFAP staining. Significant differences ($p < 0.05$) are marked with an asterisk. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

the addition of factors. The percentage of *Math1*-positive cells was also significantly higher ($p < 0.05$) after addition of RA ($9.23 \pm 1\%$, $n = 7$) or sonic hedgehog ($8.89 \pm 0.5\%$, $n = 7$) as compared to noggin ($4.2 \pm 0.9\%$, $n = 7$) or no additions ($5.45 \pm 1\%$, $n = 7$) (see Fig. 2). The yield of glial cells identified by staining with GFAP antibody was also significantly increased for the utricular spheres after treatment with RA ($p < 0.05$), but not with noggin or sonic hedgehog (see Fig. 2). The average number of cells per sphere was not changed by RA addition (30 ± 10 cells with RA treatment and 33 ± 12 without RA treatment) as determined by DAPI staining.

Spheres Differentiated with RA Recapitulate the Neurogenic Program of the *In Vivo* Progenitors

We wanted to assess whether a neural progenitor differentiation program was initiated in the inner ear stem cells cultured in RA. When spheres from utricle were plated and examined after 3 d of culture, we detected markers of neural progenitor cells. Examination of the cells plated from spheres and treated with

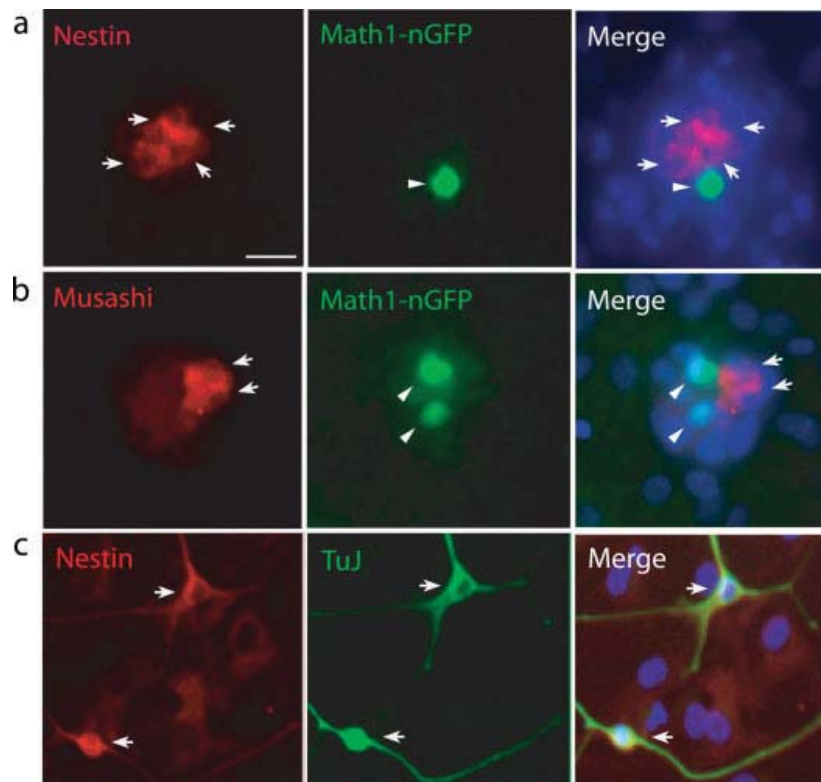


Figure 3

RA revealed early steps of differentiation toward a neural fate: $23.64 \pm 4\%$ ($n = 3$) of the cells were *nestin*-positive, $21.10 \pm 3\%$ ($n = 3$) were *Musashi*-positive, and $3.02 \pm 1\%$ ($n = 3$) were *Math1*-positive [Fig. 3(a,b)].

The *Math1*-positive cells were in separate regions of the spheres from the cells expressing *nestin* [Fig. 3(a)]; we did not find *nestin* or *Musashi* expressing cells that co-expressed *Math1* after differentiation of plated spheres for 3 d ($n = 5$). This suggested either that *Math1*-positive cells that were on a pathway to becoming hair cells turned off *nestin* expression or that *nestin* was expressed in cells that were destined to become neurons and not in those that were to become hair cells. However, unlike the cells that expressed *Math1*, β -III tubulin-positive cells were positive for *nestin* expression: $97 \pm 12\%$ ($n = 4$) of β -III tubulin-positive cells expressed *nestin* at 3 d [Fig. 3(c)], suggesting that the *nestin*-expressing cells in the spheres became neurons. This is consistent with the results of GFP expression driven by the *nestin* promoter in the embryonic inner ear showing that GFP was present in cells of the spiral ganglion but not in hair cells (Lopez et al., 2004).

Early markers of the developing inner ear, *Pax2* and *islet1* (Torres et al., 1996; Lawoko-Kerali et al., 2002; Burton et al., 2004; Radde-Gallwitz et al., 2004) were also detected in spheres that had been in medium with RA for 3 d [Fig. 4(a)]. Like the *nestin* and *Math1*-positive cells, the *Math1* and *Pax2* positive cells were clustered in patches and did not overlap. This suggested a possible specification of *Pax2*-positive cells for differentiation down a neuronal path. A similar pattern was seen for *islet1* [Fig. 4(b)]. The progenitor cells in RA-treated spheres also expressed the sensory neuron lineage marker (Huang et al., 2001), *Brn3a* [Fig. 4(c)]. *Brn3a* expression was found in the cells that were positive for *nestin*: after 3 d of differentiation, we found that $85 \pm 10\%$ ($n = 5$) of *nestin*-expressing cells were *Brn3a* positive [Fig. 4(c)], whereas *Math1* was expressed in distinct cells from *Brn3a*. Since *Brn3a* expression is necessary for sensory neuron development and is confined to neurons, the double labeling confirms that the *nestin*-pos-

itive cells were progenitors for these neurons. *Pax2* and *islet1* were also demonstrated by RT-PCR [Fig. 5(c)], and the cells also had mRNA for *BMP4* (not shown) and for the spiral ganglion neuron marker, *GATA3* (Karis et al., 2001; Lawoko-Kerali et al., 2002; Lawoko-Kerali et al., 2004), as well as *Phox2b*, a marker of autonomic neurons in neural crest progenitors (Kim et al., 2003). No changes in the levels of *islet1*, *Phox2b* [Fig. 5(c)] or *BMP4* (not shown) could be seen after RA treatment. *Pax2* was elevated at d 3 after RA treatment, whereas *Pax6* was decreased at d 3 in cells treated with RA as compared to cells without RA treatment [Fig. 5(c)]. Since *Pax2* but not *Pax6* is expressed in the otic placode and otocyst of the embryonic inner ear (Torres et al., 1996; Lawoko-Kerali et al., 2002; Burton et al., 2004), this indicated that RA pushed the cells toward a developing otic phenotype.

Examination of the temporal sequence of expression of these markers indicated that *nestin* and *Musashi* increased at d 3 compared to the low levels seen in the spheres at d 0 [compare Fig. 5(a), d 3 to d 0; $p < 0.05$] but had decreased at d 10 compared to d 3 [compare Fig. 5(a), d 10 to d 3; $p < 0.05$], indicating an upregulation of neural progenitor markers followed by a decrease upon further differentiation. Both β -III tubulin and *Math1* expression, which were below 1% at d 0 [Fig. 5(a), d0], increased significantly at d 10 compared to d 3 [compare Fig. 5(a), d 10 to d 3; $p < 0.05$], suggesting that hair cells and neurons differentiated in the spheres. Cell division also decreased at the time that the spheres first showed evidence of neuronal and hair cell markers [Fig. 5(b), d 3], and cell proliferation had almost completely halted in spheres that had differentiated for 10 d [Fig. 5(b), d 10]. Expression of markers of the sensory lineage, *islet1* and *Pax2* (Torres et al., 1996; Burton et al., 2004; Uemura et al., 2005), increased significantly at d 3 compared to levels below 10% at d 0 [compare Fig. 5(a), d 3 to d 0; $p < 0.05$], consistent with RA-induced development of sensory progenitor cells, and decreased at d 10 as mature cells were developing. Since the number of *Pax2* positive cells decreased at d 10, a higher expres-

Figure 3 Treatment with RA gives rise to expression of neural progenitor markers, *nestin* and *Musashi*. Spheres from utricle were treated with RA and cultured for 3 d. (a) A sphere was stained for *nestin* (arrows, red), and *Math1* (arrowhead, green) was detected by GFP expression. The *nestin* and *Math1* were in different cells. (b) A sphere stained for *Musashi* (arrows, red). *Math1* activation (arrowhead, green) could be seen from the induction of GFP. (c) *Nestin* staining (arrows, red) in inner ear stem cells cultured for 3 d co-localized with β -III tubulin staining (arrows, green), suggesting that *nestin* was expressed in newly differentiated neurons. Scale bar is 40 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

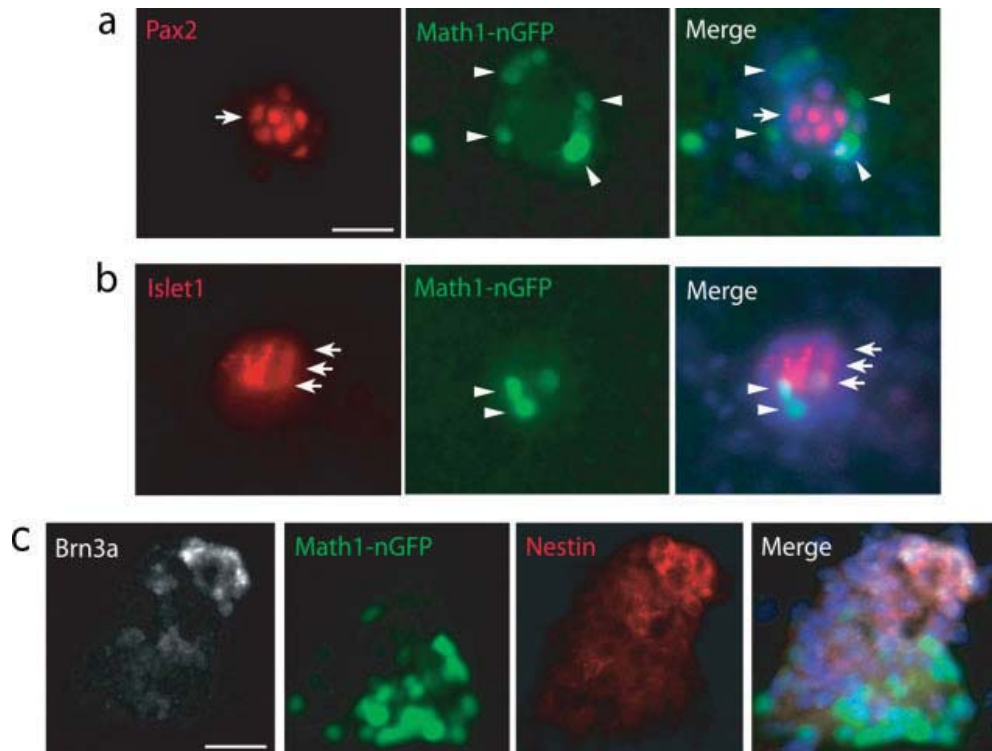


Figure 4 Early markers of the sensory neuron lineage and the hair cell lineage. (a) Treatment of spheres with RA and culture for 3 d resulted in cells with *Math1* and *Pax2* staining. The *Math1* positive cells (arrowheads, green) were not stained for *Pax2* (arrow, red) and the two markers were clustered in distinct areas of the sphere. (b) *Islet1* and *Math1* staining in a sphere cultured with RA for 3 d. The *islet1* (arrows, red) and *Math1* (arrowheads, green) positive cells did not overlap. (c) *Nestin* positive spheres expressed *Brn3a* in the same cells and these cells were separate from cells expressing *Math1*. Scale bars are 40 μm (a,b), 70 μm (c). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

sion of *Pax2* per cell is thought to have accounted for its increased total expression [Fig. 5(c)]. These data indicated that the stem cells gave rise to sensory neuron progenitors that differentiated by a program similar to otocyst precursors.

Neurons Differentiated from Inner Ear Stem Cells

The cells resulting from 10 d of differentiation in RA had neuronal morphology and expressed markers of both sensory neurons and other peripheral neurons, as well as some markers of CNS neurons. Based on the total neurons detected by β -III tubulin staining, the percentage of cells expressing the peripheral sensory and motor neuron marker, peripherin (Escurat et al., 1990), was $58.2 \pm 15.72\%$ ($n = 7$) in the RA-treated spheres and $22.23 \pm 6.6\%$ ($n = 7$) in the control group (no differentiation factor). Therefore, RA at 1

μM had a significant effect on promoting peripherin-positive cell differentiation ($p < 0.05$). The sensory neuron marker, *calretinin* (Heppelmann and Emson, 1993), was also found in these differentiated cells [Supplemental Fig. 1(a)]. The cells expressed glutamate [Supplemental Fig. 1(c)] and were positive for *GluR2* [Supplemental Fig. 1(d)]. Both *TrkC* and *TrkB* were expressed, and some cells contained both of these receptors [Supplemental Fig. 1(b)], a characteristic of vestibular and auditory neurons (Ernfors et al., 1995; Farinas et al., 2001).

Evaluation of a number of markers for other neuronal types (Supplemental Fig. 2) indicated that CNS neurons were also present, including dopaminergic neurons staining for tyrosine hydroxylase [Supplemental Fig. 2(a)], cholinergic neurons staining for choline acetyltransferase [Supplemental Fig. 2(b)], serotonergic staining for 5-hydroxytryptamine [Supplemental Fig. 2(d)], and motor neurons staining for HB9 [Supplemental Fig. 2(c)]. These neuronal types

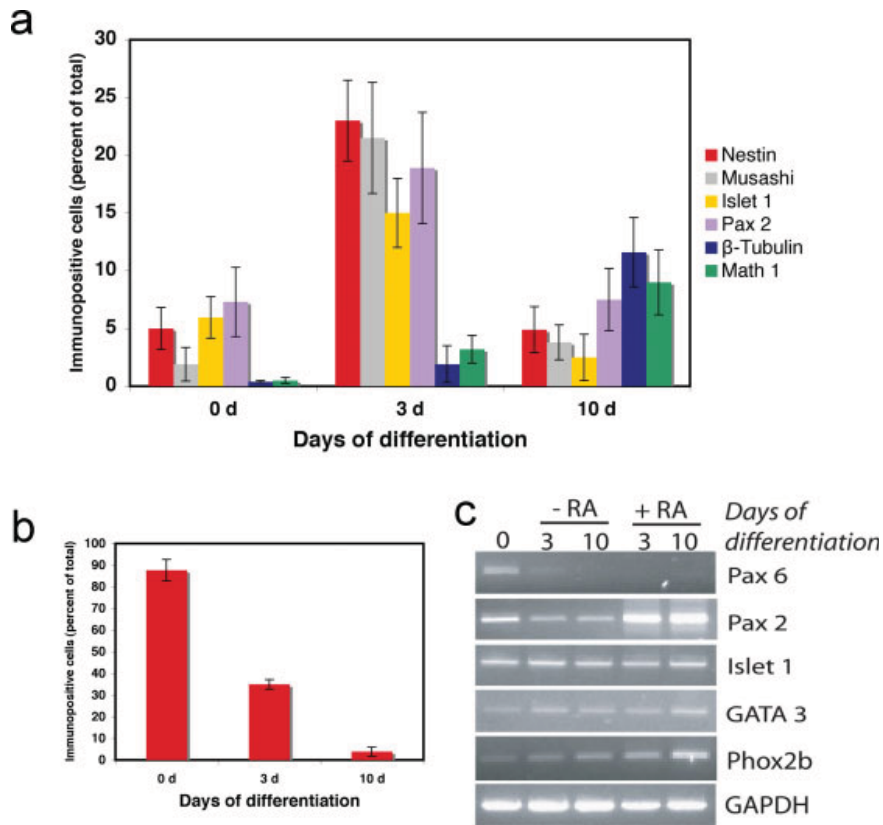


Figure 5 Neural progenitor marker expression in cells differentiated from inner ear stem cells. (a) Temporal sequence of expression of progenitor markers (*nestin* and *Musashi*), markers of sensory precursors (*islet1* and *Pax2*) and neuronal and hair cell markers (β -III tubulin and *Math1*) is indicated for undifferentiated spheres (at d 0) and cells that were differentiated (at d 3 and d 10) after removal of growth factors and plating in medium containing RA. b. BrdU incorporation at d 0, 3, and 10 after RA addition shows that cell division decreased when the mature markers were first expressed (at d 3). (c) RT-PCR shows that *Pax6*, *Pax2*, *islet1*, *GATA3*, and *Phox2b* were expressed in the spheres. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

accounted for $7.77 \pm 2.1\%$, $7.61 \pm 1.9\%$, $6.21 \pm 2\%$, and $5.43 \pm 1.6\%$ of the β -III tubulin positive neurons ($n = 3$).

Phenotype of Neurons from Electrophysiological Recordings

Our next aim was to determine whether differentiated inner ear stem cells not only expressed neuronal markers but also acquired electrophysiological characteristics of functional neurons or even specific features of inner ear neurons. As the most basic requirement for a functional neuron, we tested for the expression of TTX-sensitive sodium currents and high voltage activating potassium currents, prerequisites for the generation of action potentials. We performed whole cell patch clamp recordings on cells

cultured from spheres after treatment with RA. For recordings we chose cells with round-ovoid shaped somata and long thin processes to select for cells with neuronal features. Membrane resting potentials were -43 ± 18 mV ($n = 27$). For current voltage relations, from a holding potential of -84 mV, voltage steps were applied in 10 mV increments from -104 to 36 mV, for 40 ms every 1 s. All cells tested (41/41) exhibited a high voltage activating potassium current with its threshold at -40 ± 8 mV [Fig. 6(b)]. Three cells (3/41) additionally showed a low voltage activating potassium current with a threshold at about -54 mV. In 41% of the cells tested (17/41), a rapidly activating and inactivating inward current was found with a mean apparent maximum of 620 ± 674 pA and a threshold at -35 ± 9 mV. This current was completely and reversibly blocked by $1 \mu\text{M}$ tetrodotoxin (TTX), a selective blocker of voltage-gated so-

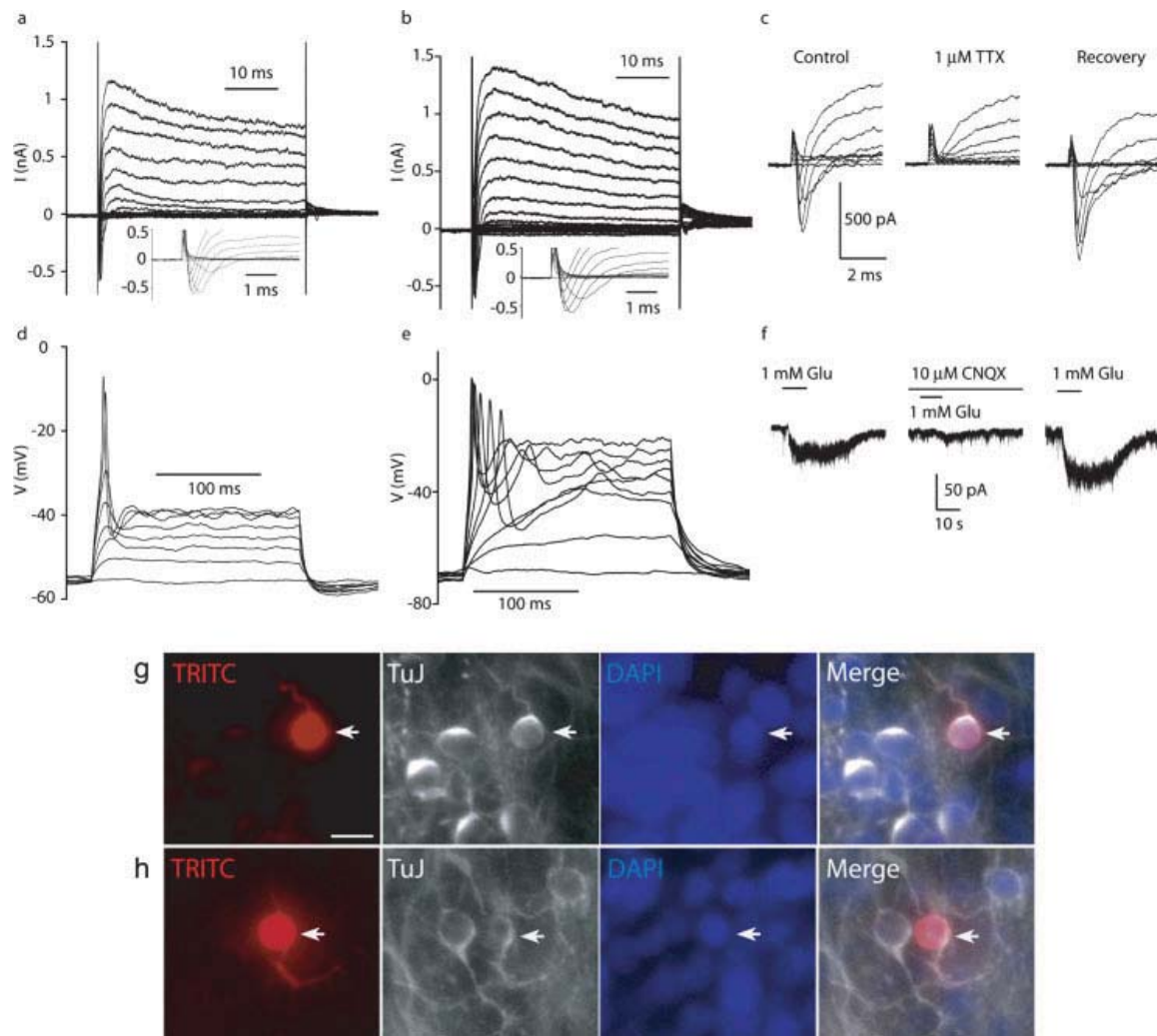


Figure 6 Differentiated stem cells developed electrical features of neurons. IV relations of (a) an isolated cultured spiral ganglion neuron and (b) a cultured differentiated stem cell. Voltage clamp recordings from a holding potential of -84 mV, voltage steps to -104 to $+36$ mV in 10 mV increments. A slowly inactivating outward current and a rapidly activating and inactivating inward current were observed at about -34 mV or more positive (a and b, insets; traces for voltage steps from -84 to $+16$ mV are shown). (c) The rapid inward current in differentiated stem cells was completely and reversibly inhibited by $1 \mu\text{M}$ tetrodotoxin indicating that it is a voltage gated sodium current (I_{Na}). In current clamp, depolarizing current injections (10 – 120 pA in 10 pA increments) evoked action potentials (d) in a cultured spiral ganglion neuron and (e) in a differentiated neuron cell. Only alternate traces are shown. (f) The response of a differentiated stem cell to glutamate was reversibly blocked by $10 \mu\text{M}$ CNQX. Double labeling of (g) recorded spiral ganglion neuron and (h) recorded differentiated stem cell by Alexa Fluor[®] 568 (injected during recordings) and the antibody to the neuronal marker β -III tubulin. From left to right: Alexa Fluor[®] 568, β -III tubulin, DAPI, combined Alexa Fluor[®] 568, β -III tubulin. Arrow points to recorded cell. Scale bars are $25 \mu\text{m}$. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

dium channels (7/7) [Fig. 6(c)]. In response to depolarizing current steps (10 – 120 pA in 10 mV increments, for 200 ms), 4 of 10 cells with voltage-gated sodium currents (I_{Na}) were capable of firing action potentials [Fig. 6(e)]. In three of these cells, negative

Developmental Neurobiology

current was injected before depolarization for removal of sodium channel inactivation.

We tested whether the appearance of I_{Na} correlated with the expression of the neuronal marker β -III tubulin. Cells were filled with the fluorescent marker

Alexa Fluor[®] 568 during recording, and, after fixation tested for β -III tubulin immunoreactivity. Ten out of 11 I_{Na} -positive cells were positive for β -III tubulin [Fig. 6(h)] whereas only 4 out of 12 I_{Na} -negative cells were β -III tubulin positive, showing a correlation of these two neuronal features (Fisher's exact test, $p = 0.024$). The four apparent I_{Na} -negative cells positive for β -III tubulin could in fact also have had small sodium currents obscured by the much larger potassium currents.

To see how these results for differentiated stem cells compare with the native neurons, we performed recordings from isolated spiral ganglion (P1-3) neurons, cultured for 3–5 days under the same conditions. Membrane potentials were -42 ± 8 mV. 100% (19/19) of cultured spiral ganglion neurons had high voltage activating potassium currents [Fig. 6(a)], 2 of 19 cells expressed low voltage activating potassium currents and 1 of 19 cells a hyperpolarization activated current. About 63% (12/19) of spiral ganglion neurons had an apparent sodium currents with a mean amplitude of 1064 ± 1322 pA ($n = 12$). All cells traced with Alexa Fluor[®] 568 were β -III tubulin-positive (13/13), including three I_{Na} -negative cells [Fig. 6(g)].

As RA differentiated stem cells were found positive for glutamate and GluR2/3 by immunostaining, we tested whether these cells had a physiological response to glutamate. Application of glutamate (0.1–1 mM) evoked inward currents in RA differentiated stem cells ($13/25$; 33 ± 29 pA) [Fig. 6(f)] and spiral ganglion neurons ($4/8$; 14 ± 8 pA). The response was inhibited by the specific AMPA receptor blocker CNQX (10 μ M) (5/5 differentiated stem cells) and reversed in one case.

In summary, the electrophysiological features of RA differentiated stem cells and isolated spiral ganglion neurons cultured under the same conditions were quite similar.

Reinnervation of the Organ of Corti

To test whether the stem cell-derived neurons had the capacity to form connections with the *in vivo* target of auditory neurons, they were exposed to a denervated organ of Corti in an explant system. Neurites sent out by the neurons made from spheres extended into the organ of Corti [Fig. 7(a,b)], where they made contact with hair cells. These contacts were formed at the base [Fig. 7(b), Merge, Inset] of both inner and outer hair cells.

Cells stained with BrdU to differentiate between host and donor neurons made contacts with hair cells

of the organ of Corti when placed in the same dish [Fig. 7(c)]. Differentiation of neurons from *Thy1-CFP* stem cells also gave rise to cells that grew neurites toward and made multiple contacts [Fig. 7(d)]. We found ~ 25 β -III tubulin-positive neurons differentiated per 100 spheres plated and the neurons from 100 spheres made an average of 10 contacts with hair cells (in 12 experiments).

DISCUSSION

We have shown in this study that inner ear stem cells differentiate spontaneously *in vitro* to sensory neurons. These inner ear cells are potentially a source for hair cell and sensory neuron replacement after damage of these cells that can lead to degeneration and hearing loss. Like CNS stem cells, inner ear stem cells have the capacity to form spheres that proliferate and can form multiple tissue types (Li et al., 2003). The conversion of these cells to sensory neurons appears to be an innate program that can be activated by culture of the stem cells attached to a substrate in the absence of growth factors, and this program is activated by RA.

We have attempted in these experiments to understand the regulatory signals for differentiation of inner ear stem cells. Differentiation to sensory neurons was increased by treatment with RA through a mechanism involving increased expression of *Pax2*, a key transcription factor for the organization of cranial placodes, which is expressed in embryonic neuronal progenitor cells that delaminate from the otocyst and form the vestibuloacoustic ganglion (Torres et al., 1996; Lawoko-Kerali et al., 2002; Burton et al., 2004). *Pax2* is an early marker of the otocyst, and, therefore, its expression indicated that the cells had entered a program that reflected that of endogenous progenitor cells. Consistent with this view, the cells were also positive for other markers expressed in neuroblasts of the mouse otocyst. *Islet1*, *Brn3a*, and *GATA3* were expressed in these cells, as they are in developing auditory and vestibular neural progenitors (Huang et al., 2001; Radde-Gallwitz et al., 2004). Similar markers have been observed in otic epithelial cell lines placed under differentiating conditions (Nicholl et al., 2005). The cells also expressed markers of auditory and vestibular neurons, *TrkB*, *TrkC*, and *calretinin* (Heppelmann and Emson, 1993; Farinas et al., 2001; Lawoko-Kerali et al., 2002; Lawoko-Kerali et al., 2004). Comparison of spiral ganglion derived spheres to the utricular spheres in preliminary unpublished experiments

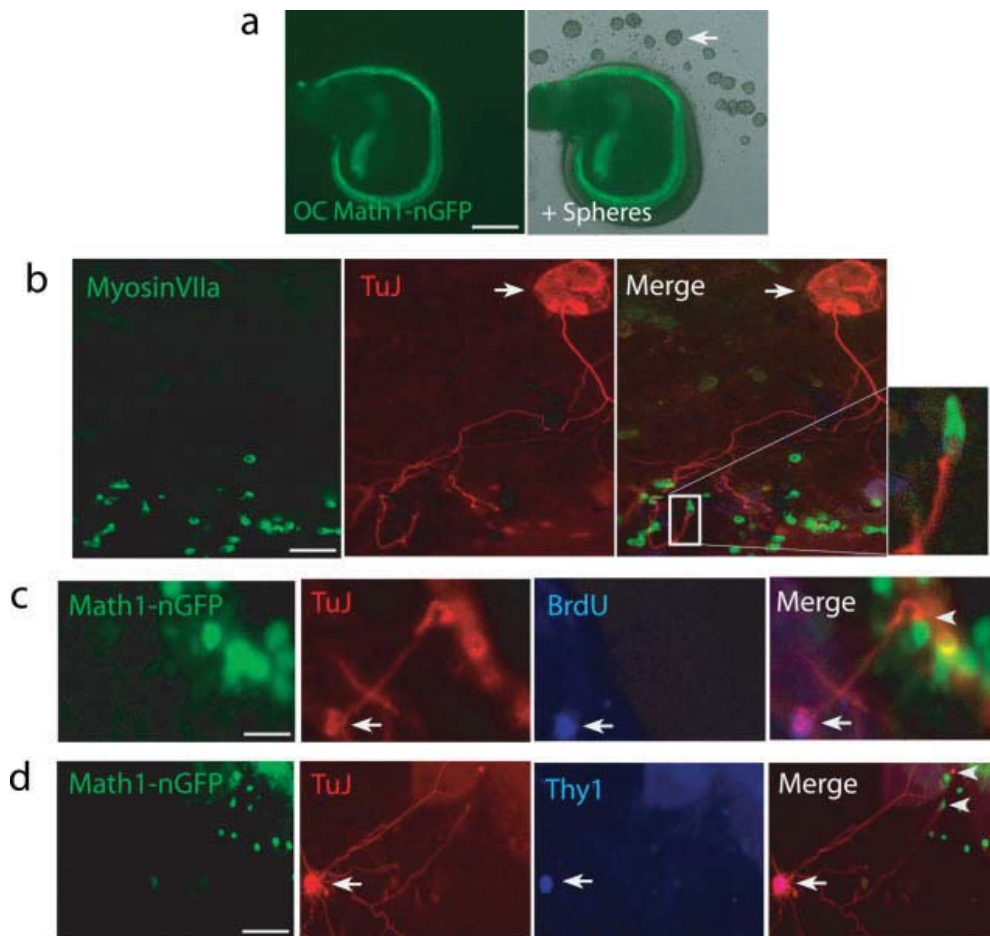


Figure 7 Reinnervation of the organ of Corti. (a) Spheres placed in culture adjacent to an organ of Corti dissected from a 1 d old mouse with neurons removed by β -bungarotoxin in RA-containing medium (location of one sphere indicated by the arrow). Nuclei of the hair cells are seen with GFP. (b) 2 d after co-culture with spheres neurons could be seen to enter the organ of Corti. The processes contacted hair cells as seen in the magnified part of the merged image on the far right. The arrow indicates the position of the sphere in co-culture. (c) Donor cells were identified by their staining for BrdU in spheres that had been labeled with BrdU prior to co-culture with the organ of Corti. The arrow indicates a cell stained for BrdU and β -III tubulin. The arrowhead indicates a contact between the BrdU labeled neuron and hair cell. (d) Neurites from a sphere-derived *Thy1*-CFP positive neuron grew into close proximity with a hair cell. The arrow indicates a cell positive for both *Thy1*-CFP and β -III tubulin. The arrowheads indicate contacts between *Thy1*-CFP labeled neurons and hair cells. Scale bars are 150 μ m (a), 60 μ m (b,d) 20 μ m (c). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

indicated that RA treatment yielded similar proportions of sensory neurons and similar growth of processes to hair cells.

Genes expressed more widely in neural progenitors were found in the inner ear stem cells at the early stages of differentiation. These included *Sox2*, a gene that maintains pluripotency of stem cells (Boyer et al., 2005) and is required for early development of inner ear cells (Kiernan et al., 2005), as well as *Tbx3* and *Tcl1* (Ivanova et al., 2006), two genes required

for self-renewal of human embryonic stem cells. *Nestin*, an intermediate filament protein expressed by CNS neural progenitors (Lendahl et al., 1990), was expressed in progenitors that were destined to differentiate into neurons. Cells expressing hair cell progenitor markers and cells expressing *nestin* were segregated into nonoverlapping patches, suggesting that specification of neural or hair cell fate had been accomplished earlier, similar to the determination of cell fate in otocyst precursor cells that must be speci-

fied early in development (Fritzsche et al., 2006). A similar distinction between cells expressing hair cell markers and cells expressing *islet1* or *Pax2* was seen, suggesting a possible separation of these cell fates. The similarity in timing and identity of the markers expressed in these stem cells to those expressed in the developing otocyst suggests that these cells can be used as a model system for early stages of development of the inner ear.

A requirement for *Pax2* expression for sensory neuron formation is consistent with the phenotype of the *Pax2* knockout animal, in which spiral ganglion neurons, as well as neurons in olfactory and optic ganglia, fail to develop (Torres et al., 1996), or die after early development (Torres et al., 1996; Burton et al., 2004), while hair cells are still produced (Burton et al., 2004). Although the lack of spiral ganglion neurons in these animals has been attributed to missing sensory epithelial cells that would normally provide support for the neurons (Burton et al., 2004), spiral ganglion cells do develop in animals that do not express *Math1* and have no hair cells (Fritzsche et al., 2005), suggesting that a direct effect of *Pax2*, rather than a lack of trophic support from hair cells, could account for the lack of spiral ganglion neurons in the *Pax2* knockout. Our finding that RA treatment led to a sharp increase in *Pax2* expression that was accompanied by loss of *Pax6* expression is consistent with development of the neural progenitors to a sensory phenotype. *Pax6* is expressed in precursors of motor neurons that develop HB9 expression (Li et al., 2005). *Pax2* and *Pax6* play opposing roles in the embryo and their regulation is consistent with opposition, with *Pax2* expression counteracting *Pax6* by an interaction with the *Pax6* promoter (Schwarz et al., 2000). This counter regulation allows the two factors to define boundaries, as for example in the optic cup and stalk (Schwarz et al., 2000) and the forebrain-hindbrain boundary (Wurst et al., 1994). Both are required for eye development (Torres et al., 1996), and they have a common evolutionary origin (Kozmik et al., 2003).

We chose to increase the generation of neurons from the neural stem cells with RA, although sonic hedgehog and inhibition of the BMP pathway also increased neuronal differentiation. This is consistent with development in the ear: enzymes that convert retinol into all-trans retinoic acid, *RALDH2* and *RALDH3*, are expressed in spiral ganglion neurons of the newborn (Wagner et al., 2002; Romand et al., 2006), and a *RALDH2* knockout affects development of neurons. This effect appears to be mediated by a decreased expression of *Pax2* (Niederreither et al., 2000). Although RA binding to a promoter in intron 2 decreases BMP4 synthesis in inner ear cell lines

(Thompson et al., 2003), this did not appear to be the mechanism for the effect seen here, because BMP4 expression was unchanged, and, since sonic hedgehog had little effect, RA is unlikely to be acting through this pathway. Sonic hedgehog and RA have been used to convert stem cells derived from adult bone marrow into sensory neurons (Kondo et al., 2005).

Using whole cell recordings, we showed that RA treated inner ear stem cells developed neuronal features: TTX-sensitive sodium currents and high-voltage activating potassium currents were present, and action potentials could be elicited in 40% of the differentiated stem cells. Additionally, application of glutamate elicited AMPA-receptor mediated currents. More specific features of spiral ganglion or vestibular neurons would include low voltage activating, dendrotoxin-sensitive potassium currents, and hyperpolarization activated currents, I_h (Mo and Davis, 1997; Chabbert et al., 2001; Mo et al., 2002; Risner and Holt, 2006). In the study presented here, the electrophysiological features of isolated spiral ganglion neurons and differentiated stem cells were very similar, and these specific ion channels were mostly absent from both. However, when we cultured excised, intact organ of Corti under the same conditions, and recorded from spiral ganglion neurons located in the organ, both of these specific currents were found (Yi and Glowatzki, unpublished), suggesting that isolated spiral ganglion cells lose these conductances when cultured. The conductances were lost under several isolation conditions tested, including enzymatic and mechanical disruption. Expression of these currents is, thus, apparently dependent on the context in which spiral ganglion cells develop in the organ and continues to depend on the tissue culture environment. For example, neurotrophic factors like BDNF and NT3, most likely released from sensory epithelium, modulate the level of expression of the low voltage activated potassium current in spiral ganglion neurons in culture (Adamson et al., 2002). Stem cell-derived neurons would not be expected to express these channels when cultured out of context. However, if the expression of a low voltage activating potassium current and I_h current depend on environmental cues, their expression can be used as an important indicator that neurons have developed further specific features mimicking spiral ganglion neurons. This will be useful when we develop optimal conditions for differentiation of inner ear stem cell-derived neurons by co-culture with inner ear tissue.

Proneural effects of a similar magnitude to what we have seen here have been observed upon RA treatment of CNS stem cells (Ray and Gage, 2006). Unlike the differentiation of inner ear progenitors to sensory neurons, progenitors in spinal cord did not have the capacity for motor neuron generation

in vitro and did not give rise to functional neurons *in vivo* after RA or sonic hedgehog treatment (Yamamoto et al., 2001; Brejot et al., 2006). Our data suggest that RA upregulates *Pax2*, which could diminish *Pax6* expression and thereby limit the formation of motor neurons. It will be interesting to determine whether RA has the same effect on other neural stem cells or if this response to RA is specific to sensory neural progenitors.

Neurons from the CNS form multiple synapses *in vitro* (Englund et al., 2002; Song et al., 2002; Ma et al., 2004), whereas the neurons from inner ear stem cells formed contacts with hair cells but did not form synapses with each other, consistent with their behavior *in vivo*. We plan to determine whether synapses formed at denervated hair cells are functional by recording from differentiated stem cells that innervate these hair cells.

The sensory neurons may develop from pluripotent inner ear stem cells or from cells of more restricted lineage that develop as the animal ages (Crane and Trainor, 2006). Neural crest stem cells become increasingly restricted in their ability to give rise to cell fates with age. We have not yet analyzed the inner ear stem cells for these different types of progenitors. However, we have shown that cells that give rise to sensory neurons occur at an appreciable frequency within the population of stem cells, and this frequency is increased by RA. This confirms that the inner ear stem cells, despite their pluripotent potential, have a preference for a phenotype appropriate to their tissue of origin.

RMM was sponsored by the Programa nacional para la movilidad de profesores de Universidad e investigadores, Secretaria de Estado de Educacion y Universidades, Spain, and by the National Organization of Hearing Research (NOHR). The authors thank Bernd Fritzsich for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

- Adamson CL, Reid MA, Mo ZL, Bowne-English J, Davis RL. 2002. Firing features and potassium channel content of murine spiral ganglion neurons vary with cochlear location. *J Comp Neurol* 447:331–350.
- Barald KF, Kelley MW. 2004. From placode to polarization: New tunes in inner ear development. *Development* 131:4119–4130.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, et al. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122:947–956.
- Brejot T, Blanchard S, Hocquemiller M, Haase G, Liu S, Nosjean A, Heard JM, et al. 2006. Forced expression of the motor neuron determinant HB9 in neural stem cells affects neurogenesis. *Exp Neurol* 198:167–182.
- Burton Q, Cole LK, Mulheisen M, Chang W, Wu DK. 2004. The role of Pax2 in mouse inner ear development. *Dev Biol* 272:161–175.
- Chabbert C, Chambard JM, Sans A, Desmadryl G. 2001. Three types of depolarization-activated potassium currents in acutely isolated mouse vestibular neurons. *J Neurophysiol* 85:1017–1026.
- Crane JF, Trainor PA. 2006. Neural crest stem and progenitor cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:267–286.
- Englund U, Bjorklund A, Wictorin K, Lindvall O, Kokaia M. 2002. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:17089–17094.
- Ernfors P, Van De Water T, Loring J, Jaenisch R. 1995. Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron* 14:1153–1164.
- Escurat M, Djabali K, Gumpel M, Gros F, Portier MM. 1990. Differential expression of two neuronal intermediate-filament proteins, peripherin and the low-molecular-mass neurofilament protein (NF-L), during the development of the rat. *J Neurosci* 10:764–784.
- Farinas I, Jones KR, Tessarollo L, Vigers AJ, Huang E, Kirstein M, de Caprona DC, et al. 2001. Spatial shaping of cochlear innervation by temporally regulated neurotrophin expression. *J Neurosci* 21:6170–6180.
- Fekete DM, Wu DK. 2002. Revisiting cell fate specification in the inner ear. *Curr Opin Neurobiol* 12:35–42.
- Fritzsich B, Beisel KW, Hansen LA. 2006. The molecular basis of neurosensory cell formation in ear development: A blueprint for hair cell and sensory neuron regeneration? *Bioessays* 28:1181–1193.
- Fritzsich B, Matei VA, Nichols DH, Bermingham N, Jones K, Beisel KW, Wang VY. 2005. Atoh1 null mice show directed afferent fiber growth to undifferentiated ear sensory epithelia followed by incomplete fiber retention. *Dev Dyn* 233:570–583.
- Fritzsich B, Pauley S, Matei V, Katz DM, Xiang M, Tessarollo L. 2005. Mutant mice reveal the molecular and cellular basis for specific sensory connections to inner ear epithelia and primary nuclei of the brain. *Hear Res* 206:52–63.
- Greenwood AL, Turner EE, Anderson DJ. 1999. Identification of dividing, determined sensory neuron precursors in the mammalian neural crest. *Development* 126:3545–3559.
- Heppelmann B, Emson PC. 1993. Distribution of calretinin mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia: A study using non-radioactive *in situ* hybridization histochemistry. *Brain Res* 624:312–316.
- Huang EJ, Liu W, Fritzsich B, Bianchi LM, Reichardt LF, Xiang M. 2001. Brn3a is a transcriptional regulator of soma size, target field innervation and axon pathfinding of inner ear sensory neurons. *Development* 128:2421–2432.
- Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, et al. 2006. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442:533–538.

- Jeon SJ, Oshima K, Heller S, Edge AS. 2007. Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors in vitro for inner ear hair cells. *Mol Cell Neurosci* 34:59–68.
- Karis A, Pata I, van Doorninck JH, Grosveld F, de Zeeuw CI, de Caprona D, Fritsch B. 2001. Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear. *J Comp Neurol* 429:615–630.
- Kiernan AE, Pelling AL, Leung KK, Tang AS, Bell DM, Tease C, Lovell-Badge R, et al. 2005. Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature* 434:1031–1035.
- Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ. 2003. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* 38:17–31.
- Kim WY, Fritsch B, Serls A, Bakel LA, Huang EJ, Reichardt LF, Barth DS, Lee JE. 2001. NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development. *Development* 128:417–426.
- Kondo T, Johnson SA, Yoder MC, Romand R, 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.
- Kozmik Z, Daube M, Frei E, Norman B, Kos L, Dishaw LJ, Noll M, et al. 2003. Role of Pax genes in eye evolution: A cnidarian PaxB gene uniting Pax2 and Pax6 functions. *Dev Cell* 5:773–785.
- Lawoko-Kerali G, Rivolta MN, Holley M. 2002. Expression of the transcription factors GATA3 and Pax2 during development of the mammalian inner ear. *J Comp Neurol* 442:378–391.
- Lawoko-Kerali G, Rivolta MN, Lawlor P, Cacciabue-Rivolta DI, Langton-Hewer C, van Doorninck JH, Holley MC. 2004. GATA3 and NeuroD distinguish auditory and vestibular neurons during development of the mammalian inner ear. *Mech Dev* 121:287–299.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585–595.
- Li H, Liu H, Heller S. 2003. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 9:1293–1299.
- Li H, Liu H, Sage C, Huang M, Chen ZY, Heller S. 2004. Islet-1 expression in the developing chicken inner ear. *J Comp Neurol* 477:1–10.
- Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA, Zhang SC. 2005. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23:215–221.
- Lopez IA, Zhao PM, Yamaguchi M, de Vellis J, Espinosa-Jeffrey A. 2004. Stem/progenitor cells in the postnatal inner ear of the GFP-*nestin* transgenic mouse. *Int J Dev Neurosci* 22:205–213.
- Lumpkin EA, Collis T, Parab P, Omer-Abdalla A, Haerberle H, Chen P, Doetzlhofer A, et al. 2003. Math1-driven GFP expression in the developing nervous system of transgenic mice. *Gene Expr Patterns* 3:389–395.
- Ma W, Fitzgerald W, Liu QY, O'shaughnessy TJ, Maric D, Lin HJ, Alkon DL, et al. 2004. CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in three-dimensional collagen gels. *Exp Neurol* 190:276–288.
- Martinez-Monedero R, Corrales CE, Cuajungco MP, Heller S, Edge AS. 2006. Reinnervation of hair cells by auditory neurons after selective removal of spiral ganglion neurons. *J Neurobiol* 66:319–331.
- Mo ZL, Adamson CL, Davis RL. 2002. Dendrotoxin-sensitive K(+) currents contribute to accommodation in murine spiral ganglion neurons. *J Physiol* 542:763–778.
- Mo ZL, Davis RL. 1997. Heterogeneous voltage dependence of inward rectifier currents in spiral ganglion neurons. *J Neurophysiol* 78:3019–3027.
- Nicholl AJ, Kneebone A, Davies D, Cacciabue-Rivolta DI, Rivolta MN, Coffey P, Holley MC. 2005. Differentiation of an auditory neuronal cell line suitable for cell transplantation. *Eur J Neurosci* 22:343–353.
- Niederreither K, Vermot J, Schuhbaur B, Chambon P, Dolle P. 2000. Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* 127:75–85.
- Oshima K, Grimm CM, Corrales CE, Senn P, Martinez Monedero R, Geleoc GS, Edge A, et al. 2007. Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 8:18–31.
- Radde-Gallwitz K, Pan L, Gan L, Lin X, Segil N, Chen P. 2004. Expression of *Islet1* marks the sensory and neuronal lineages in the mammalian inner ear. *J Comp Neurol* 477:412–421.
- Rask-Andersen H, Bostrom M, Gerdin B, Kinnefors A, Nyberg G, Engstrand T, Miller JM, et al. 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.
- Ray J, Gage FH. 2006. Differential properties of adult rat and mouse brain-derived neural stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 31:560–573.
- Risner JR, Holt JR. 2006. Heterogeneous potassium conductances contribute to the diverse firing properties of postnatal mouse vestibular ganglion neurons. *J Neurophysiol* 96:2364–2376.
- Romand R, Kondo T, Fraulo V, Petkovich M, Dolle P, Hashino E. 2006. Dynamic expression of retinoic acid-synthesizing and metabolizing enzymes in the developing mouse inner ear. *J Comp Neurol* 496:643–654.
- Satoh T, Fekete DM. 2005. Clonal analysis of the relationships between mechanosensory cells and the neurons that innervate them in the chicken ear. *Development* 132:1687–1697.
- Schwarz M, Cecconi F, Bernier G, Andrejewski N, Kammandel B, Wagner M, Gruss P. 2000. Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development* 127:4325–4334.
- Shi F, Corrales CE, Liberman MC, Edge AS. 2007. BMP4 induction of sensory neurons from human embryonic stem cells and reinnervation of sensory epithelium. *Eur J Neurosci* 26:3016–3023.

- Sobkowicz HM, Bereman B, Rose JE. 1975. Organotypic development of the organ of Corti in culture. *J Neurocytol* 4:543–572.
- Song HJ, Stevens CF, Gage FH. 2002. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci* 5:438–445.
- Thompson DL, Gerlach-Bank LM, Barald KF, Koenig RJ. 2003. Retinoic acid repression of bone morphogenetic protein 4 in inner ear development. *Mol Cell Biol* 23:2277–2286.
- Torres M, Gomez-Pardo E, Gruss P. 1996. Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development* 122:3381–3391.
- Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S, Shimazaki T, Chino N, et al. 2005. Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Dev Biol* 278:587–606.
- Wagner E, Luo T, Drager UC. 2002. Retinoic acid synthesis in the postnatal mouse brain marks distinct developmental stages and functional systems. *Cereb Cortex* 12:1244–1253.
- Wurst W, Auerbach AB, Joyner AL. 1994. Multiple developmental defects in *Engrailed-1* mutant mice: An early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* 120:2065–2075.
- Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Kosako H, Nakatomi H, Yamamoto N, Takebayashi H, et al. 2001. Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 21:9814–9823.