

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología



**BASES MOLECULARES DE LAS ACCIONES
DEL IGF-1 EN EL SISTEMA AUDITIVO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Lourdes Rodríguez de la Rosa

Bajo la dirección de los doctores

Isabel Varela Nieto

Julio Contreras Rodríguez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS



**BASES MOLECULARES DE LAS ACCIONES
DEL IGF-1 EN EL SISTEMA AUDITIVO**

TESIS DOCTORAL

Lourdes Rodríguez de la Rosa

Madrid, 2015

A mis padres

A Alberto

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mis directores de tesis la Prof. Isabel Varela Nieto y al doctor Julio Contreras por su dedicación y porque siempre han estado ahí.

A mis compañeros de laboratorio, a los que pasaron y se fueron y a los que estáis. Gracias.

De todos vosotros, grandes y pequeños, he aprendido y con todos he pasado buenísimos momentos, de esos que se atesoran y se recuerdan por mucho tiempo que pase.

Agradecer también la ayuda de dos Servicios muy importantes del IIBM durante el desarrollo de este trabajo. Gracias a la gente de Genómica y a Javi por sus buenas manos.

Gracias a las personas que más quiero. Sin ellos sería posible, pero no tendría sentido.

ÍNDICE

RESUMEN.....	13
ABREVIATURAS.....	15
INTRODUCCIÓN.....	20
1. Anatomía y fisiología del oído en mamíferos.....	21
1.1. Anatomía del oído interno.....	22
1.1.1. El sistema vestibular.....	22
1.1.2. El sistema auditivo.....	23
1.1.2.1. Órgano de Corti.....	23
1.1.2.2. Ganglio auditivo.....	25
1.1.2.3. Pared lateral: ligamento espiral y estría vascular.....	26
1.2. Fisiopatología de la audición.....	26
1.3. Desarrollo del oído interno en vertebrados.....	27
1.4. Fisiopatología de la audición.....	30
2. El sistema IGF.....	33
2.1. Componentes.....	33
2.2. Vías de señalización.....	36
2.2.1. MAP quinasas.....	37
2.2.2. PI3K-Akt.....	38
3. El sistema IGF en el oído interno.....	38
3.1. Genes del sistema y sordera en humanos.....	38
3.1.1. Mutaciones en <i>IGF1</i>	38
3.1.2. Mutaciones en <i>IGF1R</i>	39
3.2. Modelos animales en el estudio de IGF-1.....	40
4. Perspectivas de la terapia con IGF-1 en el tratamiento de la hipoacusia.....	42
OBJETIVOS.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
1. Animales de experimentación.....	53

1.1. Mantenimiento de la colonia de ratones.....	53
1.1.1. Ratones <i>Igf1</i> ^{-/-}	53
1.1.2. Ratones <i>UBC-CreERT2; Igf1</i> ^{fl/fl}	54
1.2. Genotipado de ratones.....	54
1.2.1. Genotipado de ratones <i>Igf1</i> ^{-/-}	54
1.2.2. Genotipado de ratones <i>UBC-CreERT2; Igf1</i> ^{fl/fl}	55
2. Procedimientos analíticos.....	56
2.1. Determinación de los niveles de glucosa.....	56
2.2. Determinación de los niveles de IGF-1.....	56
3. Evaluación de las funciones auditiva y vestibular.....	57
3.1. Estudio de la función auditiva.....	57
3.2. Estudio de la función vestibular.....	58
4. Obtención y procesamiento de las muestras biológicas.....	59
4.1. Obtención de embriones y preparación de las muestras biológicas en estadios tempranos.....	59
4.2. Anestesia y perfusión transcardíaca del ratón.....	59
4.3. Disección del oído interno para estudio morfológico.....	60
4.4. Descalcificación de las muestras.....	60
4.4.1. Bloques y secciones de parafina.....	61
4.4.2. Bloques de congelado y criosecciones.....	61
4.5. Disección del oído medio para el estudio de los huesecillos.....	61
4.6. Disección del oído interno para su posterior aclaramiento.....	61
4.7. Disección de los núcleos cocleares y de la cóclea para estudio de expresión de genes y proteínas.....	62
5. Morfología e Histología.....	62
5.1. Tinciones vitales.....	62
5.2. Inmunohistoquímica.....	63
5.2.1. Tinciones con peroxidasa.....	62
5.2.2. Tinciones con fluorescencia.....	63

5.3. Hibridación <i>in situ</i> en criosecciones.....	65
6. Análisis del transcriptoma de la cóclea.....	66
6.1. Muestra biológica.....	66
6.2. Obtención y purificación de ARN.....	66
6.2.1. Extracción de ARN.....	66
6.2.2. Tratamiento frente a ADNasas.....	67
6.2.3. Purificación de ARN.....	67
6.3. Estudio mediante <i>arrays</i>	67
6.3.1. Hibridación del ARN.....	68
6.3.2. Análisis de datos.....	69
6.3.3. Análisis de factores de transcripción.....	69
6.3.4. PCR en tiempo real.....	69
7. Estudio de la expresión de proteínas.....	72
7.1. Muestra biológica.....	72
7.2. Extracción de proteína total de cóclea.....	73
7.3. Extracción núcleo citoplasma de cóclea.....	73
7.4. <i>Western blotting</i>	73
RESULTADOS.....	
1. Determinación de parámetros bioquímicos y medida de peso corporal en ratones deficientes en <i>Igf1</i> durante el envejecimiento.....	79
2. Estudio de las funciones auditiva y vestibular en ratones deficientes en <i>Igf1</i>	80
3. Estudio comparado de la anatomía del oído medio e interno en ratones deficientes en <i>Igf1</i>	81
4. Disminución de la densidad neuronal del ganglio auditivo asociado a la edad en el ratón <i>Igf1^{+/+}</i> y degeneración de la estría vascular en el ratón <i>Igf1^{-/-}</i>	84
5. Patrón de expresión de <i>Igf1</i> e <i>Igf1r</i> en la cóclea a edades prenatal y postnatal temprana....	89
6. Expresión de genes del sistema IGF y modulación de actividades quinasa en la cóclea del ratón <i>Igf1^{-/-}</i>	92

7. Expresión de genes del sistema IGF en diferentes tejidos del ratón deficiente en <i>Igf1</i> y en la cóclea del ratón deficiente en <i>Igflr</i>	95
8. Identificación de genes expresados de forma diferencial en la cóclea de ratones <i>Igf1^{-/-}</i> a E18,5.....	100
9. Expresión de genes de autofagia en la cóclea de los ratones <i>Igf1^{+/+}</i> e <i>Igf1^{-/-}</i>	
10. La localización intracelular y los niveles de FoxM1 y MEF2 se encuentran regulados en la cóclea del ratón <i>Igf1^{-/-}</i> de manera diferencial.....	110
DISCUSIÓN.....	119
1. Estudio del oído interno del ratón deficiente en <i>Igf1</i> durante el desarrollo tardío.....	121
2. Patrón de expresión espacio-temporal de elementos del sistema IGF en la cóclea durante el desarrollo.....	127
3. Estudio del ratón deficiente en <i>Igf1</i> durante el envejecimiento auditivo.....	129
CONCLUSIONES.....	131
BIBLIOGRAFÍA.....	135
ANEXO.....	169

RESUMEN

Introducción

El factor de crecimiento similar a insulina de tipo 1 (IGF-1), su receptor IGF1R y una serie de proteínas encargadas del transporte y la regulación de la actividad se incluyen dentro del sistema del IGF. La unión del IGF-1 a su receptor de alta afinidad conduce a la fosforilación de los sustratos del receptor de insulina y a la activación de dos vías principales de señalización, la de las MAP quinasas y la de PI3K-Akt. Estas rutas inducen la traslocación de los factores de transcripción al núcleo de la célula, iniciando con ello programas específicos para la expresión de genes.

En el hombre, las mutaciones homocigotas en *IGF1* dan lugar a retraso del crecimiento, microcefalia, déficit intelectual y sordera neurosensorial. La disponibilidad de modelos de ratones transgénicos para el estudio de los elementos del sistema del IGF ha proporcionado información valiosa sobre sus funciones durante el desarrollo. Los ratones deficientes en *Igf1* presentan retraso en el crecimiento, pérdida selectiva de poblaciones de neuronales, hipomielinización y sordera neurosensorial bilateral. El desarrollo coclear postnatal de estos mutantes se encuentra seriamente afectado y presentan una cóclea de menor tamaño, una membrana tectoria inmadura, alteraciones en la sinaptogénesis y una disminución significativa en el número y tamaño de las neuronas auditivas.

Para entender en profundidad la asociación entre el déficit de IGF-1 y la sordera neurosensorial, es importante conseguir un conocimiento más exhaustivo del modelo animal y de los mecanismos moleculares que regulan las acciones del IGF-1 en el oído interno.

Objetivos y materiales

En este estudio se ha utilizado el ratón deficiente en *Igf1* como modelo animal y un primer paso fue caracterizar el modelo mediante distintas técnicas bioquímicas, morfológicas y funcionales.

Se estimó que, debido a la importancia del IGF-1 en la supervivencia y diferenciación celular durante el desarrollo del oído interno, los elementos que componen el sistema podrían tener una expresión espacial y temporal que se regulase durante el desarrollo. El patrón de expresión se estudió en distintos genes del sistema del IGF mediante técnicas de hibridación *in situ* y de PCR en tiempo real, y la activación de las principales rutas involucradas en la señalización del IGF-1 durante el desarrollo del oído interno se estudió mediante electrotransferencia.

Para comprender mejor las bases moleculares de las acciones de este factor y de la sordera neurosensorial asociada a su déficit, se quisieron identificar nuevos genes dianas de IGF-1. Para ello se utilizaron *arrays* en los que se hibridó el ARN procedente de la cóclea de ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* a día embrionario 18.5. El análisis de dicho *array* mediante distintas aproximaciones bioinformáticas nos permitió seleccionar los genes que se encontraban expresados de forma diferencial en la muestra.

Resultados y conclusiones

El estudio del modelo animal ha permitido observar cómo el descenso de los niveles de IGF-1 a lo largo de la vida natural del ratón silvestre va acompañado de un incremento de los umbrales auditivos. El estudio de la morfología coclear en este animal muestra una disminución de la densidad neuronal del ganglio auditivo que coincide en el tiempo con la pérdida auditiva.

El estudio de la expresión celular del IGF-1 y de su receptor de alta afinidad durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano en la cóclea muestra un patrón de expresión complementario entre factor y receptor. Por otra parte, el estudio de los perfiles de expresión génica de distintos elementos del sistema IGF indica que existe una compensación de la deficiencia crónica del IGF-1 por parte de otros elementos del sistema. Esto se observa también en otros órganos estudiados, aunque varían los elementos que puedan estar compensando el déficit de IGF-1.

A nivel molecular, se aprecian alteraciones importantes en el transcriptoma de la cóclea que en conjunto sugieren un retraso en la maduración y diferenciación postnatal.

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ANOVA	Análisis de la varianza
Akt	Proteína quinasa B
α	Alfa
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	Albúmina de suero bovino
β	Beta
CB	Células del borde
CBs	Células basales
CC	Células de Claudius
CCE	Células ciliadas externas
CCI	Células ciliadas internas
Cd	Caudal
CD	Células de Deiter
CI	Células intermedias
CID	Células interdentes
CFI	Células falángicas internas
CH	Células de Hensen
Cit	Citoplasma
CM	Células marginales
cm	Centímetro
Co	Cóclea
CP	Células pilares

CPI	Células pilares internas
Csa	Canal semicircular anterior
Csl	Canal semicircular lateral
Csp	Canal semicircular posterior
Ct	Ciclo umbral
DAB	3, 3'-diaminobencidina
dB HL	Decibelios <i>hearing level</i>
dB SPL	Decibelios <i>sound pressure level</i>
Do	Dorsal
E(nº)	Día embrionario
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
EM	Escala media
ERK1/2	Quinasas reguladas extracelularmente
ESM	Error estándar de la media
EsV	Estría vascular
ET	Escala timpánica
EV	Escala vestibular
FC	<i>Fold change</i>
Fc	Fibrocyto
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FOXO	Factor de transcripción <i>forkhead box O</i>
°C	Grado centígrado
g	Gramo
GA	Ganglio auditivo
GDP	Nucleótido difosfato
GER	<i>Greater epithelial ridge</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>

GSK3	Quinasa glucógeno sintasa 3
GtP	Policlonal de cabra
IGF-1/2	Factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 o tipo 2
IGFBP	Proteínas de unión de alta afinidad del sistema IGF
IGF1R/2R	Receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 ó 2
IR	Receptor de insulina
IRS1/2	Sustrato del receptor de insulina 1 ó 2
JNKs	Proteínas quinasas c-Jun N-terminal
K	Potasio
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
kHz	Kilohercio
LiE	Limbo espiral
LgE	Ligamento espiral
LER	<i>Lesser epithelial ridge</i>
Lt	Lateral
M	Molar
mA	Miliamperio
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MB	Membrana basilar
Md	Medial
mg	Miligramo
ml	Mililitro
MR	Membrana de Reissner
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
MouM	Monoclonal de ratón
MT	Membrana tectoria
multi-mgMOS	<i>multi-chip modified gamma Model for Oligonucleotide Signal</i>

μl	Microlitro
μm	Micra
Na	Sodio
NA	Nervio auditivo
NBT/BCIP	Nitro-azul/5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
NF-κB	Factor nuclear κB
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NIHL	Sordera inducida por ruido
NTF	Neurotrofina
Nuc	Núcleo
OC	Órgano de Corti
OEA	Otoemisiones acústicas
p	Valor p
P(nº)	Día postnatal
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	PBS-Tritón
PBS-Tw	PBS-Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDKs	Quinasas dependientes de fosfolípidos
PEATC	Potenciales evocados auditivos de tronco cerebral
PFA	Paraformaldehído
PH	Homología con plekstrina
PI	Fosfatidil-inositol
PIP3	Fosfatidil-inositol 3, 4, 5 trifosfato
PI3K	Proteína fosfoinositol 3-quinasa
PPLR	<i>Probability of Positive Log Ratio</i>

PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
PUMA	<i>Propagating Uncertainty in Microarray Analysis</i>
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RbP	Policlonal de conejo
rhIGF-1	IGF-1 humano recombinante
RIPA	<i>Radio Immunoprecipitation Assay</i>
RMA	<i>Robust Multi-array Average</i>
Ro	Rostral
RQ	Cuantificación relativa
RT-qPCR	Transcriptasa reversa seguida de PCR en tiempo real
SAPs	Proteínas quinasas activadas por estrés
SDS	Dodecilsulfato sódico
Ser	Serina
SE	Surco externo
SI	Surco interno
TBS	Tampón tris salino
TBS-T	TBS-Tween 20
Thr	Treonina
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRKB/C	Tirosina quinasa B o C
Vo	Ventana oval
Vr	Ventana redonda

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Anatomía y fisiología del oído en mamíferos

El sistema auditivo periférico se compone de tres compartimentos: oído externo, medio e interno. El oído externo se encarga de la percepción del sonido, de forma que los sonidos recogidos por el pabellón auricular son conducidos a lo largo del conducto auditivo externo hasta llegar a la membrana timpánica. La variación de presión sonora recibida por dicha membrana es transformada en energía mecánica en el oído medio y es transmitida y amplificada por la cadena de huesecillos (martillo, yunque y estribo) hasta la membrana que recubre la ventana oval del laberinto óseo. En el oído interno, la vibración genera ondas de presión en la perilinfa de la escala vestibular que se transmiten por resonancia a la membrana basilar. El desplazamiento de la misma produce la estimulación de células muy especializadas capaces de transformar la señal auditiva en un impulso electroquímico que se trasmite al sistema nervioso central a través de las fibras del octavo par craneal o nervio auditivo (figura 1).

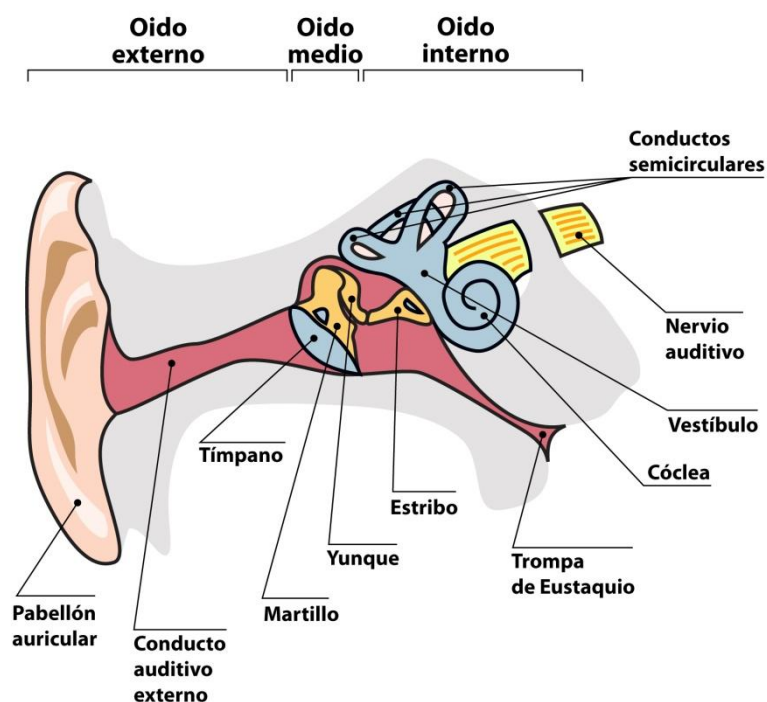


Figura 1. Esquema anatómico del oído. El oído está compuesto de tres partes: i) oído externo, formado por el pabellón auricular y el conducto auditivo externo; ii) oído medio, situado en la cavidad timpánica y compuesto por la cadena de huesecillos y iii) oído interno, formado por la cóclea y el vestíbulo.

1.1. Anatomía del oído interno

El oído interno está constituido por una cápsula ósea ubicada en el hueso temporal llamada laberinto óseo, en cuyo interior se aloja una estructura epitelial cerrada que conforma el laberinto membranoso. El espacio entre ambas estructuras contiene un fluido de composición similar al líquido cefalorraquídeo llamado perilinfa (Merchán Cifuentes, 1983; König et al., 2007). En el interior del laberinto membranoso se encuentra la endolinfa, cuya composición rica en potasio es fundamental para el proceso de transducción que tiene lugar en las células ciliadas. El volumen, la presión y la eliminación de residuos de la endolinfa se encuentran regulados por el saco endolinfático, que es un órgano no sensorial dentro del oído interno (Couloigner et al., 2004).

En el oído interno residen dos órganos sensoriales distintos: el laberinto posterior o vestibular, encargado del equilibrio y la detección de la aceleración, y el laberinto anterior o coclear, del que depende la percepción auditiva.

1.1.1. El sistema vestibular

Se encuentra formado por las cavidades óseas del vestíbulo y los canales semicirculares, en cuyo interior se encuentran las vesículas membranosas del utrículo, el sáculo y los conductos semicirculares. El utrículo recibe a los conductos semicirculares y se encuentra unido al sáculo por otro conducto que se prolonga formando el saco y conducto endolinfáticos. Los canales semicirculares (anterior, posterior y lateral) se encuentran orientados en planos ortogonales entre sí. Estas estructuras contienen células especializadas que van a permitir detectar la aceleración angular.

Tanto el utrículo, situado en el plano horizontal, como el sáculo, orientado en el vertical, poseen un epitelio sensorial diferenciado denominado mácula donde se encuentran las células ciliadas sensoriales y es el lugar de conexión con las terminaciones nerviosas del nervio vestibular. Las células sensoriales de la mácula se recubren de una capa gelatinosa, llamada membrana otolítica, en la que se encuentran depositados cristales inorgánicos de carbonato cálcico que reciben el nombre de otolitos. Estas formaciones maculares permiten que el órgano sea sensible a la aceleración de la gravedad o fuerza gravitatoria.

Cada conducto semicircular membranoso presenta un engrosamiento en uno de sus extremos denominado ámpula. En estos engrosamientos se localizan las crestas ampulares, con forma de cúpula y cubiertas por una membrana gelatinosa, que son zonas altamente especializadas del epitelio donde se encuentran las células sensoriales y de sostén. Las células sensoriales presentan un polo apical ciliado y un polo basal en el que se producen las sinapsis con las fibras nerviosas encargadas de recoger la información y conducirla mediante el nervio vestibular al cerebro donde se integra con el resto de información recibida desde otros órganos

sensoriales. Al igual que las máculas, las crestas ampulares son también epitelios neurosensoriales del sistema vestibular y son las responsables de registrar las aceleraciones angulares (revisado en Holstein, 2012).

1.1.2. El sistema auditivo

El órgano encargado de la audición es el laberinto anterior o coclear y se encuentra formado por una estructura ósea con forma espiral denominada cóclea. La cóclea contiene en su interior una estructura membranosa, también espiral, llamada conducto coclear que se encuentra unida al sáculo. Desde el eje óseo de la cóclea o modiolo se proyecta la lámina espiral ósea de forma longitudinal dividiéndola en dos compartimentos llamados escala vestibular o superior y escala timpánica o inferior que contienen perilinfa. Ambas se encuentran delimitando el conducto coclear o escala media, un espacio en forma triangular relleno de endolinfa, que se puede dividir en distintas regiones según su función, composición celular y localización (figura 2). La escala media se encuentra delimitada por: i) la membrana de Reissner, que la separa de la escala vestibular; ii) la membrana basilar, que la separa de la escala timpánica; iii) la pared lateral formada por el ligamento espiral y la estría vascular y iv) el limbo espiral (figura 3). La membrana de Reissner se inserta por un lado en el limbo espiral, cerca de la zona de inicio de la membrana tectoria, y por el otro, por encima de la estría vascular. Esta membrana no se encuentra vascularizada y está integrada por una doble capa que separa la perilinfa de la endolinfa y funciona como una barrera selectiva del paso de iones regulando el volumen y el balance iónico de los fluidos que la bañan (Raphael y Altschuler, 2003). Sobre la membrana basilar se asienta el epitelio responsable del registro sonoro llamado órgano de Corti y sobre este se apoya la membrana tectoria.

1.1.2.1. Órgano de Corti

El receptor auditivo u órgano de Corti está constituido por un epitelio altamente especializado formado por células ciliadas sensoriales y células de soporte. Hay dos tipos de células ciliadas, internas y externas, organizadas en una y tres filas, respectivamente, que recorren toda la longitud de la cóclea. Las células ciliadas internas son las verdaderas células sensoriales y las responsables de transmitir la información al nervio auditivo. Las células ciliadas externas dotan a la cóclea de una alta sensibilidad al estímulo auditivo y gran especificidad en la codificación de las frecuencias de la onda sonora (Raphael y Altschuler, 2003). Ambos tipos de células ciliadas presentan en su parte apical un penacho de estereocilios dispuestos linealmente en el caso de las células ciliadas internas y en forma de “W” en las externas. La longitud de este último tipo celular y de sus estereocilios aumenta progresivamente desde la base hasta el ápex de la cóclea. En su polo basal las células ciliadas internas poseen

numerosas terminaciones sinápticas, mientras que en las externas la densidad de inervación es mucho menor.

Las células de soporte del órgano de Corti son células epiteliales altamente diferenciadas con diferentes características morfológicas y que se encuentran rodeando a las células ciliadas. La manera en que se organizan los distintos tipos celulares dentro del órgano de Corti es muy específica y, desde la zona medial a la lateral del mismo, se consideran las siguientes células de soporte: i) células del surco interno, células del borde y falángicas internas que rodean a las células ciliadas internas; ii) células pilares internas y externas que separan los dos tipos de células ciliadas y forman el túnel de Corti; iii) células de Deiters sobre las que apoyan las células ciliadas externas y iv) células de Hensen y Claudius (figura 3A). Los cuerpos celulares se encuentran en contacto entre si y descansan sobre la matriz extracelular que constituye la base del epitelio sensorial y las células ciliadas (Forge y Wright, 2002). En el órgano de Corti todas las células están diferenciadas, al contrario de lo que ocurre en otros tejidos epiteliales, no existe una capa de células basales no diferenciadas y esto explica la incapacidad de dicho órgano para regenerarse (Raphael y Altschuler, 2003; Stöver y Diensthuber, 2011).

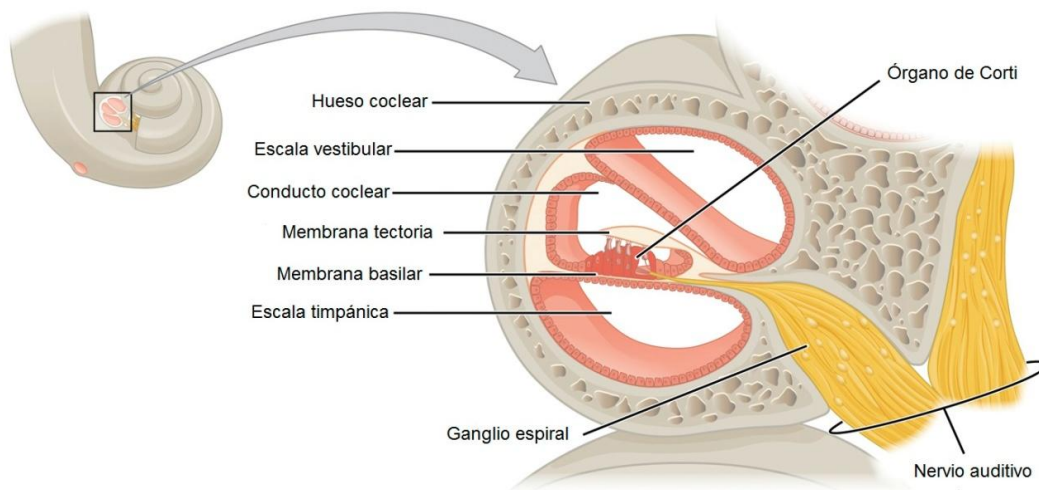


Figura 2. Esquema de un corte transversal en la cóclea y disposición de las distintas escalas en la misma. Adaptado de medicalanatomy.net.

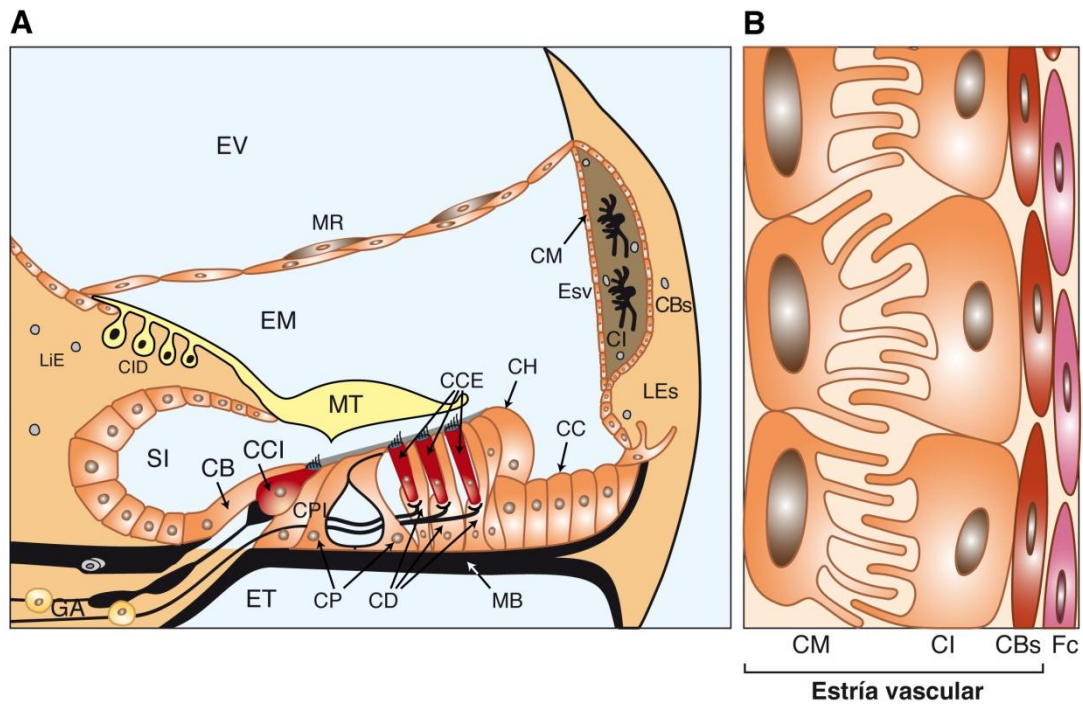


Figura 3. Esquema del conducto coclear o escala media de la cóclea en adulto y detalle de la estría vascular. (A) Esquema de una sección media al modiolo de la cóclea. (B) Detalle de la estría vascular y los distintos tipos de células que la componen. Abreviaturas: CB, células del borde; CBs, células basales; CC, células de Claudius; CCE, células ciliadas externas; CCI, células ciliadas internas; CD, células de Deiter; CH, células de Hensen; CI, células intermedias; CID, células interdientales; CFI, células falángicas internas; CM, células marginales; CP, células del pilar; EM, escala media; EsV, estría vascular; ET, escala timpánica; EV, escala vestibular; Fc, fibrocito; GA, ganglio auditivo; LiE, limbo espiral; LgE, ligamento espiral; MB, membrana basilar; MR, membrana de Reissner; MT, membrana tectoria; SI, surco interno.

1.1.2.2. Ganglio auditivo

El ganglio auditivo o espiral está formado por un conjunto de fibras nerviosas responsables de la innervación aferente del órgano de Corti y que se localizan en el canal de Rosenthal, alrededor del modiolo coclear. Las neuronas cocleares son células bipolares con axones que se proyectan hacia los núcleos cocleares del tronco del encéfalo y proyecciones dendríticas hacia las células ciliadas. La mayoría de las células nerviosas del ganglio auditivo son neuronas de tipo I, mielinizadas y que innervan a las células ciliadas internas, que son los mecanorreceptores de las vibraciones acústicas. Sólo una pequeña proporción de neuronas son de tipo II, no mielinizadas y que se unen a las células ciliadas externas. Las fibras ganglionares hacen sinapsis con las células ciliadas internas y externas de manera diferente. Así, mientras que cada fibra de tipo I hace contacto sináptico con una única célula ciliada interna, que puede ser innervada por 10-30 fibras, en el caso de la fibra de tipo II se conecta con diferentes células ciliadas externas (revisado en Stöver y Diensthuber, 2011).

Las células ciliadas del órgano de Corti también presentan inervación eferente que depende de dos tipos de fibras nerviosas: i) fibras olivococleares mediales, están mielinizadas y van a inervar a las células ciliadas externas mediante sinapsis colinérgica; ii) fibras olivococleares laterales, no mielinizadas y hacen contacto sináptico con neuronas aferentes tipo I del ganglio espiral (Guinan, 2006). La función del sistema eferente es de regulación frente a una estimulación exacerbada o de modulación de la señal tras la sinapsis.

1.1.2.3. Pared lateral: ligamento espiral y estría vascular

El ligamento espiral está constituido en su mayor parte por tejido conectivo, principalmente fibrocitos de tipo I a V, y actúa a modo de lecho capilar con gran importancia en el abastecimiento y drenaje de los fluidos presentes en el oído. El ligamento espiral se ancla a la membrana basilar y podría estar regulando la tensión de la misma gracias a la presencia de fibroblastos ricos en proteínas contráctiles que se encuentran en el tejido (Henson et al., 1984). Otra de las funciones del ligamento espiral está asociada al mantenimiento del balance iónico dentro de la célula mediante un mecanismo asociado a los fibrocitos tipo II, IV y V que bombearían el ion potasio desde la perilinfa y crearían un flujo del mismo hacia los fibrocitos tipo I y las células basales de la estría (revisado en Raphael y Altschuler, 2003).

La estría vascular es una estructura epitelial muy vascularizada que se encuentra en la pared lateral del conducto auditivo y se apoya sobre el ligamento espiral. Es la responsable de la secreción de potasio a la endolinfa y, por tanto, del mantenimiento del potencial endococlear (Patuzzi, 2011). Se encuentra formada por tres capas celulares: i) células marginales organizadas en una monocapa en contacto con la endolinfa; ii) células intermedias constituidas por melanocitos y iii) células basales que constituyen una barrera entre la estría vascular y el ligamento espiral.

1.2. Fisiología de la audición

El conducto coclear contiene un fluido extracelular llamado endolinfa que se caracteriza por su concentración alta en potasio y baja en sodio y calcio, y de cuyo mantenimiento se encarga la estría vascular como ya se ha comentado en el apartado anterior. Esta inusual concentración de iones va a generar un potencial de membrana positivo (de +80 a +100 mV) que es esencial para la transducción del estímulo mecánico sonoro en señales electroquímicas. Dicha transducción es llevada a cabo por las células ciliadas del órgano de Corti. En su parte apical estas células tienen unos estereocilios en los que se produce la transducción mecano-eléctrica y que se encuentran en contacto con la membrana tectoria. Cuando se produce un estímulo auditivo, el estribo situado en el oído medio va a ejercer una presión sobre la ventana oval generando una onda en la perilinfa que se transmite por toda la cóclea, desde la base hasta el ápex, desplazando la membrana basilar sobre la que se apoya el órgano de Corti. Dicho

desplazamiento va a producir el movimiento de los cilios que se encuentran en contacto con la membrana tectoria, la apertura de canales iónicos y la despolarización de la célula por el aumento de los niveles de potasio. Como consecuencia, se produce una liberación de mediadores químicos en las terminaciones nerviosas que se encuentran en contacto con las células ciliadas. El estímulo químico origina una respuesta eléctrica que se propaga desde el ganglio auditivo hasta los núcleos cocleares en el tronco del encéfalo y finalmente a la corteza auditiva (Raphael y Altschuler, 2003; LeMasurier y Gillespie, 2005; König et al., 2007; Moore, 2008).

La cóclea posee una distribución tonotópica de las frecuencias, mantenida desde la base hasta el ápex, debida a la mecánica específica de la membrana basilar y a la existencia de otras diferencias estructurales de las células ciliadas y la membrana tectoria que aparecen entre las distintas regiones de la espiral coclear. Esta selectividad de frecuencias o tonotopía va a permitir a la cóclea disociar sonidos complejos en sus frecuencias puras. Para cada frecuencia, existe una región característica de la membrana basilar que responde de forma específica al estímulo. Así, en función de la localización en la cóclea, las células ciliadas recogen las frecuencias más agudas en la espira basal y las graves en el ápex. Esta organización tonotópica se mantiene en la transmisión del estímulo a la corteza auditiva (Raphael y Altschuler, 2003; Talavage et al., 2004; Ohlemiller y Gagnon, 2007).

1.3. Etapas del desarrollo del oído interno en vertebrados

El desarrollo temprano del oído interno es muy similar entre todos los vertebrados. Las células sensoriales y de soporte del órgano de Corti y las neuronas del ganglio auditivo se desarrollan a partir del ectodermo embrionario en una pequeña área situada a cada lado de la región romboencefálica denominada placoda ótica (figura 4). Las células del ligamento espiral, la cápsula ótica y el modiolo se originan a partir de las células mesenquimales circundantes, mientras que los melanocitos de la estría vascular y las células de Schwann ganglionares se originan de la cresta neural (D'Amico-Martel y Noden, 1983; Chang et al., 2002; Fritsch et al., 2011).

El desarrollo del oído interno en los vertebrados comienza con la especificación de la placoda ótica en el ectodermo superficial. Al avanzar el desarrollo, la placoda ótica se engrosa e invagina para formar la copa ótica, que posteriormente se separa del ectodermo y se cierra formando la vesícula ótica u otocisto durante el día embrionario 9,5 (E9,5). La vesícula ótica es una estructura autónoma transitoria que contiene toda la información necesaria para llevar a cabo el proceso de diferenciación, que conlleva importantes cambios morfológicos y que da lugar a la mayoría de tipos celulares presentes en el oído interno adulto (revisado en Magarinos et al., 2012). Las estructuras vestibulares se desarrollan a partir de la región dorsal de la vesícula

ótica, mientras que el epitelio ventral forma la parte auditiva del oído interno. Los neuroblastos óticos delaminan de la copa y la vesícula ótica para dar lugar el ganglio acústico-vestibular, que contiene los precursores neurales de los ganglios auditivo y vestibular (Hemond y Morest, 1991; Rubel y Fritzschn, 2002). En la vesícula ótica se producen una serie de cambios morfogénicos y procesos de desarrollo que modifican el saco epitelial original originando una estructura tridimensional compleja llamada laberinto membranoso (Kelly y Chen, 2009). Al mismo tiempo, las células mesenquimales circundantes forman una cápsula cartilaginosa que se convertirá en el laberinto óseo (Chang et al., 2002). Mientras que la mayoría de las células ciliadas y de soporte se originan durante el desarrollo embrionario en la cóclea del ratón, en el órgano de Corti se van a dar procesos de desarrollo y maduración postnatales (Lee et al., 2006). En primer lugar, se produce una remodelación anatómica durante la maduración postnatal temprana de la cóclea que conduce a la apertura del túnel de Corti y, casi al mismo tiempo, la membrana tectoria se desprende de las superficies apicales de las células ciliadas y de soporte y se desarrolla la membrana basilar (revisado en Walters y Zuo, 2013).

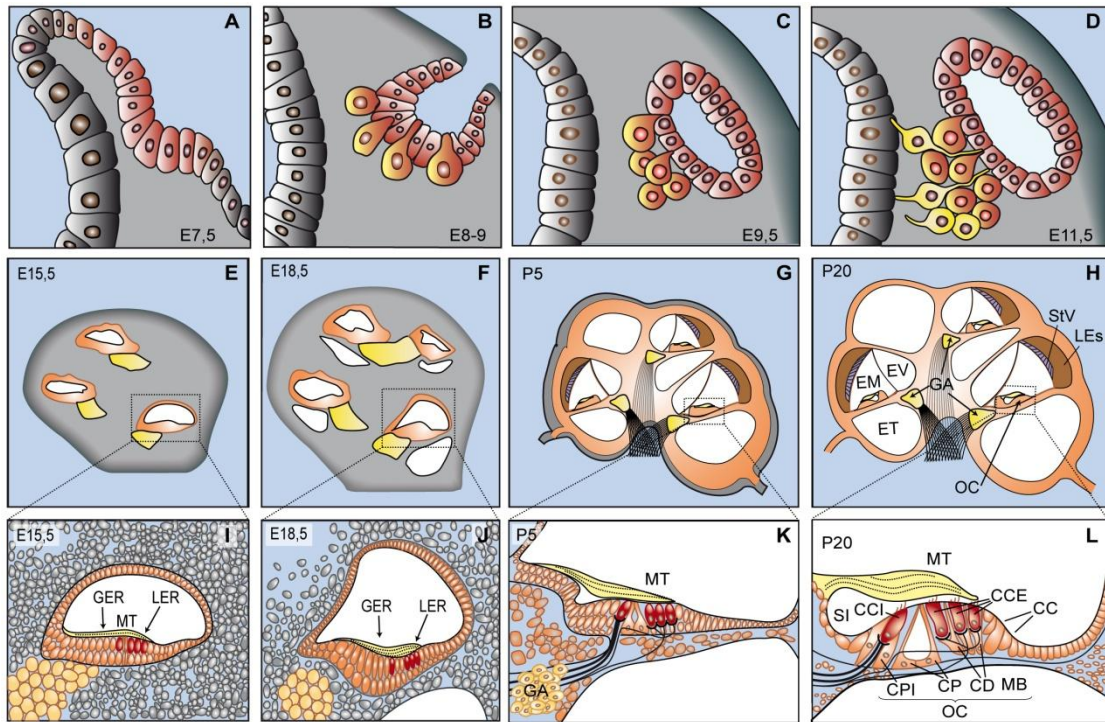


Figura 4. Desarrollo del oído interno ratón. (A) El oído interno se desarrolla a partir de la placoda ótica. (B) La placoda ótica se invagina para formar copa ótica y posteriormente se cierra dando lugar a la vesícula ótica u otocisto (C-D). Se trata de una estructura embrionaria transitoria que sufre cambios morfológicos complejos y procesos de diferenciación celular para generar casi todos los tipos de células que conforman el oído interno adulto, incluyendo las neuronas de los ganglios auditivo y vestibular. Los precusores neuronales delaminan y migran desde el epitelio ventral para formar el ganglio acústico-vestibular (B-D). (E-H) El conducto coclear se escinde a partir de la región ventromedial de la vesícula ótica y junto con el ganglio auditivo (GA) constituye la parte auditiva del primitivo ganglio acústico-vestibular (en amarillo). Este conducto se alarga y crece para formar un tubo en espiral que da lugar a la escala media (EM). Las células mesenquimales que rodean el laberinto diferencian para formar las escalas vestibular (EV) y timpánica (ET). (I-L) El conducto coclear continúa el desarrollo con la especificación de un parche de prosensorial, que más tarde se convertirá en el primitivo órgano de Corti. Las células se reorganizan para formar el *greater epithelial ridge* y *lesser epithelial ridge* (GER y LER) que continuarán el desarrollo para dar lugar a el surco interno (SI), el limbo espiral, las células ciliadas internas (CCI) y externas (CCE) y las células de soporte (K-L). Entre las células de soporte se incluyen las células falángicas internas (CFI), células pilares (CP), células de Deiter (CD) y células de Hensen (CH). Estas células, al igual que las células ciliadas, se encuentran apoyadas sobre la membrana basilar (MB) en la escala media del oído interno. Modificado de Magariños et al., 2013.

1.4. Fisiopatología de la audición

La hipoacusia o sordera es el déficit sensorial más prevalente en niños y adultos y, según el último estudio de la Organización Mundial de la Salud (OMS; <http://www.who.int/topics/deafness/en/>), un 5% de la población mundial, 328 millones de adultos y 32 millones de niños, presentan pérdida auditiva incapacitante. La mayoría de estas personas viven en países en vías de desarrollo donde la consanguinidad aumenta el riesgo de enfermedad recesiva (Koffler et al., 2015). La pérdida auditiva puede comenzar a cualquier edad y con diversos grados de gravedad suponiendo un impacto devastador sobre la calidad de vida. Es especialmente comprometida la hipoacusia infantil que se instaura antes del desarrollo del lenguaje oral, porque impide el proceso espontáneo de adquisición del mismo, complica el desarrollo educativo y también la integración social del niño afectado. La pérdida auditiva en los adultos es mucho más frecuente y suele agravarse con el tiempo, de forma que se tienen que enfrentar problemas de comunicación que pueden conducir, en caso de no resolverse, al progresivo aislamiento del individuo. Otro tipo de hipoacusia especialmente relevante en las últimas décadas es la sordera asociada a trauma acústico, en la que la exposición a ruido puede deberse a causas profesionales o meramente ambientales. Este último tipo de pérdida auditiva supone un problema emergente entre la población más joven por el uso habitual de dispositivos de audio que funcionan insertados en el oído y son utilizados a intensidades altas durante periodos prolongados de tiempo.

De acuerdo con la asociación americana ASHA (*American Speech-Language-Hearing Association*; <http://www.asha.org/public/hearing/Degree-of-Hearing-Loss/>), la audición se puede clasificar en función al grado de pérdida auditiva como: i) ligera cuando se encuentra entre 16 y 25 dB HL (decibelios *hearing level*); ii) leve cuando oscila entre 26 y 40 dB HL; iii) moderada si el rango de pérdida se encuentra entre 41 y 55 dB HL; iv) moderadamente grave si oscila entre 56 y 70 dB HL; v) grave si lo hace entre 71 y 90 dB HL y vi) profunda por encima de 91 dB HL. Por debajo de los 15 dB HL se considera que la audición es normal.

La pérdida de audición puede ser debida a la alteración de cualquiera de los componentes del sistema auditivo y según el tipo de defecto se clasifican como sordera: i) conductiva, cuando el defecto se localiza en el oído externo o medio; ii) neurosensorial, cuando la lesión se sitúa en el oído interno y se subdivide en coclear, si afecta al receptor auditivo, o retrococlear, si afecta a las vías nerviosas y iii) mixta, cuando es una combinación de las dos anteriores. La sordera de tipo conductivo suele conducir a una hipoacusia de leve a moderada que, a menudo, puede ser tratada con fármacos o cirugía, mientras que la sordera neurosensorial habitualmente conduce a una pérdida de audición permanente de severa a profunda y representa la mayoría de los casos de hipoacusia. La mayor parte de este último tipo de sordera en humanos es causada por trastornos cocleares y es más inusual que el defecto auditivo provenga

de daños en el VIII par craneal o en los centros auditivos cerebrales. La sordera neurosensorial es un trastorno de origen muy heterogéneo y que incluye hipoacusias con causa genética, presbiacusia e hipoacusias de otras etiologías. Las hipoacusias hereditarias pueden ser sindrómicas, representan un 30% del total de las formas hereditarias, o no sindrómicas que supone el restante 70%. Estas últimas a su vez se pueden clasificar en función al tipo de herencia en: i) autosómicas recesivas (70-80%); ii) autosómicas dominantes (10-20%); iii) ligadas al cromosoma X (1-2%) y iv) de herencia mitocondrial (0,1%).

Las mutaciones en genes implicados en el desarrollo del oído interno son poco conocidas y una causa de hipoacusia hereditaria infrecuente. El desarrollo temprano del oído, la neurogénesis ótica y la formación de la cóclea se encuentran estrechamente regulados por una compleja red de factores sistémicos y locales que incluyen a las familias del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento similar a insulina (IGF) (revisado en Sánchez-Calderón et al., 2007). Varios miembros de la familia del FGF son esenciales para la organogénesis de la cóclea y por este motivo, mutaciones en alguno de los genes de la familia FGF o simplemente la interrupción de su señalización pueden dar lugar a defectos auditivos. Se han descrito mutaciones de los factores FGF y/o sus receptores en pacientes con pérdida auditiva neurosensorial autosómica recesiva, microtia y microdoncia (Rabsener et al., 2010) o síndrome lácrimo-aurículo-dentodigital (LADD) (Shams et al., 2007, Sensi et al., 2011). El factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT- 4/5) pertenecen a una familia de pequeños factores esenciales para la supervivencia y diferenciación de las células neuronales. BDNF y NT-3 son importantes para el oído interno durante su etapa embrionaria contribuyendo a la supervivencia de las neuronas sensoriales cocleares y vestibulares y al establecimiento de proyecciones nerviosas a los respectivos epitelios sensoriales (Fritsch et al., 2004; Ramekers et al., 2012). Ambos factores tróficos se continúan expresando en el epitelio sensorial del oído interno tras el nacimiento. BDNF se expresa en las células ciliadas y de soporte del órgano de Corti entre los días postnatales 1 y 6 (P1-P6), pero a partir de P10 sólo lo hace en las células de soporte (Wiechers et al., 1999). Durante la etapa postnatal temprana NT-3 se expresa en todas las células del órgano de Corti, aunque en el adulto sólo lo hace en las células ciliadas internas y las de soporte más cercanas (Sugawara et al., 2007). Se ha explorado una posible terapia con BDNF y NT-3 para el tratamiento de la hipoacusia neurosensorial basándose en la supervivencia observada en las neuronas del ganglio auditivo tras la degeneración provocada por ototóxicos en las células ciliadas (Ramekers et al., 2012). Recientemente se ha demostrado que las células de soporte derivadas de NT-3 promueven la recuperación de la función coclear y la regeneración sináptica después de un trauma acústico, poniendo de manifiesto el importante papel de las neurotrofinas

en el mantenimiento de la densidad sináptica y su regeneración después de una lesión (Wan et al., 2014).

El factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1) y su receptor (IGF1R) son esenciales para el desarrollo del oído interno y juegan un papel crítico en la diferenciación y supervivencia de los neuroblastos de varias especies a lo largo de la evolución (Sánchez-Calderón et al., 2007). Su expresión también ha sido descrita en la cóclea postnatal y en el ganglio vestibular, aunque su papel es menos conocido. Las mutaciones homocigotas en el gen que codifica IGF-1 en el hombre causan sordera neurosensorial (revisado por Netchine et al., 2011) similar a la que presentan los ratones mutantes deficientes en *Igf1* (Varela-Nieto et al., 2013). En ellos se ha descrito que presentan una cóclea de menor tamaño y una disminución en el número y tamaño de las neuronas auditivas del ganglio (Camarero et al., 2001; Camarero et al., 2003).

La pérdida de audición en adultos suele deberse más a factores ambientales como ruido, exposición a agentes tóxicos, infecciones o envejecimiento, que a causas genéticas. Es posible que la predisposición de cada individuo sea un reflejo de las interacciones entre factores ambientales y genéticos, pero de momento se han descrito pocos genes asociados a estas complejas situaciones. La pérdida auditiva inducida por ruido (NIHL) es la segunda forma más común de hipoacusia neurosensorial, después de la pérdida de audición asociada a la edad o presbiacusia. Las consecuencias de la exposición al ruido son variables en función de factores como el tipo de ruido, la intensidad del mismo, la cronicidad y la susceptibilidad individual. Actualmente no se dispone de medicamentos específicos para prevenir la NIHL y además el desarrollo de un tratamiento eficaz se ha visto obstaculizado por la compleja matriz de vías celulares y moleculares involucradas en este tipo de hipoacusia. Uno de los mecanismos asociados a este tipo de sordera es la formación de radicales libres mitocondriales debido a la intensa actividad metabólica inducida por el ruido en la cóclea (Henderson et al., 2006). La importancia de esta vía en la NIHL se ha visto reforzada por tres evidencias: i) se ha observado un aumento de radicales libres en la estría vascular, células ciliadas externas, células de soporte y en el ganglio espiral (Ohlemiller, 2006); ii) la disminución en los niveles de antioxidantes endógenos como la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa aumenta la susceptibilidad al ruido (McFadden et al., 2001) y iii) el aporte de antioxidantes atenúa la NIHL (McFadden et al., 2005). Además existen otras dos vías adicionales que han sido relacionadas con la NIHL que son la alteración en la homeostasis del calcio (Park et al., 2008) y la ruta de señalización de los glucocorticoides. Esta última ya se utiliza en clínica para tratar la pérdida auditiva en distintos trastornos como los generados por acúfenos o el Síndrome de Meniere entre otros (Trune y Canlon, 2012).

El aumento de la esperanza de vida en los países desarrollados ha hecho de la pérdida auditiva asociada al envejecimiento un grave problema médico. La presbiacusia o sordera asociada a la edad (ARHL) es un proceso multifactorial que se ve influenciado por procesos de estrés oxidativo que gradualmente conducen a la pérdida de potencial endococlear y a la degeneración de importantes elementos del sistema auditivo como el órgano de Corti, la estraía vascular y las neuronas cocleares (Frisina, 2009; Roth, 2015).

La administración de determinados fármacos ototóxicos, principalmente aminoglucósidos y agentes para quimioterapia, puede conducir a una grave pérdida de audición neurosensorial bilateral que va acompañada de degeneración permanente de las células ciliadas y las neuronas auditivas, y que también presenta un componente genético. Los efectos patológicos que tanto aminoglucósidos como cisplatino producen en el órgano de Corti son muy similares. Generalmente son las células ciliadas externas las más susceptibles al daño y se ven afectadas desde la base de la cóclea hasta su ápex de una forma gradual. Este patrón conduce a una pérdida de auditiva inicial de las altas frecuencias, seguida de una pérdida progresiva de las frecuencias bajas. Además, los fármacos inducen otra serie de daños colaterales que se inicia con la muerte de la fila mas interna de células ciliadas externas y continúa con la de la segunda y tercera fila según progresa la lesión. Las células ciliadas internas son más resistentes y habitualmente sólo desaparecen cuando no quedan células ciliadas externas a su alrededor (revisado en Schacht, 2012).

2. El sistema IGF

El sistema del factor de crecimiento similar a insulina juega un papel fundamental durante el desarrollo embrionario y posteriormente en el crecimiento y en la homeostasis metabólica. Este sistema ejerce su acción en procesos celulares como los de proliferación, supervivencia, migración celular y diferenciación.

2.1. Componentes

La familia de la insulina está integrada por tres ligandos (insulina, IGF-1 e IGF-2) y sus receptores celulares que son el receptor de insulina (IR), los receptores de IGF-1 e IGF-2 (IGF1R, IGF2R) y los receptores híbridos IGF1R/IR (Federici et al., 1997). Las interacciones entre factor y receptor y la biodisponibilidad de IGF-1 e IGF-2 se encuentran moduladas por un grupo de seis proteínas transportadoras de alta afinidad (IGFBP1-6) y por proteasas específicas (figura 5A).

La insulina se produce en las células β del páncreas y se distribuye de forma endocrina por la sangre al resto del organismo, mientras que IGF-1 e IGF-2 son principalmente generados en el hígado y su producción se encuentra estimulada por la hormona de crecimiento. La forma activa de la insulina es un monómero compuesto por dos dominios polipeptídicos, un dominio A

de 21 aminoácidos y un dominio B de 30 aminoácidos que se unen por dos puentes disulfuro (Hua et al., 2006). La insulina adquiere su forma activa mediante procesamiento proteolítico a partir de la molécula de pre-proinsulina (110 aminoácidos). Los ligandos IGF-1 e IGF-2 son polipéptidos pequeños (7-8 kDa) de cadena sencilla constituidos por 70 y 67 aminoácidos respectivamente y producidos a partir de pre-propéptidos de forma similar a la insulina (Foulstone et al., 2005). En su forma activa, ambos están constituidos por cuatro dominios: la cadena A (21 aminoácidos) y la cadena B (29 aminoácidos) son homólogas a las de la molécula de insulina, el dominio C (12 aminoácidos) es análogo al péptido C de la proinsulina y el péptido carboxilo terminal o cadena D no tiene equivalente en la insulina (De Wolf et al., 1996; O'Dell y Day, 1998). Las formas inmaduras de IGF-1 e IGF-2 tienen además una región E en el extremo carboxilo terminal que se elimina antes de ser secretados los factores. IGF-2 comparte casi un 50% de homología con la insulina y un 70% con IGF-1.

Tanto IGF-1 como IGF-2 e insulina pueden unirse con distinta afinidad a IGF1R, receptor transmembrana tirosina quinasa, que comparte homología estructural y funcional con el IR (revisado en Sachdev y Yee, 2007). Sin embargo, IGF-1 posee una afinidad dos veces mayor por IGF1R que por IR y, por lo tanto, la mayor parte de los efectos debidos a IGF-1 derivan de la activación de IGF1R. Insulina e IGF-2 presentan una afinidad varias veces menor, 100 y 6 respectivamente, en su unión a IGF1R cuando se compara con la afinidad que tiene IGF-1 (revisado en Annunziata et al., 2010). El IGF1R es una proteína tetramérica compuesta de dos subunidades α , que contienen dominios de unión extracelular para IGF y dos subunidades β con un dominio intracelular para proteínas tirosina quinasa con un papel fundamental en la ruta de señalización posterior (figura 5B). Las subunidades β se encuentran unidas a las subunidades α mediante puentes disulfuro y son proteínas transmembrana. El dominio catalítico tirosina quinasa de IGF1R contiene tres sitios tirosina (Y1131, Y1135 e Y1136), homólogos a los del receptor de insulina, y cuya fosforilación contribuye a la activación de IGF1R (Gronborg et al., 1993). Este dominio se encuentra flanqueado por dos regiones reguladoras: i) una región juxtamembrana importante en la unión de sustratos del receptor de insulina (Shc/IRSs) y ii) un dominio carboxilo terminal con sitios de unión para fosfotirosina (Adams et al., 2000; De Meyts y Whittaker, 2002).

IGF-2 se une además a IGF2R, receptor manosa-6-fosfato catión-independiente, que es una glicoproteína transmembrana con diferentes dominios estructurales (amino-terminal, extra-citoplasmático, transmembrana y carboxilo terminal) pero sin actividad tirosina quinasa (Morgan et al., 1987). La insulina no tiene afinidad de unión al IGF2R, e IGF-1 se une con mucha menor afinidad que IGF-2 (Hawkes y Kar, 2004). La unión de IGF-2 a este receptor conduce al secuestro y posterior degradación del factor por los lisosomas e, indirectamente, a la regulación de la concentración extracelular del mismo (Ghosh et al., 2003).

El receptor de insulina (IR) es una proteína heterotetramérica muy similar al de IGF1R. La capacidad de ambos receptores para autofosforilarse y fosforilar sustratos intracelulares es clave en las vías de señalización del sistema IGF. En el hombre IR posee dos isoformas generadas por procesamiento alternativo, la isoforma A (IR-A) y la B (IR-B), que difieren en la presencia (IR-B) o ausencia (IR-A) de 12 aminoácidos localizados en el extremo C-terminal de la subunidad α (Denley et al., 2003). IR-A puede ser estimulado tanto por insulina como por IGF-2, pero cuando lo hace este último, produce un efecto mitogénico aumentando la supervivencia, motilidad y capacidad invasiva de las células cancerosas (Belfiore, 2007). Por el contrario, IR-B es activado únicamente por la insulina y es responsable de mantener la homeostasis de la glucosa.

El sistema IGF posee receptores híbridos formados por una hemimolécula de IGF1R y una de IR. Los híbridos entre IGF1R e IR-A tienen igual afinidad para IGF-2 e insulina, mientras que los formados entre IGF1R e IR-B tienen mayor afinidad por IGF-1. La unión del ligando a este tipo de receptor va a dar lugar a una respuesta celular similar a la producida por la unión a IR o IGF1R e induce la actividad tirosina quinasa (Pandini et al., 2002). Aún no está bien definido el papel fisiológico específico que pueden desempeñar los receptores híbridos dentro del sistema IGF (Beauchamp et al., 2010).

La actividad de los IGF se encuentra regulada por una familia de proteínas transportadoras (IGFBP) con alta afinidad de unión por ellos. Se han aislado y caracterizado seis IGFBP tanto en el hombre como en otras especies de vertebrados (Baxter, 2000). Estas IGFBP comparten homología de secuencia y tienen una organización común con tres dominios independientes. Los dominios conservados N y C-terminal, ambos ricos en cisteína, participan en la unión a IGF (Firth y Baxter, 2002). El dominio central de las IGFBP es variable y en él tienen lugar la mayoría de las modificaciones post-traduccionales y proteólisis (Bunn y Fowlkes, 2003), así como para su unión a la subunidad ácido lábil (ALS) y a la matriz extracelular (Firth y Baxter, 2002). Las IGFBP se producen en diferentes tejidos y, por lo tanto, se van a encontrar en distintos fluidos biológicos. En los tejidos, las IGFBP se encuentran formando complejos binarios IGF-IGFBP en los que IGF-1 e IGF-2 aparecen unidas a las distintas IGFBP. En la circulación, sin embargo, aparecen como complejos ternarios compuestos por el ligando, la IGFBP (IGFBP-3 o IGFBP-5) y la glicoproteína ALS (Twigg et al., 1998; Baxter, 2000). Este último tipo de complejo incrementa de forma significativa la vida media circulante de los factores, desde minutos hasta horas, al impedirle atravesar la barrera endotelial del capilar (Boisclair et al., 2001; Clemmons, 2007). Por tanto, dependiendo del contexto fisiológico, las IGFBP pueden ejercer acciones muy diferentes. Son capaces de prolongar la vida media de los factores del sistema IGF modulando su biodisponibilidad y actividad, y también de inhibir de forma competitiva la unión de los mismos a sus receptores.

Además, las acciones de las IGFBP se encuentran reguladas por una serie de proteasas específicas de IGFBP que, mediante su acción proteolítica, controlan indirectamente la biodisponibilidad del IGF-1, puesto que los fragmentos originados tras la degradación de las IGFBPs se unen con poca o ninguna afinidad a IGF-1 (Maile y Holly, 1999). Cuatro de las IGFBP (IGFBP2-5) se expresan siguiendo patrones específicos y complementarios durante el desarrollo coclear. Estos datos sugieren que las IGFBP pueden actuar, en función del tipo celular, regulando de manera muy precisa la activación de la señalización del sistema IGF durante el desarrollo de la cóclea y contribuyendo a la diferenciación en la cóclea (Okano y Kelley, 2013).

La ALS es una glicoproteína de 85 kDa que se produce casi exclusivamente por el hígado y es secretada a la circulación. Hasta el momento no ha habido demasiadas evidencias que indiquen que la ALS tenga más funciones aparte de su papel, anteriormente descrito, en la prolongación de la vida media de los complejos IGF-IGFBP. La deficiencia en el hombre de *IGFASL* (OMIM 601488), asociada a baja estatura, insensibilidad a la hormona de crecimiento y bajos niveles de IGF-1 e IGFBP-3, proporciona una idea de la importancia de la formación de dichos complejos. Sin embargo, recientemente se ha descrito que el ortólogo de la ALS en la mosca, *Drosophila dALS*, está implicado en la regulación del metabolismo de carbohidratos y grasas. En los ratones mutantes deficientes en *Igfals* aumenta la sensibilidad a insulina y presentan un crecimiento postnatal atenuado (Haluzik et al., 2003) y la deficiencia en el hombre parece sugerir una alteración en el metabolismo de carbohidratos (revisado en Domené et al., 2011).

Por último, se han estudiado las diferencias en la secuencia entre insulina, IGF-1 e IGF-2 con el objeto de identificar residuos importantes en la interacción de estos factores con IGF1R, IGF2R y las IGFBP, y poder asociar el papel de esos residuos concretos a funciones específicas de los factores del sistema IGF. En este sentido, el cambio de una valina a metionina en el residuo 44 del gen *IGF1* disminuye de forma drástica la afinidad de este por IGF1R y conduce a retraso mental y del crecimiento, así como a sordera en el hombre (Denley et al., 2005). Mientras que la sustitución de arginina por glutamina en el residuo 36 tiene un efecto mucho menos grave (Netchine et al., 2009; Rajapaksha et al., 2012).

2.2. Vías de señalización

La unión del IGF-1 al dominio extracelular de las subunidades α del IGF1R produce un cambio conformacional de las subunidades β produciendo la autofosforilación de los residuos tirosina quinasa (Y1131, Y1135, Y1136) en el dominio catalítico del receptor (Le Roith, 2000), y la posterior fosforilación de los sustratos del receptor de insulina (IRS1-4). Los sustratos del receptor de insulina (IRS) fosforilados van a actuar como proteínas adaptadoras de otras

moléculas con dominios SH2, tales como la proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 2 (Grb2) o la subunidad p85 de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), y en último término hacen posible la activación de distintas vías de señalización intracelular (figura 5A).

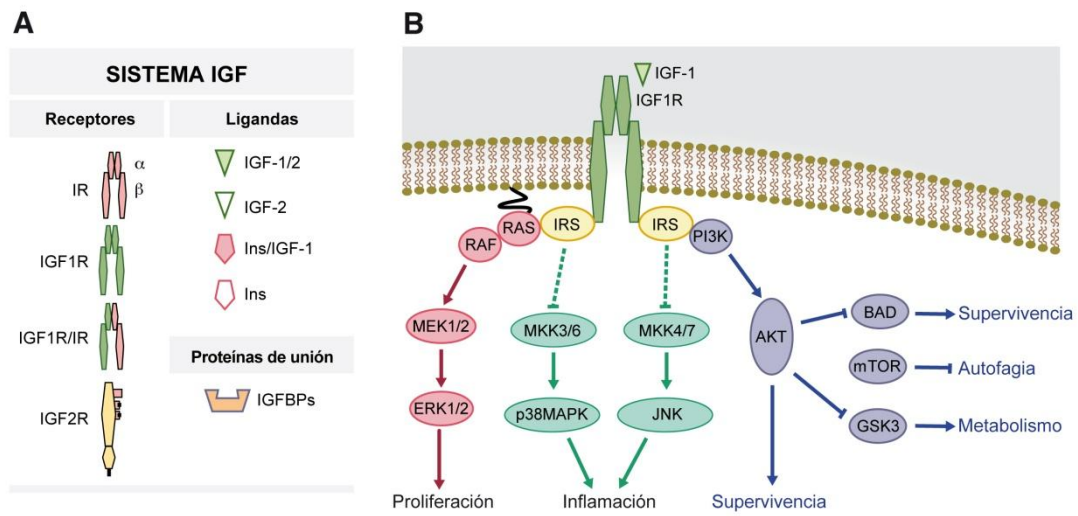


Figura 5. Sistema IGF. A) Componentes del sistema IGF. B) Principales rutas de señalización reguladas por el IGF-1.

2.2.1. MAP quinasas

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son una familia de proteínas quinasas de tipo serina/treonina altamente conservadas entre eucariotas e implicadas en procesos de crecimiento, supervivencia y diferenciación celular (Seger y Krebs, 1995; Kyosseva, 2004). Se han identificado diferentes MAPKs, aunque las mas estudiadas son: i) la familia de quinasas reguladas extracelularmente (ERK) que responden al estímulo de factores de crecimiento y otros mitógenos y que a su vez se subdivide en las MAPKs clásicas (ERK1/p44 y ERK2/p42) y las MAPKs grandes (ERK3, ERK5, ERK7 y ERK8); ii) las proteínas quinasas activadas por estrés o quinasas c-Jun N-terminal (SAPK/JNK); y iii) las p38 MAPKs que se inducen por distintos tipos de estrés como radiación (ultravioleta o gamma), hipoxia, estrés oxidativo y diferentes citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF α) (Kyriakis y Avruch, 2001; Vardatsikos et al, 2009).

Tras la activación de IGF1R y sus sustratos, la ruta de señalización se inicia cuando la proteína Grb2, en asociación con un factor de intercambio de nucleótidos como SOS, va a permitir la liberación de un nucleótido difosfato (GDP). El GDP se une a la proteína Ras-GDP inactiva que se encuentra asociada a la membrana plasmática dentro del citoplasma para formar Ras-GTP activa (Downward, 2003; LeFloch et al., 2009). Como consecuencia, se va a producir un cambio conformacional de la proteína y la activación de diferentes proteínas efectoras, entre las que se encuentran las distintas isoformas de la quinasa serina/treonina Raf (MAPKKK) que

fosforila y activa MEK (MAPKK). Esta cascada de señales resulta en la activación de ERK1/2, JNK1/2/3 y p38 MAPKs (figura 5B). Mientras que la ruta de señalización de ERK1/2 está implicada en la proliferación y diferenciación celular, la activación vía TNF α de las cascadas de señalización de JNK y p38 MAPKs promueve acciones inflamatorias (Wajant et al., 2003).

2.2.2. PI3K-Akt

Constituye una segunda vía de señalización mediada por la activación de IGF1R y la consiguiente fosforilación de los IRS. La unión de IRS1 a la proteína PI3K mediante su subunidad p85 reguladora permite la activación de la subunidad p110 catalítica. Esta última va a ser la encargada de fosforilar lípidos como el fosfatidil-inositol (PI) y generar formas trifosforiladas como el fosfatidil-inositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP3) (Shepherd et al, 1998; Kanzali, 2006). El PIP3 puede unirse al dominio amino terminal con homología a plekstrina (PH) de PKB/Akt y facilitar su fosforilación en los residuos Thr308 y Ser473 por quinasas dependientes de fosfolípidos (PDKs). Una vez activada, PKB/Akt puede fosforilar distintas dianas celulares: i) BAD, un miembro de la familia Bcl-2, inhibiendo la apoptosis; ii) GSK3 (quinasa glucógeno sintasa 3), inhibiendo la supresión de glucógeno sintasa; iii) FOXO (factor de transcripción *forkhead box O*), modificando su regulación transcripcional y la salida del núcleo con posterior ubiquitinilación y degradación en el citoplasma y iv) mTOR (revisado en Siddle, 2011) (figura I5B). PKB/Akt promueve la disociación del complejo hamartina-tuberina (TSC1/2) mediante la fosforilación de la tuberina (TSC2). El objetivo principal del complejo TSC1/2 es inhibir a mTOR, un elemento regulador del crecimiento celular. El complejo TSC1/2 mantiene inactivado a mTOR mediante un mecanismo que implica a Rheb, una GTPasa de la familia de las RAS o pequeñas GTPasas. Puesto que mTOR necesita de Rheb-GTP para su funcionamiento, el complejo TSC1/2 mantiene a Rheb unida a GDP, una forma de menor energía. La regulación negativa de TSC1/2 por parte de PKB/Akt supone la activación de la vía de señalización de mTOR, que fosforila a la quinasa S6 (S6K) estimulando la síntesis proteica ribosomal necesaria para el crecimiento y la proliferación celular (revisado en Taniguchi et al., 2006). En resumen, Akt tiene un papel relevante en distintos eventos celulares como son la supervivencia y la regulación metabólica a distintos niveles que incluyen: i) el control del estado redox, ii) la respuesta metabólica a nutrientes, iii) la regulación de la autofagia; y iv) la de la síntesis de proteínas.

3. El sistema IGF en el oído interno

3.1. Genes del sistema y sordera en humanos

Los principales defectos moleculares en el sistema IGF se producen por mutaciones en el gen *IGF1* o en su receptor de alta afinidad *IGF1R*.

3.1.1. Mutaciones en *IGF1*

Las mutaciones homocigotas del gen *IGF1* son muy poco comunes y hasta el momento se han descrito únicamente cinco casos (Woods et al., 1996; Bonapace et al., 2003; Coutinho et al., 2007; Walenkamp et al., 2005 y 2007; Netchine et al., 2009). Las características que los pacientes presentaban en común eran un retraso severo del crecimiento intrauterino y cierto grado de microcefalia. En tres de los cinco casos se describió una pérdida de audición entre grave y profunda. El primero de ellos se debía a una delección parcial en homocigosis de *IGF1* y las manifestaciones clínicas del paciente fueron un retraso del crecimiento prenatal y postnatal, discapacidad intelectual y sordera neurosensorial (Woods et al., 1996). El segundo caso presentaba una mutación puntual en la región E del precursor de IGF-1 y presentaba baja talla, retraso en el desarrollo psicomotor y sordera neurosensorial (Bonapace et al., 2003). En el último caso descrito las alteraciones se debían a una mutación puntual sin sentido y el paciente manifestaba retraso en el crecimiento intrauterino y postnatal, microcefalia y sordera neurosensorial (Walenkamp et al., 2005). En el último caso, el fenotipo del paciente era más leve que en el resto. La mutación encontrada en el gen *IGF1* permitía la síntesis de IGF-1, aunque la afinidad del factor por su receptor era menor a la habitual. Mediante un exhaustivo test auditivo se comprobó que presentaba una audición normal (Netchine et al., 2009).

Las mutaciones en heterocigosis del gen *IGF1* se han asociado a un descenso moderado de la estatura, pero no se ha descrito pérdida de audición en estos pacientes (van Duyvenvoort et al., 2010; Fuqua et al., 2012). Recientemente se ha publicado un caso de deficiencia parcial de IGF-1 que presentaba retraso en el crecimiento prenatal y postnatal y microcefalia, pero el retraso en el desarrollo era leve y los test de audición normales (Van Duyvenvoorde et al., 2010).

3.1.2. Mutaciones en *IGFIR*

Las mutaciones en *IGFIR* se caracterizan por la resistencia a IGF-1 que conduce a una alteración del crecimiento fetal y postnatal. En el hombre se han descrito varios casos de mutaciones en heterocigosis del gen (Abuzzahab et al., 2003; Kawashima et al., 2005; Raile et al., 2006; Walenkamp et al., 2006; Inagaki et al., 2007; Kruis et al., 2010; Wallborn et al., 2010; Choi et al., 2011) y únicamente dos casos de mutaciones homocigotas de *IGFIR*. En la primera de ellas se describía un fenotipo más grave caracterizado por retraso en el crecimiento intrauterino y postnatal, microcefalia, dimorfismo facial, malformaciones cardíacas y resistencia a insulina (Gannage-Yared et al., 2013). Puesto que todos los mutantes nulos de *Igflr* morían al nacer de fallo respiratorio (Liu et al., 1993), los autores explicaron la supervivencia del paciente porque presentaba una mutación hipomorfa por pérdida de función, en la que el gen conservaría algo de actividad, y la situación de homocigosidad genética sería compatible con la vida (Gannage-Yared et al., 2013). La segunda mutación homocigota del gen *IGFIR* se ha asociado

con las características clínicas del Síndrome SHORT, además de con retraso en el desarrollo, defectos en el sistema nervioso central y niveles altos de IGF-1 (Prontera et al., 2015). El Síndrome SHORT (OMIM269880; ORPHA3163) es una enfermedad rara caracterizada por baja estatura, híper-extensibilidad de las articulaciones y/o hernia inguinal, depresión ocular, anomalía de Rieger, retraso en la dentición y sordera neurosensorial en el 25% de los afectados por este síndrome (revisado por Innes y Dymont, 2014). También se ha descrito pérdida auditiva en mutaciones en heterocigosis de *IGF1R* cuando la delección afecta al gen completo (Ester et al., 2009).

3.2. Modelos animales en el estudio de IGF-1

La utilización de modelos animales ha contribuido en los últimos años a una mayor comprensión de las bases genéticas y moleculares de la audición. Distintos autores han descrito que la deficiencia de IGF-1 causa importantes alteraciones en el oído interno de especies tan diversas como el pez cebra (Schueter et al., 2007), el pollo (Camarero et al., 2003), la rata (Zheng et al., 1997) y el ratón (Camarero et al., 2001, 2002; Cediell et al., 2006). Desde la secuenciación del genoma del ratón en el año 2002, este modelo animal se ha convertido en el más utilizado en el laboratorio para estudios genómicos. Sin embargo, hay que tener en cuenta las diferencias frente al hombre en su rango auditivo y su respuesta inmune entre otras (Leibovici et al., 2008; Ohlemiller et al., 2009).

Se han generado modelos transgénicos de ratón dirigidos al estudio de mutaciones asociadas a pérdida de audición previamente descritas en el hombre, o para identificar mediante el tratamiento con diferentes agentes mutagénicos nuevos genes. En los ratones modificados genéticamente la función auditiva se ha estudiado mediante distintos abordajes técnicos: i) el análisis de los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC) y las otoemisiones acústicas (OEA) para valorar la función; ii) el potencial endococlear para medir la fisiología; iii) la hibridación in situ que informa sobre la morfología; iv) la técnica de *patch-clamp* (Sakmann y Neher, 1983) que informa sobre electrofisiología celular; y v) el estudio de patrones de expresión (Willott, 2006; Hardisty-Hughes et al., 2010) que da información molecular.

En la actualidad hay disponibles modelos animales con mutaciones en distintos componentes de la vía de señalización de IGF-1 y que pueden ser utilizados para estudiar los efectos del déficit del factor en el desarrollo del oído interno. En el caso del ratón, existen líneas modificadas genéticamente con mutaciones en los factores (IGF-1 y 2), el receptor (IGF1R, IGF2R e IR) y las proteínas de unión de alta afinidad del sistema IGF (IGFBP). En bases de datos como la de *Mouse Genome Informatics* (<http://www.informatics.jax.org>) es posible encontrar información detallada sobre el tipo de mutación, el fondo genético y el fenotipo que presenta cada una de las líneas. La mayoría de los ratones mutantes del sistema IGF presenta un

fenotipo que incluye alguna de las siguientes características: aumento de la mortalidad, envejecimiento prematuro, déficit en el crecimiento, talla baja, infertilidad, cambios endocrinos, anomalías músculo-esqueléticas y alteraciones neurales. En el sistema nervioso los ratones transgénicos con una elevada expresión de IGF-1 presentan un aumento del tamaño neuronal y menor apoptosis, mientras que los ratones deficientes en *Igf1* tienen un menor tamaño cerebral, pérdida selectiva de poblaciones neuronales, hipomielinización y disminución de la velocidad de conducción periférica (Powell-Braxton et al., 1993).

Se han descrito alteraciones auditivas en el ratón deficiente en el gen *Igf1* (*Igf1^{tm1Arge}*, MGI: 1926485) que se generó mediante delección de una parte del exón 4 y la inserción en su lugar de un gen de resistencia a neomicina (Liu et al., 1993; Cediél et al., 2006). El ratón mutante homocigoto deficiente en *Igf1* y mantenido en un fondo genético híbrido (129SvEv*MFI), presenta retraso en el desarrollo del oído interno, cambios en la morfología coclear y en la innervación celular, degeneración del ganglio auditivo y aumento de la apoptosis neural (Camarero et al., 2001 y 2002) (figura 6). Como resultado, los ratones *Igf1^{-/-}* presentan desde el nacimiento una sordera neurosensorial bilateral profunda. Por otro lado, tanto la cóclea como la vía auditiva central presentan una pérdida de mielinización que da lugar a un retraso en las latencias de las respuestas obtenidas del tronco cerebral auditivo (Cediél et al., 2006). La deficiencia en IGF-1 va a producir apoptosis dependiente de caspasa 3 en las neuronas del cerebro y la cóclea (Sánchez-Calderón et al., 2007). Además de las alteraciones auditivas, los ratones *Igf1^{-/-}* presentan otros déficits sensoriales en las funciones olfatoria y visual (Vicario-Abejón et al., 2003; Otaegui et al., 2006; Scolnick et al., 2008; Hurtado-Chong et al., 2009; Varela-Nieto et al., 2013).

Como ya se ha comentado anteriormente, los ratones nulos *Igf1r* mueren poco después del nacimiento debido a una insuficiencia respiratoria causada por problemas de desarrollo en los músculos intercostales y el diafragma. Estos ratones presentan múltiples alteraciones que afectan al desarrollo óseo embrionario e incluyen hipoplasia muscular o retraso en la osificación entre otras (Baker et al., 1993; Liu et al., 1993). Además se encuentra afectado el desarrollo del oído interno donde se ha descrito un acortamiento del conducto coclear, retraso en el desarrollo y diferenciación de las células ciliadas y defectos vestibulares (Okano et al., 2011). Debido a la muerte temprana de los ratones no ha sido posible un análisis del oído interno postnatal y de la función auditiva en estos animales.

Los ratones mutantes con alteraciones en la expresión de las diferentes IGFBP han generado fenotipos poco marcados, en parte compensados por otras IGFBP, y que no han aportado información específica sobre el papel de cada una de ellas en el contexto biológico. En general el aumento de su expresión conduce a una disminución en la biodisponibilidad y

alteraciones en la formación del hueso, aunque no se han llevado a cabo estudios de la función auditiva (Eckstein et al., 2002; Silha et al., 2003; Salih et al., 2005; Ben Lagha et al., 2006).

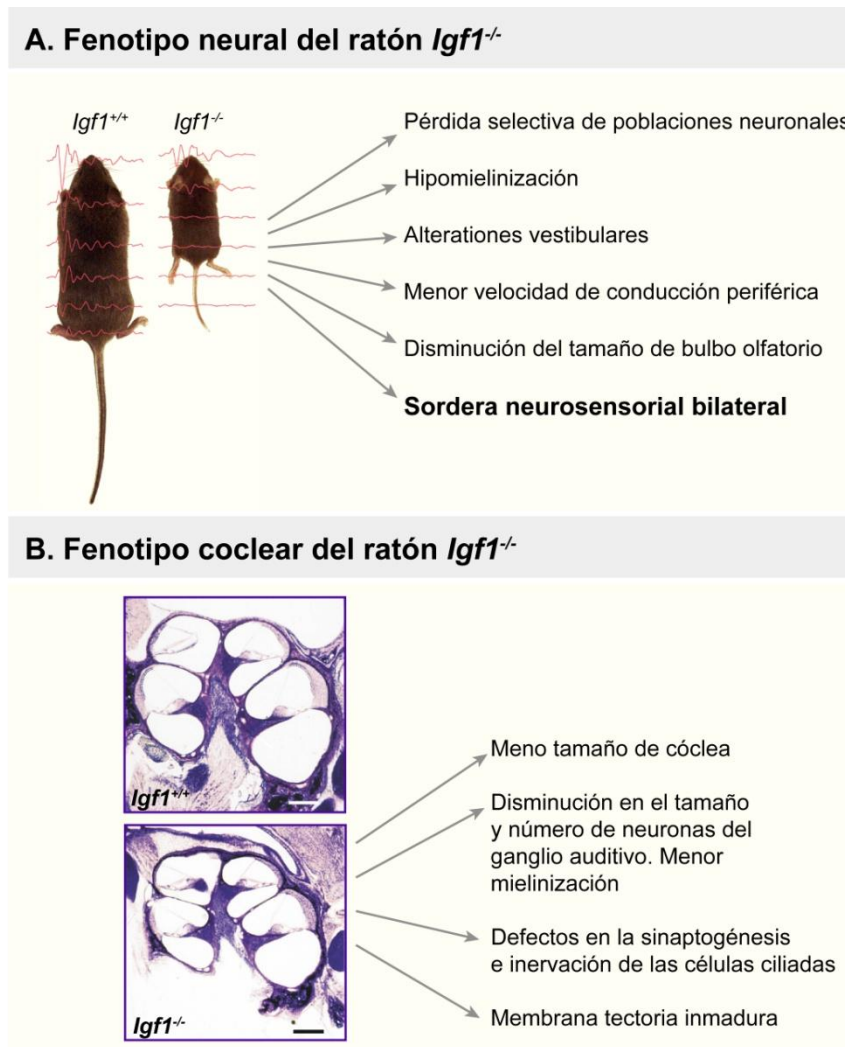


Figura 6. Fenotipo neural y coclear del ratón *Igf1*^{-/-}.

La alteración de los genes que codifican los sustratos del receptor de insulina (IRS) también dan lugar a alteraciones sensoriales y del crecimiento (Araki et al., 1994; Murillo-Cuesta et al., 2012). Los ratones con una mutación homocigota en el gen *Irs1* o con una mutación espontánea del mismo presentan graves alteraciones del crecimiento óseo, osteopenia e hipoacusia (Ogata et al., 2000; DeMambro et al., 2010). Los ratones deficientes en *Irs2* desarrollan una sordera profunda que es posible mejorar con la delección del gen que codifica la proteína fosfatasa 1B (PTP1B) (Murillo-Cuesta et al., 2012).

4. Perspectivas de la terapia con IGF-1 en el tratamiento de la hipoacusia

En los últimos años, los avances en los campos de la genética y la secuenciación del genoma humano y de otras especies han contribuido al avance en el conocimiento de la fisiopatología de la audición (Dror y Avraham, 2009). La hipoacusia neurosensorial es una patología debida en gran medida a la pérdida de células ciliadas cocleares. En el hombre, al contrario que en otras especies, no es posible la regeneración de las células del oído interno y tampoco se cuenta con una terapia alternativa que permita la sustitución de las células dañadas. El tratamiento actual se basa en las prótesis auditivas y los implantes cocleares. Estos dispositivos presentan resultados variables entre pacientes, con problemas en la discriminación auditiva y una vida útil limitada, a pesar de los avances en microcirugía y tecnología de implantes cocleares. Las terapias emergentes buscan la sustitución de las células dañadas o la regeneración funcional de las células del oído interno, que se ha convertido en el principal objetivo de la investigación biomédica en esta área durante los últimos años (Rivolta et al., 2010; Gunewardene et al., 2012). Una de las mayores barreras biológicas para el proceso de regeneración es la diferenciación terminal, que incluye aspectos como la expresión de genes específicos, el desarrollo de un fenotipo de célula madura y el cese irreversible de la división celular. En este contexto, profundizar en el conocimiento de las moléculas que, como IGF-1, regulan el desarrollo temprano del oído interno y tienen un papel fundamental en la regeneración y mantenimiento de las neuronas óticas (Magariños et al., 2012), es esencial para avanzar en la utilización de la terapia celular con células madre.

En paralelo, el uso de modelos animales de sordera (Lewis y Steel, 2010) y los avances en los campos como el de la nanotecnología (Danti et al., 2009) han puesto de manifiesto nuevas posibilidades de intervención terapéutica. En los últimos años ha habido un creciente interés en el potencial uso de IGF-1 para el tratamiento de la pérdida de la audición. Estudios *in vivo* realizados en modelos animales han demostrado que la aplicación local de rhIGF-1 (IGF-1 humano recombinante) protege a la cóclea de sufrir pérdidas, tanto a nivel histológico como funcional, inducidas por trauma auditivo (Iwai et al., 2006). Posteriormente se demostró que la aplicación local de IGF-1 es bien tolerada y se ha descrito una recuperación media en la audición de 14 dB (rango 5-22 dB) en pacientes con pérdida auditiva neurosensorial súbita resistente al tratamiento con glucocorticoides (Nakagawa et al., 2010 y 2012). Recientemente se ha estudiado la eficacia y seguridad de la terapia local de IGF-1 depositado en el oído medio frente a la inyección intratimpánica de dexametasona observándose una mejora de al menos 10 dB en la media de los umbrales auditivos (Nakagawa et al., 2014). Los efectos del IGF-1 en la hipoacusia neurosensorial súbita se han estudiado en un ensayo clínico en pacientes resistentes a esteroides y se ha observado una mejora significativa de la audición tras 24 semanas (Yamamoto et al., 2014). Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos

protectores de IGF-1 en la audición aún no están claros y se necesita un conocimiento más profundo de los procesos biológicos en los que se encuentra implicado.

Objetivos

OBJETIVOS

El factor de crecimiento similar a insulina de tipo 1 (IGF-1) es esencial para la proliferación y supervivencia celular durante el desarrollo temprano del oído interno en diversas especies, y para la diferenciación de las neuronas auditivas. En el hombre, las mutaciones homocigotas en el gen *IGF1* cursan con sordera neurosensorial sindrómica y el ratón deficiente en *Igf1* presenta sordera profunda asociada a la pérdida de neuronas del ganglio auditivo. Para dilucidar la asociación entre el déficit de IGF-1 y la sordera neurosensorial es necesario un mayor conocimiento del modelo animal y de los mecanismos moleculares que modulan las acciones del IGF-1 en el oído interno.

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Caracterizar el modelo murino deficiente en IGF-1 a lo largo de su vida natural. Para ello se realizarán los siguientes estudios:
 - 1.1. Estudio longitudinal de las funciones auditiva y vestibular en ratones *Igf1^{+/+}*, *Igf1^{+/-}* e *Igf1^{-/-}*.
 - 1.2. Estudio de la anatomía comparada del oído medio e interno, así como de la morfología coclear.
 - 1.3. En paralelo, se determinaran parámetros bioquímicos en plasma relacionados con el sistema IGF-1.
2. Estudiar la expresión comparada de genes del sistema IGF en ratones silvestres y deficientes en IGF-1. Para ello se usaran las siguientes aproximaciones:
 - 2.1. Estudio del patrón de expresión celular del IGF-1 y de su receptor de alta afinidad IGF1R durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano de la cóclea.
 - 2.2. Estudio de los perfiles de expresión génica del sistema IGF, y determinación de los niveles de activación de proteínas de sus vías de señalización durante estadios embrionario y postnatales de la cóclea.
 - 2.3. En paralelo, se estudiará la expresión de genes del sistema IGF en otros órganos y en la cóclea del ratón deficiente en *Igf1r*.
3. Buscar nuevas dianas cocleares del IGF-1 mediante la identificación de genes con expresión diferencial en la cóclea embrionaria del ratón *Igf1^{-/-}*. Para ello se realizarán los siguientes abordajes experimentales:
 - 3.1. Estudio comparado del transcriptoma de ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}*.
 - 3.2. Análisis *in silico* de promotores de los genes diferencialmente expresados que se encuentren.

3.3. Caracterización del patrón de expresión y de los niveles de expresión de dichos genes.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

1.1. Mantenimiento de la colonia de ratones

1.1.1. Ratones *Igf1*^{-/-}

Se ha utilizado una línea de ratones modificados genéticamente a la que se había delecionado parcialmente el exón 4 del gen *Igf1* e insertado el gen de resistencia a neomicina (*Igf1*^{tm1Arge}; MGI: 1926485) (Liu et al., 1993). Para los experimentos esta mutación se ha mantenido en dos fondos genéticos diferentes. Una línea de ratones se estableció en un fondo puro C57BL/6JOLA^{Hsd} (Harlan, Cambridgeshire, UK) en la que la supervivencia postparto de los embriones *Igf1*^{-/-} era nula, y la otra en un fondo genético mixto HsdOla: MF1 (Harlan) y 129/SvEvTac (Taconic, New York, USA) para conseguir la supervivencia postnatal de los ratones nulos. La mortalidad de dichos ratones durante la época perinatal y hasta alcanzar la edad adulta es elevada, aunque sobrevivieron un 20-30% de ellos. Las líneas se mantuvieron mediante cruces heterocigotos puesto que los ratones *Igf1*^{-/-} no son fértiles.

1.1.1. Ratones *UBC-CreERT2; Igf1r*^{fl/fl}

Para los experimentos se ha empleado una línea de ratones mutantes condicionales de *Igf1r*, generada mediante el sistema de recombinación Cre/lox, puesto que la delección de dicho gen es letal en el momento del nacimiento. Los ratones dobles transgénicos *UBC-CreERT2; Igf1r*^{fl/fl} se consiguieron mediante el cruce parental (F0) de ratones transgénicos hemicigotos *UBC-Cre ERT2 (Tg(UBC-cre/ERT2)1Ejb*; Mouse Genome Informatics (MGI): 3707333) de fondo genético mixto 129SvEv/C57BL/6 (Ruzankina et al., 2007), con ratones mutantes homocigotos *Igf1r*^{fl/fl} (*Igf1r*^{tm1Jcbr}; MGI: 3818453) de fondo genético C57BL/6 (Kloting et al., 2008). Los ratones heterocigotos *UBC-CreERT2; Igf1r*^{fl/+} obtenidos en la 1ª generación (F1) se cruzaron con *Igf1r*^{fl/fl} para obtener una 2ª generación (F2) con la misma proporción de los cuatro genotipos posibles. Se seleccionaron para experimentos los ratones dobles transgénicos *UBC-CreERT2; Igf1r*^{fl/fl} y los controles *Igf1r*^{fl/fl}, ambos con un fondo genético mixto 129SvEv/C57BL/6.

Para inducir la activación de la recombinasa del bacteriófago P1 (Cre), se inyectó de forma intraperitoneal una solución de 75 mg/kg de tamoxifeno (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.) durante cinco días consecutivos a ratones macho de 1 mes de edad. La solución de tamoxifeno se disolvió en aceite de maíz (Sigma-Aldrich) a una concentración de 20 mg/ml.

Para el estudio se utilizaron embriones de ratón procedentes de madres gestantes y ratones en etapa postnatal de distintas edades. Todos ellos fueron estabulados en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (IIBM) (número de identificación europeo ES280790000188) en habitaciones de temperatura controlada (22±2°C), con ciclos de

luz-oscuridad de 12 h y libre acceso al agua y a la dieta estándar. Los cruces parentales para generar los ratones dobles transgénicos *UBC-CreERT2; Igf1^{fl/+}* se hicieron en el laboratorio del Dr. J. G. Pichel (CIBIR).

Todos los procedimientos de manejo de los animales se llevaron a cabo según la legislación europea y nacional (Directiva Europea 2010/63/EU; RD 53/2013). Para los experimentos se siguieron las recomendaciones de FELASA (*Federation of Laboratory Animal Science Associations*) y fueron aprobados por el Comité de Bioética del CSIC.

1.2. Genotipado de ratones

El genotipo de los ratones se identificó con el kit *REDEExtract-N-AmpTMTissue PCR* (Sigma-Aldrich) siguiendo las indicaciones del fabricante. La extracción de ADN se hizo a partir de una pequeña biopsia tomada de la parte final de la cola del ratón.

1.2.1. Genotipado de ratones *Igf1^{-/-}*

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se programó con los siguientes ciclos térmicos: 1 ciclo de 94°C durante 10 minutos; 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 59°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto; y un ciclo final de elongación de 72°C durante 10 minutos. El alelo *Igf1* no mutado se detectó con los oligonucleótidos *Igf1For* 5'-GTCTAACACCA-GCCCATCTGATT-3' e *Igf1Rev* 5'-GACTCGATTTCACCCACTCGATCG-3' que amplificaban un fragmento de 250 pb. El casete de neomicina, insertado en la secuencia de los alelos mutados, se detectó utilizando los oligonucleótidos *NeoF* 5'-GCTTGGGTGG-AGAGGCTATCC-3' y *NeoR* 5'-CCAGCTCTTCAGCAATATCACGGG-3' que daban lugar a una banda de 658 pb. Todos los oligonucleótidos se utilizaron de forma simultánea en la reacción de PCR sin que se detectase interferencia alguna entre ellos. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Conda, Madrid, España) y se revelaron para su análisis (figura 7).

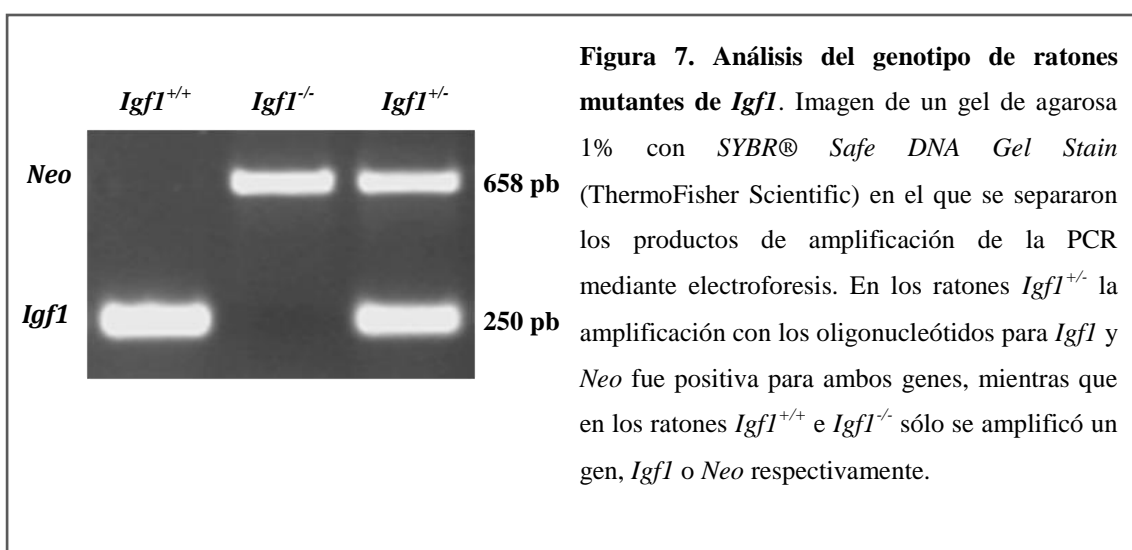


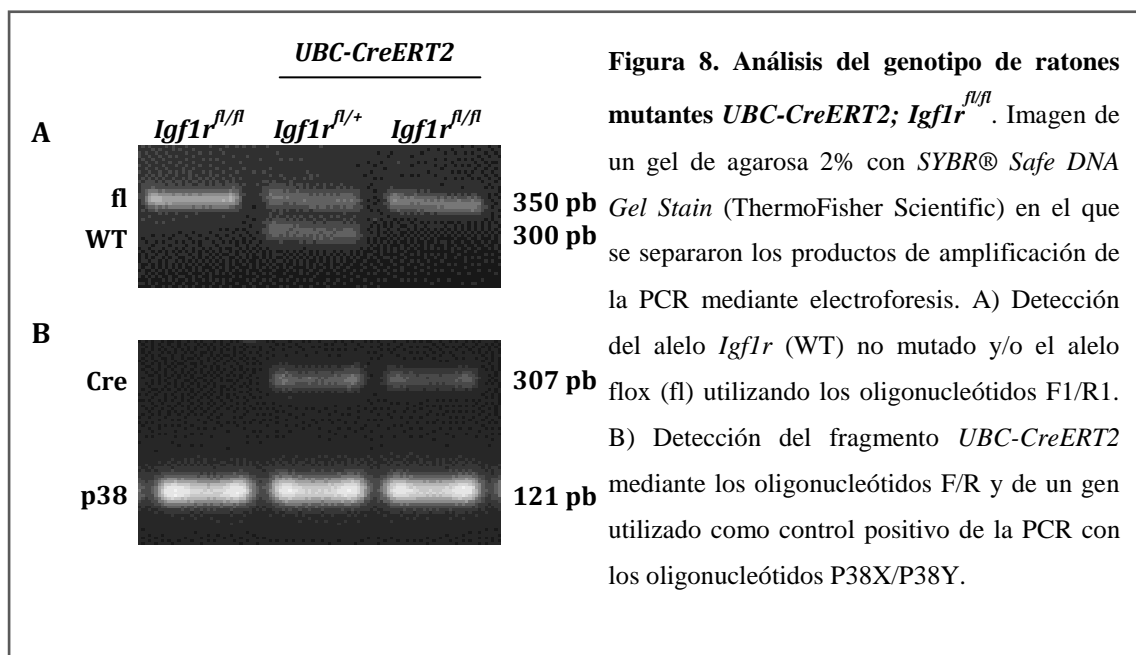
Figura 7. Análisis del genotipo de ratones mutantes de *Igf1*. Imagen de un gel de agarosa 1% con *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (ThermoFisher Scientific) en el que se separaron los productos de amplificación de la PCR mediante electroforesis. En los ratones *Igf1^{+/-}* la amplificación con los oligonucleótidos para *Igf1* y *Neo* fue positiva para ambos genes, mientras que en los ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* sólo se amplificó un gen, *Igf1* o *Neo* respectivamente.

1.2.2. Genotipado de ratones *UBC-CreERT2; Igf1r^{fl/fl}*

La PCR para la detección del fragmento *UBC-CreERT2* y un gen utilizado como control positivo de la PCR se programó de la siguiente manera: 1 ciclo de 94°C durante 4 minutos; 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos; y un ciclo final de elongación de 72°C durante 10 minutos. Se utilizaron los oligonucleótidos F^{5'}-TGAAGCTCCGGTTTTGAACT-3' y R^{5'}-TGGTGTACGGTCAGTAAATTGG-3' para detectar *UBC-CreERT2* y dos oligonucleótidos adicionales para el gen control p38X^{5'}-CTACAG-AATGCACCTCGGATG-3' y p38Y^{5'}-AGAAGGCTGGATTTGCACAAG-3', que amplificaron fragmentos de 307 y 121 pb respectivamente.

Las condiciones para la PCR de detección del alelo *Igf1r* no mutado o el alelo flox fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C durante 4 minutos; 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos; y un ciclo final de elongación de 72°C durante 7 minutos. Se utilizaron los oligonucleótidos F1^{5'}-TCCCTCAGGCTTCATCCGCAA-3' y R1^{5'}-CTTCAGCTTTGCAGGTGCACG-3' que amplificaron una banda de 300 pb para el alelo *Igf1r* y de 350 pb para el alelo flox (Kloting et al., 2008).

La delección de *Igf1r* se detectó con las siguientes condiciones de PCR: 1 ciclo de 95°C durante 4 minutos; 30 ciclos de 95°C durante 45 segundos, 60°C durante 1 minuto, 72°C durante 2,30 minutos; y un ciclo final de elongación de 72°C durante 10 minutos. Se utilizaron los oligonucleótidos F3^{5'}-TTATGCCTCCTCTCTTCATC-3' y R1^{5'}-CTTCAGCTTTGCAGG-TGCACG-3' que amplificaron una banda de 1220 pb para el alelo *Igf1r*, de 1300 pb para el alelo flox y de 491 pb para la delección. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Conda) y se revelaron para su análisis (figura 8).



2. Procedimientos analíticos

Se utilizaron ratones deficientes en *Igf1* y sus controles con edades comprendidas entre 1 y 12 meses para medir el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre e IGF-1 circulante en suero.

2.1. Determinación de los niveles de glucosa

Para las medidas de glucemia, se sometió a los animales a ayuno durante 12 horas y a continuación se midieron los niveles de glucosa en muestras de sangre tomadas de la vena de la cola de los animales mediante un glucómetro (Glucocard Gmeter, Menarini Diagnostics, Badalona, España).

Para las medidas de peso corporal y glucosa en sangre se utilizaron no menos de ochenta y veintiocho ratones por genotipo respectivamente. Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA). Los datos se representan como la media±ESM.

2.2. Determinación de los niveles de IGF-1

Se extrajo sangre de la vena mandibular mediante punción de la zona circular desprovista de pelo que se encuentra situada en el centro de la mandíbula inferior del ratón. Se eligió este procedimiento de extracción porque la hemorragia que provoca se detiene muy fácilmente y no requiere anestesia. Las muestras de sangre se conservaron en hielo y posteriormente se centrifugaron a baja velocidad (2500 rpm) durante 15 minutos para no producir hemólisis. El suero o sobrenadante obtenido se recogió en tubo aparte.

Para determinar la concentración en suero de los niveles circulantes de IGF-1 se utilizó el kit *OCTEIA Rat/Mouse IGF-1* (sensibilidad 63 ng/ml y variabilidad 4-8%) (IDS Ltd., Boldon, Reino Unido) siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, se incubaron las muestras de suero con un reactivo para inactivar la unión inespecífica de proteínas y luego se diluyeron para el ensayo. Las muestras diluidas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con un antisuero IGF-1 biotinilado anti-rata policlonal de conejo en micropocillos de poliestireno recubiertos de anticuerpo purificado IGF-1 anti-rata monoclonal. A continuación, se lavaron los pocillos y se añadió peroxidasa de rábano unida a avidina. Tras un último lavado se añadió tetrametil bencidina para producir la reacción colorimétrica y la absorbancia de dicha reacción se midió a dos longitudes de onda (A450-A650). La unidad de los datos de ELISA es de ng/ml. Las comparaciones estadísticas de los datos de niveles de IGF-1 en suero entre los diferentes grupos de edad se hicieron mediante el test de suma de rangos de Mann-Whitney utilizando *GraphPad InStat* 3.06 (Software Inc., San Diego, CA, USA). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p \leq 0.05$.

3. Evaluación de las funciones auditiva y vestibular

3.1. Estudio de la función auditiva

El estudio de la función auditiva en los modelos animales se realizó mediante el análisis de los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC o *Auditory Brainstem Response, ABR*) en el Servicio de Evaluación Neurofuncional no Invasiva (ENNI) (<http://www.iib.uam.es/servicios/nine>) del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (IIBM).

Para analizar la evolución de la función auditiva de los ratones deficientes en *Igfl* y sus controles con la edad se emplearon animales de los tres genotipos y de diferentes grupos de edad entre el mes y el año de vida. Se utilizaron indistintamente ratones machos y hembras, sin observarse diferencias asociadas al sexo.

El estudio de PEATC se llevó a cabo en una cámara sonoamortiguada dentro de una habitación aislada acústica y eléctricamente. La estimulación sonora, la amplificación de la señal electroencefalográfica y el registro de datos se realizó con una estación TDT System 3TM y los software *SigGenRPTM* y *Bio SigGenRPTM* (Tucker Davis Technologies, Alachua FL USA), calibrada mediante un micrófono de ¼ de pulgada (7170 ACO PacificTM), como ya se había descrito previamente (Cediel et al., 2006). Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de ketamina (Imalgene, Merial, 100 mg/kg) y xilacina (Rompun® 2%, Bayer, 10 mg/kg) y se colocaron decúbito esternal sobre un sistema térmico (Gaymar TP500 pump; Gaymar Industries Inc, New York, USA) para mantenerlos a 37°C durante el tiempo de la prueba a fin de evitar la posible hipotermia. Los electrodos de registro (Spes Medica; Inycom, España) se situaron en el tejido subcutáneo en posiciones bien definidas (el electrodo activo en la zona del vértex, el electrodo de referencia en la región mastoidea, bajo el pabellón auditivo a estimular y el electrodo tierra en la región dorsal), comprobándose su correcta colocación mediante un impedanciómetro (RA4LI, TDT).

Los estímulos empleados (click de 1-16 kHz y tonos puros de 8, 16, 20, 28 y 40 kHz) fueron emitidos por un altavoz electrostático (MF-1, TDT) situado frente al pabellón auditivo, a una distancia de 5 cm. El altavoz emitió cada estímulo a intensidades decrecientes desde 90 dB SPL a 10 dB SPL, registrando la actividad electroencefalográfica sincrónica y promediando la respuesta eléctrica obtenida tras mil estímulos. Se obtuvo así una onda de PEATC para cada estímulo e intensidad, caracterizadas por la presencia de cinco picos (I-V).

Los parámetros analizados a partir de las ondas registradas durante la prueba de PEATC fueron los siguientes: umbrales auditivos en respuesta a estímulos tipo click y sonidos puros, latencias pico y amplitud. Para el análisis estadístico del estudio de PEATC se utilizó el software IBM SPSS v19.0. Las diferencias entre genotipos se detectaron mediante ANOVA y

test *post hoc* como el de Bonferroni para varianzas iguales o el test de Tamhane cuando no lo eran. Los datos se presentan como la media \pm ESM. Los resultados se consideraron significativos para $p \leq 0.05$.

3.2. Estudio de la función vestibular

Para caracterizar el fenotipo vestibular del ratón deficiente en *Igf1* se realizó una batería de test básicos en ratones de 1-5 meses de edad y en, al menos, 5 animales/genotipo. El panel de pruebas vestibulares adaptadas a partir de protocolos estándar (Hardisty-Hughes et al., 2010) es capaz de detectar defectos vestibulares importantes, aunque no es adecuado para la valoración de alteraciones fenotípicas más sutiles. En primer lugar, se observó a los ratones en las cubetas para detectar cualquier indicio de comportamiento anormal que fuera indicativo de un posible defecto vestibular como rotar de forma continuada sobre sí mismo o deambular erráticamente. Se comprobó la habilidad de los ratones para situarse espacialmente e intentar alcanzar una superficie horizontal sobre la que se les suspendía o si por el contrario se desorientaban plegándose sobre sí mismos y en dirección contraria a la superficie. Se realizaron pruebas de corrección postural de contacto y en el aire: i) se colocaba el ratón sobre el lomo en una superficie horizontal y se comprobaba la rapidez con la que el animal se volvía a orientar desde una posición invertida, ii) se dejaba caer al ratón y se comprobaba si durante la caída corregía la postura desde la posición invertida. Por último se testaba el comportamiento en el agua, comprobando si tanto la forma de nadar como el desplazamiento eran correctos.

4. Obtención y procesamiento de las muestras biológicas

4.1. Obtención de embriones y preparación de las muestras biológicas en estadios tempranos

Para la determinación del estadio embrionario, se consideró el momento en el que se observó el tapón vaginal tras el cruce como día embrionario 0,5 (E0,5). Los embriones de estadio E15,5 y E18,5 se obtuvieron por cesárea de la madre gestante previamente anestesiada y se sacrificaron por congelación, sin perfundir, para la posterior disección de la muestra.

Las muestras de E15,5, E18,5 y postnatal (P)5 para histología se prepararon decapitando a los ratones y sumergiendo la cabeza completa en una solución de paraformaldehído 4% (PFA) (Merck) y tampón fosfato salino (PBS 0,1M pH 7,4) a 4°C. Las muestras así fijadas se criopreservaron en sacarosa (Sigma-Aldrich) 10% en PBS y se incluyeron en una solución de sacarosa 10% y gelatina 10% (Panreac, Barcelona, España) en PBS. Por último se congelaron durante 1 minuto con isopentano (Merck, Kenilworth, NJ, EE.UU.) a -70°C.

4.2. Anestesia y perfusión transcardíaca del ratón

La perfusión se realizó en primer lugar con una solución de lavado (PBS- 0,1M pH 7,4) y a continuación con una solución fijadora (PFA 4% en PBS). El volumen empleado en ambos

casos dependió del peso de cada ratón, en general 1ml/g para la solución de lavado y 1,5 ml/g para la solución de fijación. El procedimiento de perfusión se llevó a cabo en una cabina de químicos debido a la toxicidad por inhalación que presenta el paraformaldehído.

Los ratones en estadio postnatal, a partir de P5, se sacrificaron mediante la administración intraperitoneal de 100 mg/kg de pentobarbital sódico (Dolethal, Vétequinol, Madrid, España) diluido en suero fisiológico. Cuando se alcanzó el plano anestésico quirúrgico, mediante comprobación de la ausencia de reflejo podal, se colocó el animal en posición decúbito supino sujetando las extremidades sobre una superficie adecuada para la recogida de los líquidos de perfusión. Se realizó un corte en la piel a la altura del apéndice xifoides y se separó la piel lateralmente. A continuación, se cortaron transversalmente los músculos abdominales continuando la incisión a nivel torácico por ambos lados de forma que la sección fuera paralela al esternón. Se fijó en sentido rostral toda la pieza esternocostal para una mejor visualización de la cavidad torácica. Una vez expuesto el corazón, se liberó de las envueltas pericárdicas y se realizó una inserción en el ventrículo izquierdo a nivel del ápex cardiaco con un catéter intravenoso unido a una jeringuilla que contiene la solución de lavado. Se realizó una pequeña incisión en la aurícula derecha para permitir la evacuación de la circulación de retorno. Por último se procedió a la perfusión de la solución de lavado y a continuación de la solución fijadora. Durante todo el proceso se mantuvo una velocidad de perfusión lo más lenta y sostenida posible para conseguir la correcta fijación de los tejidos.

4.3. Disección del oído interno para estudio morfológico

Una vez anestesiado y perfundido el animal, se separó la piel del cráneo con un bisturí. A continuación, se realizó en el cráneo un corte transversal rostral a nivel del hueso frontal por delante de los bulbos olfatorios y un corte transversal en la zona del hueso interparietal-occipital. Ambos cortes trasversales se unieron mediante una sección longitudinal por la sutura sagital, lo que permitió levantar en parte los huesos parietal y frontal dejando expuesto el encéfalo. Se retiró el mismo en dirección rostro-caudal previa sección de los pares craneales. Mediante disección roma desde la base del cráneo, se aisló la porción petrosa del hueso temporal donde se ubica el oído interno. Para ello se aprovecharon las suturas óseas rostrales, que lo separan del hueso basiesfenoides y la porción escamosa del hueso temporal, y las suturas caudales, que lo separan del hueso basioccipital (figura 9). La parte coclear del oído interno se localiza adyacente a la porción basilar del hueso occipital, mientras que la parte vestibular se extiende hacia la pared lateral del cráneo. Una vez aisladas las partes óseas, se disecaron las partes musculares y se seccionó el conducto auditivo externo, lo que nos permitió extraer de una pieza la porción petrosa del temporal, con el oído interno junto con el componente óseo del oído medio o bulla timpánica. El tejido aislado de esta manera se llevo a una placa de cultivo donde se practicó una pequeña incisión en la bulla con tijeras de microdisección (Allgaier Instrumente

GmbH, Alemania) para facilitar el acceso de las soluciones de postfijación y descalcificación. La postfijación se hizo con PFA 4% durante 1 día y a 4°C. Las muestras se lavaron con PBS 0,1M a 4°C antes de comenzar la descalcificación del tejido.

4.4. Descalcificación de la muestra

El oído interno es un tejido óseo que requiere un tratamiento de descalcificación previo a su inclusión en bloques y obtención de secciones para histología. La duración del proceso de descalcificación depende del grado de osificación del hueso temporal y de la disección que se haya hecho de la muestra. La descalcificación se realizó con ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 0,8 M pH 6,5 a 4°C y en agitación. La solución se cambió cada 2 ó 3 días comprobando la consistencia del tejido en cada caso para determinar si era adecuada para su inclusión. Se descalcificaron aquellas muestras procedentes de ratones a una edad de P5 o superior.

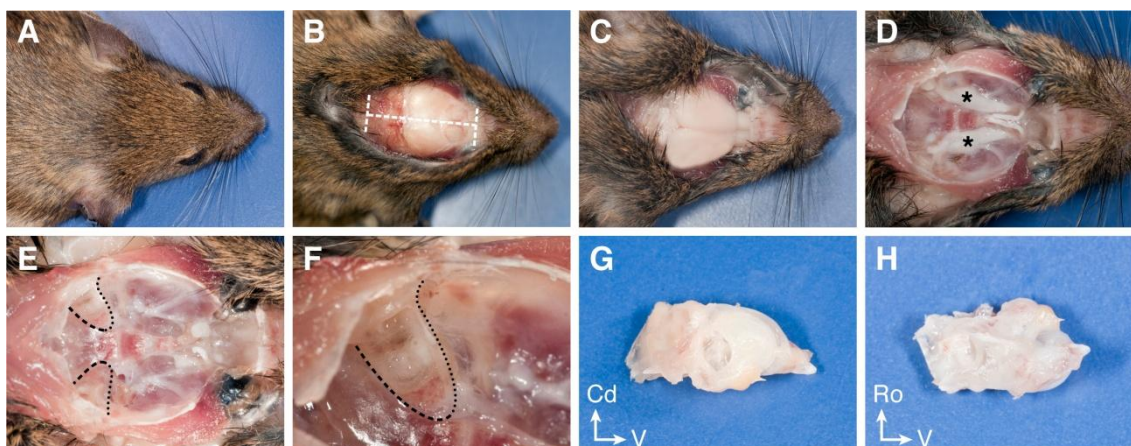


Figura 9. Disección del oído interno de ratón. (A) Imagen de un animal anestesiado no perfundido. (B) Separación de la piel del cráneo para cortar el mismo transversalmente en los huesos frontal y occipital (líneas de trazos blancas cortas) y longitudinalmente mediante una sección por la sutura sagital (línea de trazos larga). (C) Esto permitía dejar expuesto el encéfalo. (D) Se retiró el encéfalo y a continuación lo que quedaba de los pares craneales (asterisco). (E,F) Aprovechando las suturas óseas rostrales (línea de puntos negra) y caudales (línea de trazos negra) se disecaron las partes óseas y musculares del oído interno la porción petrosa del hueso temporal donde se ubicaba el oído interno. (G,H) Porción petrosa del hueso temporal, con el oído interno junto con la bulla timpánica.

Inclusión de las muestras y secciones

4.4.1. Bloques y secciones de parafina

Las muestras descalcificadas se deshidrataron en etanol 70%, se incluyeron en parafina según el protocolo estándar y se cortaron en secciones seriadas de 10 µm con un micrótopo de rotación RM 2255 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) en el Servicio de Histología del IIBM (<http://www.iib.uam.es/servicios/patexperimen/intro.es.html>). Las secciones se adhirieron

a portaobjetos que se conservaron a 4°C hasta su uso. Antes de iniciar cualquier técnica histológica, las secciones de parafina se desparafinaron en dos baños de xilol (Merck) durante 10 minutos. A continuación las secciones se rehidrataron pasando por una serie de etanoles (Merck) de concentración decreciente (100%-96%-80%-70%-50%) durante 5 minutos y finalmente se lavaron con agua destilada y PBS.

4.4.2. Bloques de congelado y criosecciones

Para la criopreservación del tejido, las muestras descalcificadas y lavadas con PBS se sumergieron en una solución de sacarosa 15% en PBS durante un día y en una solución de sacarosa 30% en PBS durante otro día más. Para la inclusión se sumergieron las muestras en una solución de gelatina 10% y sacarosa 15% en PBS durante 30 minutos a 37°C. En moldes previamente tapizados con la solución de gelatina, se orientaron las piezas y se cubrieron con la misma solución que se dejó solidificar a 4°C. Finalmente se cortaron los bloques de gelatina y se congelaron con isopropanol (Merck) a -70°C. Las criosecciones se realizaron en el Servicio de Histología del IIBM con un microtomo criostático CM 1900 (Leica Microsystems) con un grosor de 20 µm y se recogieron en portaobjetos *superfrost* (Menzel Gläser; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se conservaron a -80°C hasta su utilización en inmunohistofluorescencia o hibridación *in situ*.

4.5. Disección del oído medio para el estudio de los huesecillos

Una vez sacrificado y decapitado el ratón, se separó la piel del cráneo, se retiró cualquier resto del oído externo y se seccionó la cabeza en dos partes con disección roma del encéfalo. La muestra se llevó a una placa de cultivo para continuar la disección del oído medio con el estereomicroscopio (Leica MZ75, Leica Microsystems). Se eliminó el tejido que recubre la bulla hasta dejarla expuesta y se extrajo cuidadosamente para dejar el anillo timpánico intacto. A continuación se retiró la membrana timpánica con precaución de no dañar el martillo en su inserción con dicha membrana y se cortó el músculo tensor del tímpano para poder extraer el martillo y el yunque. Finalmente se cortaron el músculo y la arteria estapedial a ambos lados del estribo para acceder a este y retirarlo con cuidado debido a su fragilidad. Los huesecillos se conservaron en formalina al 10% (Sigma- Aldrich) a temperatura ambiente en frascos de vidrio para su posterior fotografiado.

4.6. Disección del oído interno para su posterior aclaramiento

La disección se realizó como ya se ha explicado anteriormente en el punto 4.3, pero sin perfusión del animal. Una vez aislados el oído medio e interno, se llevó la muestra a una placa de cultivo para su disección con el estereomicroscopio y se procedió a eliminar el tejido circundante de la porción petrosa del hueso temporal. Con cuidado se retiró la bulla timpánica,

cavidad que recubre la cóclea y que conforma el oído medio, mediante una incisión desde el meato acústico interno.

Para la clarificación del oído interno y el estudio del laberinto óseo, se utilizaron muestras de ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* de un mes de edad diseccionados de esta forma. Tras la extracción, las muestras se fijaron en solución de Bodian durante dos horas. A continuación se lavaron en agua destilada durante 30 minutos y se pasaron a etanol 70% durante 24 horas y en agitación. Pasado este tiempo se cambiaron a una solución de KOH 3% que se refrescó diariamente hasta la disolución del tejido blando. Finalmente, las muestras se trataron en una solución compuesta de glicerol, etanol 70% y alcohol bencílico en un ratio 2:2:1 durante 24 horas en agitación y se almacenaron en una solución de glicerol: etanol 70% (1:1) (Kuhn et al., 2012).

4.7. Disección de los núcleos cocleares y de la cóclea para estudio de expresión de genes y proteínas

La disección de los núcleos cocleares se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.3 sin perfusión, hasta dejar expuesto el encéfalo y se retiró el mismo en dirección rostro-caudal previa sección de los pares craneales. Una vez obtenido se llevó a una placa de cultivo para su disección con el estereomicroscopio (Leica MZ75) y con el encéfalo en vista dorsal, se hizo un corte perpendicular al eje del encéfalo inmediatamente rostral al cerebelo y otro ligeramente caudal al mismo. Se seccionaron los pedúnculos cerebelosos para retirar completamente el cerebelo. Esto permite observar con la lupa el relieve que muestran los núcleos cocleares inmediatamente caudales al pedúnculo cerebeloso medio y facilita la disección de los núcleos cocleares dorsal y ventral en toda su extensión (Ryugo y Willard, 1985).

Una vez retirado el encéfalo y disecado el oído interno, como se ha explicado en el apartado anterior, se procedió a la separación de la cóclea y la porción vestibular. Para ello se realizó una sección quirúrgica mediante estereomicroscopio (Leica MZ75) por la línea imaginaria que une las ventanas oval y redonda con una tijera de microdisección. Las muestras así aisladas se conservaron a -80°C hasta su utilización.

5. Morfología e histología

5.1. Tinciones vitales

La citoarquitectura y morfología del tejido se estudió en secciones de parafina de la cóclea de ratones de 3, 7 y 12 meses de edad mediante tinciones de hematoxilina-eosina y de cresil violeta realizadas en el Servicio de Histología del IIBM. Las secciones de parafina, desparafinadas y rehidratadas como ya se ha explicado, se tiñeron con hematoxilina durante 5 minutos. Se lavaron abundantemente con agua y se tiñeron con solución alcohólica de eosina

durante 3 minutos. Finalmente se volvieron a lavar, se deshidrataron, montaron y analizaron al microscopio.

5.2. Inmunohistoquímica

Para las inmunotinciones se emplearon secciones de parafina, previamente desparafinadas y rehidratadas, y criosecciones atemperadas. Para el estudio se emplearon secciones de cóclea de ratones en edad embrionaria (E15,5 y E18,5) y postnatal (P5, P15, P90, P210 y P360). Se analizaron en paralelo tres embriones o ratones por genotipo en tres experimentos independientes. En cada una de las reacciones se realizaron experimentos control, sin anticuerpo primario, para confirmar la especificidad del patrón de expresión.

5.3. Tinciones con peroxidasa

Se inhibió la peroxidasa endógena incubando las muestras en H₂O₂ 1,5% (VWR, Radnor, PA; EE.UU.) con agua destilada y metanol (40-60) durante 15 minutos. Se lavaron las secciones con PBS 0,1M 3 veces durante 5 minutos y a continuación se incubaron durante 1,5 horas en PBS-Tritón (PBS-T) con 3,5% de suero normal de la especie animal donde se generó el anticuerpo secundario para bloquear las uniones inespecíficas. Los anticuerpos primarios se incubaron en una cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Todos los anticuerpos, tanto primarios como secundarios, se diluyeron en la solución de bloqueo. En la Tabla 1 se detallan los anticuerpos primarios utilizados y las diluciones de uso. Al día siguiente se lavaron las secciones con PBS y se incubaron 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado. Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios a una dilución 1:100: anti-ratón IgG conjugado con biotina (AP124B; Merck) y anti-conejo conjugado con biotina (AQ132B; Merck). A continuación se lavaron de nuevo las secciones con PBS y se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda con extravidina peroxidasa (E2886; Sigma-Aldrich) a dilución 1:100 durante 90 minutos. La peroxidasa se reveló con el sustrato 3, 3'-diaminobencidina (DAB) (Sigma-Aldrich)/H₂O₂ (10 mg de DAB en 20 ml de PBS y 20 µl de una solución 1:9 de H₂O₂). El revelado se paró con PBS frío y las secciones se montaron con Mowiol (Sigma-Aldrich) y se observaron en el microscopio de fluorescencia Nikon 90i (Nikon Instruments, Melville, NY, EE.UU.).

5.4. Tinciones con fluorescencia

Para favorecer la permeabilización del tejido se lavaron las secciones con PBS 0,1M durante 5 minutos y 3 veces. Los sitios de unión específicos se bloquearon en PBS-T con 5% de suero normal de cabra o de burro durante 1 hora, se lavaron y se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios que se indican en la Tabla 1 diluidos en PBS-Tween 20 al 0,05% (PBS-Tw). Cuando se retiró el anticuerpo primario, se lavaron las secciones con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en PBS-Tw a 1:400 durante 4

horas y a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-ratón Alexa488 (cabra), anti-cabra Alexa488 (burro), anti-conejo Alexa488 (cabra) y anti-conejo Alexa546 (cabra) (Molecular Probes). Por último, se montaron las secciones con Mowiol y se observó la fluorescencia en el microscopio Nikon 90i.

Anticuerpo	Tipo ¹	Proveedor/Referencia	Concentración
3A10	MouM	DSHB ² /3A10	1:5
pIGF1R (Tyr 1165/1166)	RbP	Santa Cruz/sc-101704	1:50
IGF1Rβ	RbP	Santa Cruz/sc-713	1:50
IRS2	RbP	Upstate/06-506	1:400
Kir4.1	RbP	Chemicon/AB5818	1:200
MEF2A	RbP	Santa Cruz/sc-313	1:50
MEF2C	GtP	Santa Cruz/sc-13266	1:50
MEF2D	MouM	BD Bioscience/610774	1:1000
Myelin Basic Protein	RbP	Biotrend/BT300-0082	1:200
Myosin VIIa	RbP	Proteus Biosciences/25-6790	1:150
Na⁺K⁺-ATPase β2	RbP	Upstate	1:200
p75	RbP	Promega/G3223	1:500
Prox1	RbP	Chemicon/AB5475	1:1000

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. ¹ Tipo de anticuerpo: MouM, monoclonal de ratón; RbP, policlonal de conejo; GtP, policlonal de cabra. ² *Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biological Sciences of Iowa, Iowa City, IA 52242.*

5.5. Hibridación *in situ* en criosecciones

La técnica de la hibridación *in situ* se realizó sobre criosecciones de la cóclea de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} a distintas edades (E15,5, E18,5 y P5) para los genes *Igf1*, *Igf1r*, *Six6*, *Mash1*, *Fgf15*, *Fgfr3* y *Fgf8*. Se realizaron tres experimentos independientes en los que se utilizaron en paralelo un mínimo de tres ratones de cada estadio por genotipo. Como control se utilizó la sonda sentido y en ningún caso se obtuvo señal específica con la misma. En la Tabla 2 se detallan los ADNc empleados para generar las sondas utilizadas en la hibridación *in situ*. Los plásmidos que contenían dichas sondas fueron amablemente cedidos por los Dres. F. de Pablo, CIB-CSIC (*Igf1*); E.J. de la Rosa, CIB-CSIC (*Igf1r*); P. Bovolenta, Instituto Cajal-CSIC (*Six6*);

D. Henrique, Universidad de Lisboa (*Mash1*); S.L. Mansour, Universidad de Utah (*Fgf15* y *Fgf8*) y O. Bermingham-McDonogh, Universidad de Washington (*Fgfr3*). Los plásmidos se transformaron, se seleccionaron los clones crecidos en cultivo y se purificó el ADN plasmídico. El ADN de cada uno de los clones se secuenció en el Servicio de Genómica del IIBM para confirmar que portaban el inserto de interés. La digestión y transcripción de las sondas se realizó utilizando las enzimas de restricción y polimerasas detalladas en la Tabla 2.

ADNc	Sonda anti-sentido	Sonda sentido	Referencia
<i>Six6</i>	EcoRI/T7	HindIII/T3	López-Ríos et al., 1999
<i>Mash1</i>	XbaI/Sp6	BsaI/T7	Guillemot et al., 1993
<i>Fgf15</i>	NotI/T7	NcoI/Sp6	McWhirter et al., 1997
<i>Fgfr3</i>	XhoI/T3	EcoRI/T3	Hayashi et al., 2007
<i>Fgf8</i>	EcoRI/T3	BamHI/T7	Ladher et al., 2005
<i>Igf1</i>	XbaI/T3	HindIII/T7	Liu et al., 1993
<i>Igf1r</i>	HindIII/T7	NotI/Sp6	

Tabla 2. ADN complementario utilizado para generar las sondas de hibridación *in situ*.

Las criosecciones se acetilaron para saturar los lugares inespecíficos de unión de la sonda de ARN y se permeabilizaron como está descrito en MR Aburto et al, 2012. Posteriormente se incubaron con 1 µg/ml de la sonda correspondiente marcada con digoxigenina a 70°C durante toda la noche y al día siguiente se lavaron y volvieron a bloquear los lugares de unión inespecíficos. Se incubaron con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina a dilución 1:3500 (Roche, Basel, Suiza) durante la noche a 4°C y por último se procedió al revelado de la sonda con cloruro de tetrazolio nitroazul/5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (NBT/BCIP) a dilución 1:50 (Roche). Cuando fue necesario, tras el revelado se realizó el protocolo de inmunofluorescencia.

6. Análisis del transcriptoma de la cóclea

6.1. Muestra biológica

Como material biológico de partida se utilizaron colecciones de cócleas de dos ratones obtenidas, diseccionadas y conservadas como se indica en los apartados 4.1 y 4.7. Las cócleas procedían de ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* a distintas edades embrionarias (E15,5 y E18,5) y postnatales (P5, P15, P30, P60 y P90).

Para los estudios de *arrays* se emplearon tres extractos de ARN independientes por genotipo y edad. Para la PCR en tiempo real (RT-qPCR) se utilizaron entre tres y cinco extractos de ARN independientes por genotipo y edad.

6.2. Obtención y purificación de ARN

Todo el material empleado durante el procedimiento se encontraba en condiciones de esterilidad.

La obtención de ARN del tejido de cóclea, utilizada para los arrays y la técnica de RT-qPCR empleada en su validación, junto con la de hueso femoral de los ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* se realizó mediante extracción de ARN con TRIzol[®] (ThermoFisher Scientific) y posterior tratamiento frente a ADNasas con el kit DNA-free[™] (ThermoFisher Scientific). En el caso de los arrays, la técnica además requirió de una purificación posterior del ARN que se llevó a cabo mediante columnas con el kit RNeasy (Qiagen, Germantown, MD, EE.UU.).

La obtención de ARN de núcleos cocleares procedentes de ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* y de cóclea de ratones *UBC-CreERT2; Igf1^{fl/+}* e *Igf1^{fl/fl}* se realizó con el sistema automático de extracción y purificación por columna QIACube utilizando el kit RNeasy Plus Mini (Qiagen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante y en el Servicio de Genómica del IIBM.

En ambos casos la integridad y la concentración del ARN se determinaron con un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) en el Servicio de Genómica del IIBM.

6.2.1.Extracción de ARN

Para la extracción de ARN con Trizol se siguieron las recomendaciones del fabricante. Sobre la muestra, previamente disgregada en frío, se añadieron 800 µl de Trizol y se procedió a una homogeneización eléctrica a velocidad media. Se dejó durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación de los complejos proteicos y se centrifugó a 11.200 rpm y a 4°C durante 10 minutos para eliminar el material insoluble del homogeneizado. Para la separación de fases se añadió cloroformo (Merck) a una relación de 0,2ml:1 ml de Trizol, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. A continuación se centrifugó a 11.200 rpm durante 15 minutos y a 4°C. Tras este paso, el ARN quedó en la fase superior acuosa incolora que se separó y sobre la que se añadieron 5 µg de glucógeno (Invitrogen) para facilitar la precipitación del ARN. Se adicionó alcohol isopropílico (Merck) a una relación de 0,5 ml/1 ml de Trizol, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 11.200 rpm durante 10 minutos y a 4°C para la precipitación del ARN. A continuación se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con un volumen de etanol 75% igual al utilizado de Trizol. Se mezcló y centrifugó a 8.900 rpm durante 10 minutos a 4°C. Una vez retirado el sobrenadante, se dejó secar el precipitado al aire sin excederse en el tiempo de secado para evitar que disminuya la solubilidad. Por último se disolvió el ARN en 50 µl de agua libre de ARNasas (Sigma-Aldrich).

6.2.2. Tratamiento frente a ADNasas

Sobre los 50 µl de ARN se añadió el tampón de ADNasas a una relación 1:10 y se digirió con 1 µl de ADNasa para eliminar los restos de ADN genómico que pudieran interferir con las distintas técnicas. Se incubó a 37°C durante 30 minutos. Seguidamente se añadió un volumen 1:10 del reactivo de inactivación y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente agitando la muestra cada 15 segundos. Se centrifugó 2 minutos a 9.300 rpm y 4°C. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante y se conservó a -80°C.

6.2.3. Purificación de ARN

El procedimiento completo se realizó a temperatura ambiente y los pasos de centrifugación se hicieron a 20-25°C sin que la centrífuga estuviese nunca por debajo de 20°C.

El volumen de la muestra se ajustó a 100 µl con agua libre de ARNasas y se añadieron 350 µl de tampón RLT (Qiagen) suplementado con β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) en el momento. Tras mezclar con suavidad, el ARN se precipitó con 250 µl de etanol 100%. La solución, en fracciones de 700 µl, se pasó por columna centrifugando a 10.000 rpm durante 15 segundos. A continuación se lavó la membrana de la columna dos veces con volúmenes de 500 µl de tampón RPE (Qiagen) suplementado con etanol y centrifugación a 10.000 rpm durante 2 minutos descartando el filtrado entre ambos pasos de centrifugación. Por último se eluyó el ARN pasando dos veces por la columna un volumen de 50 µl de agua libre de ARNasas y centrifugando a 10.000 rpm durante 1 minuto. El ARN se conservó a -80°C hasta su utilización.

6.3. Estudio mediante *arrays*

6.3.1. Hibridación del ARN

Para analizar la expresión génica diferencial entre la cóclea del ratón *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} se utilizaron chip de alta densidad de oligonucleótidos GeneChip® Mouse Genome 430A2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU.). Estos *arrays* permitieron el estudio simultáneo de la expresión de unos 15.000 genes murinos representados por 22.690 pares de sondas de oligonucleótidos. Cada pareja de sondas se encuentra formada por un oligonucleótido de secuencia idéntica a la del ARNm de interés (*perfect match*) y un oligonucleótido que tiene un nucleótido cambiado en el centro de su secuencia (*mismatch*). La diferencia entre ambos permite discriminar entre hibridaciones específicas y no específicas. Se hibridaron un total de tres muestras de ARN de cóclea a E18,5 por cada genotipo.

Se aisló el ARN de la cóclea como se ha descrito en el apartado 6.2 y se comprobó que la integridad del ARN purificado era adecuada para su hibridación en *arrays*. En la Unidad de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de Salamanca (<http://www.cicancer.org/es/unidad-de-genomica>) el ARN se utilizó como molde para sintetizar ADN complementario de doble cadena con el sistema comercial SuperScript® One-Cycle

cDNA (Affymetrix). El ADNc resultante se transcribió *in vitro* a ARNc incorporando nucleótidos biotinizados. Una vez marcado el ARNc se fragmentó e hibridó con los *arrays* de oligonucleótidos. Por último los chips se tiñeron con el complejo estreptavidina-ficoeritrina y se escanearon para digitalizar la señal fluorescente (GeneChip® Scanner 3000, Affymetrix). La calidad de la hibridación se validó mediante controles de calidad internos utilizando genes constitutivos.

6.3.2. Análisis de datos

Para un correcto análisis de la expresión génica fue necesario corregir previamente el fondo y normalizar los niveles de expresión en todos los chips que se analizaron.

Existen diferentes algoritmos que calculan la señal de expresión a partir de los datos crudos generados por los *arrays* de alta densidad de oligonucleótidos. Para un análisis preliminar se eligieron los algoritmos MAS5 (MicroArray Suite 5.0) diseñado y recomendado por Affymetrix y el RMA (Robust Multi-array Average) (Irizarry et al., 2003). Los resultados del análisis indicaron una gran variabilidad reflejo de la variabilidad biológica e hibridación no específica. Durante esta etapa del desarrollo del oído interno, la mayoría de los genes específicos de tejido mantenían una baja expresión, mientras que los genes más comunes se expresaban normalmente y esto daba como resultado una mala relación entre el ruido debido al fondo y la señal, que hacía difícil distinguir los cambios de expresión génica.

La colaboración con la Dra. M. Milo (Universidad de Sheffield) nos permitió utilizar el *software* PUMA (Propagating Uncertainty in Microarray Analysis) (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/resources/puma/index.html>) para estimar el nivel de expresión de los genes. Este paquete informático se encuentra integrado en el proyecto Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) y utiliza nuevos modelos de probabilidad para analizar los datos generados por el tipo de *arrays* que se emplearon en nuestro estudio. Uno de estos modelos es el método de pre-procesamiento informático de datos multi-mgMOS (multi-chip modified gamma Model for Oligonucleotide Signal) (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/resources/puma/mmgmos/mmgmos.html>) basado en métodos de probabilidad que permiten obtener los niveles de expresión de los genes y las incertidumbres estimadas (Liu et al., 2005).

Además se analizó la relación o ratio de cambio (*fold change*) entre los distintos *arrays* en combinación con el algoritmo PPLR (Probability of Positive Log Ratio), incluido también en PUMA, que ayuda a reducir el número de falsos positivos dentro del análisis (Liu et al., 2006) (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/resources/puma/pplr/pplr.html>). PPLR asocia los valores probables (entre 0 y 1) a cada *log-ratio* y representa la probabilidad del *log-ratio* de ser positivo. Esta probabilidad es una medida de la detección de falsos positivos en la expresión diferencial y

permite ordenar los genes seleccionados por su expresión diferencial en función de la robustez de la predicción. En nuestro estudio se ha considerado que los genes diferencialmente sobre-expresados en los ratones *Igf1*^{-/-} son aquellos que presentan un *fold change* positivo mayor a 1 y con una probabilidad asociada mayor de 0,95 y los genes disminuidos diferencialmente expresados son aquellos que presentan un *fold change* menor a -1 y con una probabilidad asociada menor de 0,05.

Para determinar las funciones biológicas significativas según las anotaciones ontológicas GO (*Gene Ontology*) de los genes regulados por *Igf1* se realizó un análisis con FatiGO+ (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>) y PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>).

6.3.3. Análisis de Factores de Transcripción

En este análisis se eligieron algunos de los genes cuya expresión aparecía aumentada en la cóclea de los ratones *Igf1*^{-/-} para estudiar sus regiones promotoras. Los genes se seleccionaron por su expresión diferencial o por su asociación con déficits sensoriales en el hombre y se compararon con el software MEME (<http://meme-suite.org/>) para la identificación de motivos comunes. Se estudiaron las regiones promotoras de los siguientes genes: *Fgf15*, *Foxm1*, *Six6*, *Rorb*, *Rplh* y *Ush1c*. La elección de dichas regiones se hizo con el servicio PromoSer (<http://biowulf.bu.edu/zlab/PromoSer/>) para la identificación de promotores y sitios de inicio de la transcripción. Se delimitaron las zonas de interés de las regiones promotoras seleccionando 1,5 kilobases por delante y 50 pares de bases por detrás del sitio de inicio de la transcripción. Sólo se tuvieron en cuenta aquellos motivos que presentaban una correlación menor a 0,30 y los escogidos se analizaron utilizando la herramienta informática TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) para la predicción de sitios de unión a factores de transcripción en secuencias de ADN. Sólo se tuvieron en cuenta los sitios con mayor probabilidad de unión.

De forma similar se agruparon los genes cuya expresión disminuía en la cóclea de los ratones *Igf1*^{-/-} y se estudiaron las regiones promotoras en busca de posibles sitios de unión a factores de transcripción como se ha indicado anteriormente.

6.3.4. PCR en tiempo real

La obtención del material biológico empleado para esta técnica, así como la preparación del ARN se hicieron como ya se ha descrito en los apartados 6.1 y 6.2. Las muestras de cóclea de los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} fueron procesadas en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid (<http://www.fpcm.es/es/servicios-a-la-id/servicios/genomica>), mientras que las muestras de núcleos cocleares y hueso femoral procedentes de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} junto con las de cóclea de ratones *UBC-CreERT2*; *Igf1*^{fl/+} e *Igf1*^{fl/fl} se procesaron en el Servicio de Genómica del IIBM. El ADNc de las diferentes muestras se generó mediante transcripción

inversa (RT) (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems) a partir de la misma cantidad de ARN de partida y la PCR en tiempo real (qPCR) se realizó con el mismo sistema (7900HT Real-Time PCR System, Applied Biosystems) en ambos casos.

En el caso de las muestras de cóclea de los ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* el ADNc se hibridó en tarjetas microfluídicas o *arrays* de baja densidad (TaqMan® Low Density Arrays, Applied Biosystems) que contenían tres réplicas de cada una de las sondas TaqMan elegidas para el análisis de expresión de veinte genes seleccionados a partir de los datos obtenidos previamente con los *arrays*. Los genes se eligieron en función de su nivel de expresión en el *array* (*fold change*), el interés fisiológico y la disponibilidad de las sondas TaqMan® para dichos genes. Los genes seleccionados fueron: *Kcnd2*, *Cacna1f*, *Tub*, *Ush1c*, *Retnla*, *S100g*, *Trap1a*, *Akr1c13*, *Kif17*, *Uts2r*, *Shbg*, *Cntn2*, *Scgb1a1*, *Six6*, *Fibp*, *Fgf15*, *Slc19a2*, *Cldn18*, *Dnabj* y *Rp1h*. Además se utilizaron sondas para cuantificar la expresión temporal de los factores, receptores y proteínas de transporte del sistema IGF (*Igf1*, *Igf1r*, *Ins2*, *Igfbp2* e *Igfbp3*). Como control endógeno se utilizó el gen 18S ARN ribosomal de eucariotas (*Rn18S*). La expresión estimada de cada gen se calculó como $2^{-\Delta Ct}$, multiplicándose dicho valor por 10^6 para la representación gráfica de los resultados. De forma alternativa, la expresión génica se analizó en ensayos por triplicado mediante RT-qPCR con sondas líquidas TaqMan® (TaqMan® Gene Expresión Assays, Thermofisher Scientific) (<https://www.thermofisher.com/es/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays.html>). Se utilizó este tipo de sondas para el estudio de los siguientes genes: *Igf2*, *Irs2*, *FoxM1*, *Foxg1*, *Mash1*, *Mef2a*, *Mef2c* y *Mef2d*.

De la misma forma, se estudió la expresión génica de las muestras de núcleos cocleares y hueso femoral procedentes de ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* junto con las de cóclea de ratones *UBC-CreERT2*; *Igf1^{fl/+}* e *Igf1^{fl/fl}* analizándose por triplicado mediante RT-qPCR y utilizando las sondas TaqMan (TaqMan® Gene Expresión Assays) que se consideraron adecuadas a cada caso: i) para núcleo coclear: *Igf1*, *Igf2*, *Igf1r*, *Mef2a* y *Mef2d*; ii) para hueso femoral: *Igf1*, *Igf2*, *Igf1r*, *Irs2* y *Ptpn1*; iii) para cóclea: *Igf1*, *Igf2*, *Igf1r*, *Irs1*, *Irs2* y *Ptpn1*.

Los ensayos se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando como control endógeno para normalizar los resultados, uno o varios de los siguientes genes según el experimento: hipoxantina fosforribosil transferasa (*Hprt1*), proteína ribosomal P0 (*Rplp0*) o 18S (*Rn18S*). Los valores de cuantificación relativa (RQ) frente a la muestra calibradora se calcularon mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{muestra calibradora}}$ y los resultados se presentan como la media de $\log_{10} RQ$ o de $RQ \pm ESM$ considerándose significativos a $p < 0,05$. Cuando fue posible se realizó el estudio de la expresión génica y su análisis estadístico con el programa *RealTime StatMiner*® (Integromics, Waunakee, WI, EE.UU.; <https://www.integromics.com/statminer-qpcr-data-analysis/>). La significación estadística se

estimó mediante ANOVA o test de la t de Student previa prueba F de Fisher para confirmar la igualdad de varianzas.

Las sondas TaqMan® utilizadas en las tarjetas microfluídicas o en los ensayos individuales con sondas líquidas se detallan en la Tabla 3.

Gen	Sonda TaqMan®
<i>Akr1c13</i>	Akr1c13-Mm00657347_m1
<i>Cacna1f</i>	Cacna1f-Mm00490443_m1
<i>Cldn18</i>	Cldn18-Mm00517320_m1
<i>Cntn2</i>	Cntn2-Mm00516138_m1
<i>Dnajb7</i>	Dnajb7-Mm00498649_s1
<i>Fgf15</i>	Fgf15-Mm00433278_m1
<i>Fibp</i>	Fibp-Mm00517555_m1
<i>Foxg1</i>	Foxg1-Mm02059886_s1
<i>Foxm1</i>	Foxm1-Mm 00514924_m1
<i>Hprt1</i>	Hprt1 - Mm00446968_m
<i>Igf1</i>	Igf1-Mm00439561_m1
<i>Igf2</i>	Igf2 - Mm00439564_m1
<i>Igf1r</i>	Igf1r-Mm00802831_m1
<i>Igfbp2</i>	Igfbp2-Mm00492632_m1
<i>Igfbp3</i>	Igfbp3-Mm00515156_m1
<i>Ins2</i>	Ins2-Mm00731595_gH
<i>Irs1</i>	Irs1 - Mm01278327_m1
<i>Irs2</i>	Irs2-Mm03038438_m1
<i>Kcnd2</i>	Kcnd2-Mm00498065_m1
<i>Kif17</i>	Kif17-Mm00456740_m1
<i>Mash1</i>	Mash1-Mm03058063_m1
<i>Mef2a</i>	Mef2a-Mm01318991_m1
<i>Mef2c</i>	Mef2c- Mm00600423_m1
<i>Mef2d</i>	Mef2d-Mm00504931_m1
<i>Mpz</i>	Mpz-Mm00485139_m1
<i>Myo7a</i>	Myo7a-Mm00485371_m1
<i>Nes</i>	Nes-Mm00450205_m1
<i>Ptpn1</i>	Ptpn1 - Mm00448427_m1
<i>Retnla</i>	Retnla-Mm00445109_m1
<i>Rplp0</i>	Rplp0 - Mm01974474_g
<i>Rpl1h</i>	Rpl1h-Mm00803370_m1
<i>S100g</i>	S100g-Mm00486654_m1
<i>Scgb1a1</i>	Scgb1a1-Mm00442046_m1

<i>Shbg</i>	Shbg-Mm00839856_g1
<i>Six6</i>	Six6-Mm00488257_m1
<i>Slc19a2</i>	Slc19a2-Mm00499760_m1
<i>Syp</i>	Syp-Mm00436850_m1
<i>Trap1a</i>	Trap1a-Mm00495785_m1
<i>Tub</i>	Tub-Mm00499015_m1
<i>Ush1c</i>	Ush1c-Mm00458359_m1
<i>Uts2r</i>	Uts2r-Mm00520770_s1
<i>Vegfa</i>	Vegfa-Mm00437304_m1
<i>Vim</i>	Vim-Mm00449201_m1
<i>18S</i>	18S-Hs99999901_s1

Tabla 3. Sondas TaqMan® utilizadas en los ensayos de RT-qPCR.

7. Estudio de la expresión de proteínas

7.1. Muestra biológica

Para preparar los extractos de proteínas se utilizaron colecciones de cócleas de dos ratones obtenidas, diseccionadas y conservadas como se indica en los apartados 4.1 y 4.7. Las cócleas procedían de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} a distintas edades embrionarias (E15,5 y E18,5) y postnatales (P5, P15, P60 y P90).

Para el análisis mediante *Western blotting* se utilizaron entre tres y seis extractos de proteína independientes por genotipo y edad estudiada.

7.2. Extracción de proteína total de cóclea

Las colecciones de cócleas se homogeneizaron en 200 µl de tampón de lisis RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay; 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 g sodio deoxicolato, 0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EGTA) al que se añadió en el momento un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:100. Se calentó a 95°C durante 5 minutos con el fin de extraer la proteína que hubiera podido quedar atrapada en el hueso y se centrifugó a 11.800 rpm durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante y a los extractos de proteína de cóclea se les añadió tampón de carga preparado con β-mercaptoetanol. Antes de su conservación a -80°C se desnaturalizaron las proteínas a 95°C durante 10 minutos.

La medida de la concentración de proteína en los extractos de cóclea se hizo con el kit *Micro BCA™ Protein Assay Reagent* (ThermoFisher Scientific) según las recomendaciones del fabricante. La recta patrón se preparó con BSA y las muestras se midieron en el espectrofotómetro a 562 nm.

7.3. Extracción núcleo citoplasma de cóclea

Se utilizó el kit *NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (ThermoFisher Scientific) que permitió la separación de los extractos citoplasmático y nuclear a partir de las muestras de cóclea de E18,5 y P15. El tejido se homogeneizó con un primer reactivo de extracción de citoplasma CER I (10 µl/mg tejido), al que se había añadido previamente inhibidor de proteasas, y se incubó en hielo durante 10 minutos. A continuación se trató el extracto con un segundo reactivo de extracción de citoplasma CER II (5,5 µl/100 µl CER I) y se incubó en hielo durante 1 minuto. Se centrifugó a la máxima velocidad (13.000 rpm) durante 5 minutos y la fracción citoplasmática, contenida en el sobrenadante, se conservó en hielo hasta finalizar el procedimiento. El precipitado, que contiene la fracción nuclear, se disolvió con el reactivo de extracción nuclear NER con ciclos de agitación y enfriamiento que se sucedieron durante 40 minutos. Finalmente se centrifugó la muestra durante 10 minutos y se separó el sobrenadante o extracto nuclear. A los extractos de citoplasma y núcleo se le añadió tampón de carga preparado con β-mercaptoetanol para su posterior electroforesis y se desnaturalizaron las proteínas a 95°C durante 10 minutos. Se conservaron a -80°C hasta su utilización. La medida de la concentración de proteína se realizó como ya se ha descrito en el apartado anterior.

7.4. Western blotting

Se cargaron cantidades equivalentes de proteína y se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE de distinta concentración (8, 10 ó 15%) de acrilamida/bis acrilamida 40% (Bio-Rad, Hercules, Ca, EE.UU.) en función del peso molecular de la proteína a analizar. La electroforesis se realizó a 100 V durante 1-2 horas utilizando un tampón de electroforesis (100 ml Tris-Glicina 10x, 10 ml SDS 10% y hasta 1 l de agua ultra pura). Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Whatman® Westran® PVDF membranes, ThermoFisher Scientific), previamente equilibradas en metanol, utilizando un tampón de transferencia húmeda (100 ml de Tris-Glicina 10x, 200 ml de metanol y hasta 1 l de agua ultra pura). La transferencia se hizo a 350 mA durante 1 hora y 15 minutos empleando un aparato *Mini Trans Blot Cell* (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon durante dos horas a temperatura ambiente con tampón tris salino (TBS) con Tween 20 al 0,1% (TBS-T) y 5% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) o 5% de leche en polvo desnatada, para proteínas fosforiladas o no fosforiladas respectivamente. La incubación con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 4) se realizó en agitación a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos se diluyeron en TBS-T con BSA o leche al 5% en función de la solución de bloqueo empleada. El exceso de anticuerpo primario se retiró mediante tres lavados de 10 minutos en agitación con TBS-T. A continuación se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente y protegidos de la luz. La elección del anticuerpo secundario

dependerá de la especie animal en la que se generó el primario. Se utilizaron secundarios anti-ratón, anti-conejo (1:3500) (Bio-Rad) y anti-cabra (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EE.UU.). El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante cuatro lavados en agitación de 10 minutos con TBS-T y dos más de TBS. La detección de la señal de los anticuerpos para las distintas muestras de proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia enzimática utilizando el sustrato comercial Amersham ECL (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, EE.UU.). Las membranas se expusieron a películas autorradiográficas (Konica Minolta, Ramsey, NJ, EE.UU.) durante periodos de tiempo variables en función de los anticuerpos. Para determinar los niveles de carga de las muestras de cóclea, las membranas se incubaron posteriormente con otro anticuerpo que sirvió como control de carga en cada caso.

Para la cuantificación de las bandas obtenidas tras la exposición, se escanearon las películas y se midieron mediante densitometría las bandas específicas utilizando el software *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Los valores obtenidos se normalizaron primero con respecto al control de carga y después frente a la condición control a la que se dio un valor arbitrario de 100. La significación estadística se estimó mediante la prueba de la t de Student y los resultados se representan como media \pm ESM.

Anticuerpo	Tipo ¹	Proveedor/Referencia	Concentración
B-actina	MouM	Sigma/A5441	1:1000
Phospho-Akt (Ser473)	RbP	Cell Signaling/9271	1:1000
Akt1/2	GtP	Santa Cruz/sc-1619	1:1000
FoxM1	RbP	Santa Cruz/sc-500	1:1000
Histone H3	MouM	Upstate/05-499	0,5µg/ml
IGF1R (Tyr 1165/1166)	RbP	Santa Cruz/sc-101704	1:1000
IGF1Rβ	RbP	Santa Cruz/sc-713	1:1000
IRS2	RbP	Upstate/06-506	1:1000
MEF2A	RbP	Santa Cruz/sc-313	1:1000
MEF2C	GtP	Santa Cruz/sc-13266	1:250
MEF2D	MouM	BD Bioscience/610774	1:1000
p27^{Kip1}	MouM	BD Transduction Laboratories/610241	1:2500
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	MAPK	MouM	Cell Signaling/9216
p38 MAPK	RbP	Cell Signaling/9212	1:1000
p38α (C-20)	RbP	Santa Cruz/sc-535	1:1000
Phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204)	ERK	RbP	Cell Signaling/9101

p44/42 ERK	RbP	Cell Signaling/9102	1:1000
-------------------	-----	---------------------	--------

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de *Western blotting*. ¹ Tipo de anticuerpo: MouM, monoclonal de ratón; RbP, policlonal de conejo; GtP, policlonal de cabra.

Resultados

RESULTADOS

1. Determinación de parámetros bioquímicos y medida de peso corporal en ratones deficientes en *Igf1* durante el envejecimiento

Se midió el peso corporal de ratones *Igf1*^{+/+}, *Igf1*^{+/-}, e *Igf1*^{-/-} a 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad. En todos los genotipos se apreció un aumento del peso corporal dependiente de la edad, aunque fue menor en el caso del ratón *Igf1*^{-/-} (figura 10). La mayor ganancia de peso se produjo durante los primeros tres meses de vida en todos los casos, mientras que durante el segundo y tercer trimestre el peso corporal se mantuvo en el ratón *Igf1*^{-/-} y aumentó en los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-}. Finalmente, entre los 9 y 12 meses de edad, el peso disminuyó un poco en los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-}. El incremento de peso de los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-} fue estadísticamente significativo a todas las edades cuando se comparó con el peso de los ratones *Igf1*^{-/-}. En el caso de los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-} la comparación sólo fue significativa entre los 3 y 9 meses de edad.

Se midieron los niveles de glucosa en sangre en situación de ayuno entre el mes y el año de vida para cada uno de los genotipos (figura 10B). Los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-} mostraron valores similares de niveles de glucosa y se mantuvieron a lo largo del estudio. Sin embargo, los ratones *Igf1*^{-/-} presentaron niveles superiores al de los otros dos genotipos durante el primer mes de vida y luego disminuyeron progresivamente desde los 6 hasta los 12 meses de edad. Las comparaciones de estos datos entre los genotipos y a distintas edades no mostraron diferencias significativas.

Se analizaron los niveles de IGF-1 circulante mediante un ensayo de ELISA en el suero de ratones *Igf1*^{+/+}, *Igf1*^{+/-}, e *Igf1*^{-/-} a diferentes tiempos entre 1 y 12 meses de edad. Como era de esperar, no se detectó IGF-1 en los ratones *Igf1*^{-/-} a ninguna de las edades estudiadas (figura 10C). Los ratones *Igf1*^{+/-} presentaron valores medios de niveles de IGF-1 inferiores a los de los ratones *Igf1*^{+/+} ($p < 0,05$). Los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-} presentan una disminución progresiva de los niveles de IGF-1 entre las edades estudiadas estadísticamente significativa. En los ratones WT los niveles de IGF-1 varían desde (841±67 ng/ml) hasta (621±67 ng/ml, $p=0,04$) entre el primer y cuarto trimestre, respectivamente. Para las mismas edades, los niveles de IGF-1 circulante en ratones Hz se encuentran entre (619±46 ng/ml) y (481±30 ng/ml, $p=0,02$). Se comparó el descenso de los niveles de IGF-1 con los datos de umbrales auditivos en los distintos grupos de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-} entre el mes y el año de edad. Dicha comparación sugiere que existe una correlación negativa entre ambos parámetros (Pearson $r=-0,33$; $n=35$; $p < 0,05$).

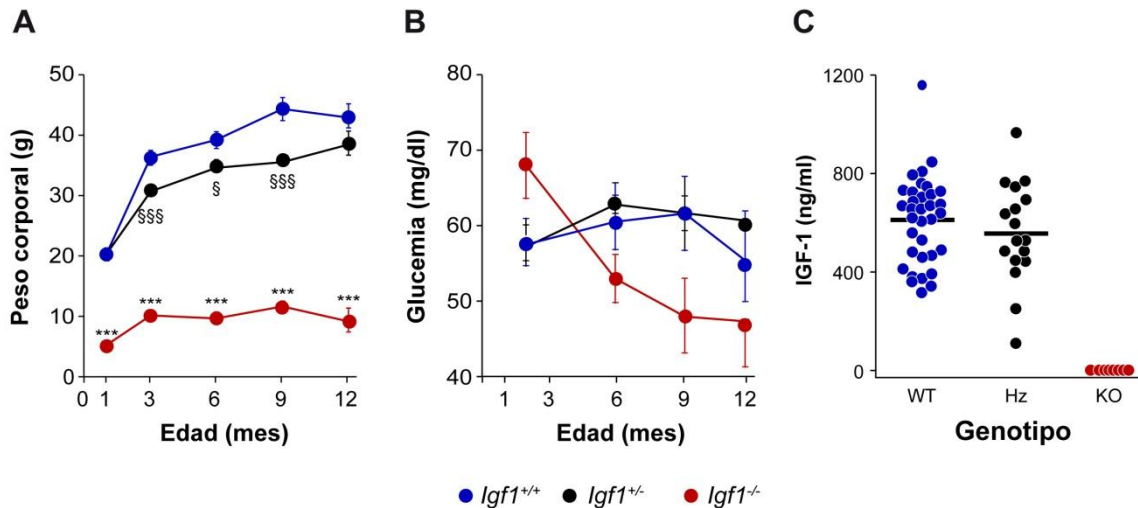


Figura 10. Evolución temporal del peso corporal, glucemia y niveles de IGF-1 en ratones *Igf1*^{+/+}, *Igf1*^{+/-}, e *Igf1*^{-/-}. (A) Se midió el peso de los ratones *Igf1*^{+/+} (azul), *Igf1*^{+/-} (negro) e *Igf1*^{-/-} (rojo). La comparación de los datos de peso corporal de los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-} frente a los *Igf1*^{-/-} fue estadísticamente significativa a todas las edades estudiadas (***, p<0,001), mientras que las comparaciones entre *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-} sólo fueron significativas en ratones entre 3 y 9 meses de edad (§§§, p<0,001; §, p=0,014). Se estudiaron al menos 80 ratones por genotipo. (B) Se midieron los niveles de glucemia en sangre de ratones *Igf1*^{+/+}, *Igf1*^{+/-} e *Igf1*^{-/-} sometidos a ayuno. Los niveles de glucosa en los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-} se mantuvieron a lo largo del estudio, mientras que en los ratones nulos disminuyeron. Las comparaciones entre los genotipos y las edades no fueron significativas. Para el estudio se midió la glucemia de al menos 28 ratones por genotipo. (C) Medida de los niveles de IGF-1 en suero. No se detectó nivel alguno de IGF-1 en suero en los ratones *Igf1*^{-/-} durante el estudio. Teniendo en cuenta todas las edades estudiadas, los valores medios de niveles de IGF-1 fueron inferiores en los ratones *Igf1*^{+/-} que en los *Igf1*^{+/+} (*, p=0,023). Los niveles de IGF-1 circulante se analizaron en al menos 8 ratones por genotipo.

2. Estudio de las funciones auditiva y vestibular en ratones deficientes en *Igf1* a distintas edades

Para estudiar el fenotipo auditivo de los ratones *Igf1*^{+/+}, *Igf1*^{+/-}, e *Igf1*^{-/-} se realizaron registros de PEATC a los 1, 3, 6, 9 y 12 meses de edad. Se testaron, al menos, seis ratones por genotipo y edad. Los umbrales auditivos resultantes del estudio de PEATC en respuesta a un estímulo tipo *click* en los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-} indicaron una función auditiva normal desde el mes hasta los seis meses de edad, mientras que los ratones *Igf1*^{-/-} presentaron una sordera profunda (figuras 11A,B). Las diferencias entre los umbrales auditivos de los ratones nulos respecto a los de los otros dos genotipos a 1, 3 y 6 meses de edad fueron estadísticamente significativas. En consonancia con lo anterior, el audiograma de los ratones *Igf1*^{-/-} presentaba umbrales elevados en respuesta a frecuencias puras (8-28 kHz). La comparación de los audiogramas a un mes de edad entre los ratones *Igf1*^{-/-} y los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-} mostraba diferencias muy significativas a todas las frecuencias estudiadas (figura 11C). Sin embargo, la

evolución de los umbrales de PEATC desde los 6 hasta los 12 meses de edad difería entre los ratones $Igf1^{+/+}$ e $Igf1^{+/-}$. Estos últimos presentaban un incremento de los umbrales auditivos a una edad más temprana, especialmente para las altas frecuencias, aunque no fue estadísticamente significativo cuando se comparó con los umbrales de los ratones $Igf1^{+/+}$ (figura 11C). A los 9 meses de edad los ratones $Igf1^{-/-}$ mantenían umbrales de PEATC en respuesta a un estímulo tipo *click* elevados y con diferencias significativas al ser comparados con cualquiera de los otros dos genotipos (figura 11B). Por último, los ratones $Igf1^{+/+}$, $Igf1^{+/-}$, e $Igf1^{-/-}$ a los 12 meses de edad presentaban incrementos similares en sus umbrales de PEATC en respuesta a estímulos tipo click y a tonos puros, sin que hubiera diferencias significativas entre ellos (figuras 11B,C).

Las pruebas vestibulares realizadas de forma paralela en los ratones $Igf1^{+/+}$, $Igf1^{+/-}$ e $Igf1^{-/-}$ y en distintos momentos temporales entre 1 y 5 meses de edad no evidenciaron cambios en el fenotipo vestibular (datos no mostrados). Los datos obtenidos indicaron que ninguno de los tres genotipos estudiados durante este periodo de tiempo presentaba alteraciones importantes de la función vestibular, mientras que los defectos auditivos de los ratones $Igf1^{-/-}$ persistían como ya se ha explicado anteriormente.

3. Estudio comparado de la anatomía del oído medio e interno en ratones deficientes en *Igf1*

No se encontraron alteraciones evidentes en la anatomía de los huesecillos que conforman el oído medio cuando se compararon martillo, yunque y estribo en los ratones $Igf1^{+/+}$, $Igf1^{+/-}$ e $Igf1^{-/-}$ de un mes de edad (figura 12). Tampoco se constataron variaciones en el tamaño de los huesecillos que de alguna manera reflejaran los cambios anteriormente descritos en el peso corporal de los tres genotipos.

El oído interno de los ratones $Igf1^{+/+}$ e $Igf1^{-/-}$ de un mes de edad presentaba una apariencia normal, aunque con una evidente disminución del tamaño del mismo en los ratones deficientes (figura 13). Esta variación en el tamaño afectaba tanto a la cóclea, cuya disminución ya había sido previamente descrita (Camarero et al., 2001), como a la conformación espacial del vestíbulo en el que los canales semicirculares aparecían ligeramente acortados en el ratón $Igf1^{-/-}$.

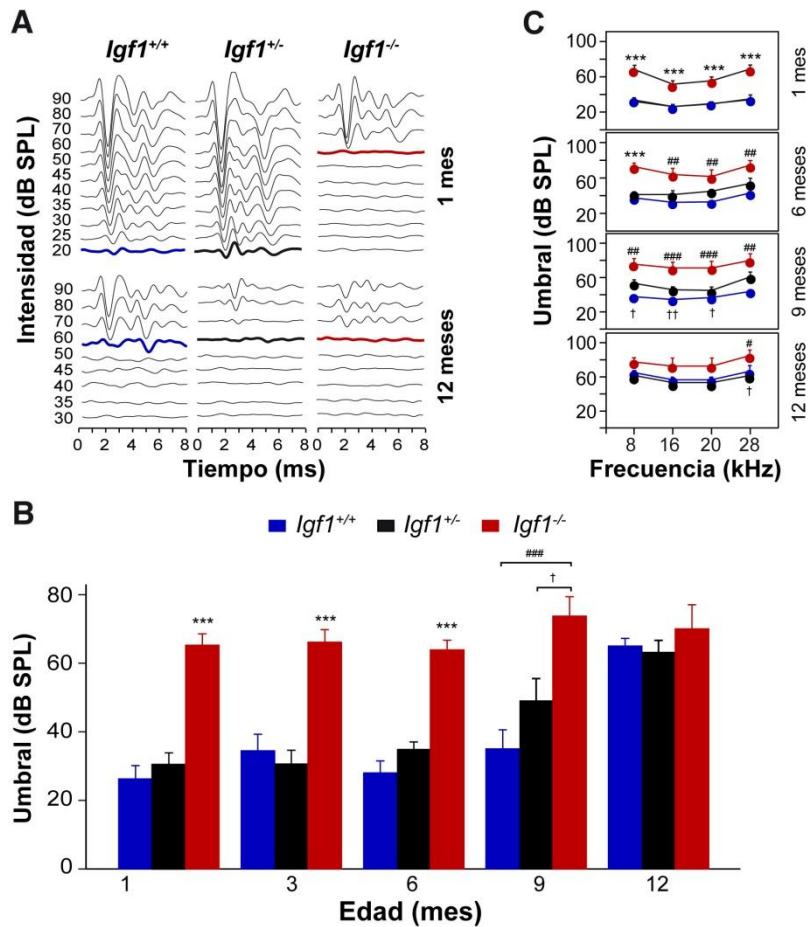


Figura 11. Pérdida auditiva en ratones *Igf1*^{+/+}, *Igf1*^{+/-}, e *Igf1*^{-/-}. (A) Registros representativos de PEATC en respuesta a estímulos de tipo click en ratones *Igf1*^{+/+} (columna izquierda) *Igf1*^{+/-} (columna intermedia) e *Igf1*^{-/-} (columna derecha) a 1 y 12 meses de edad. Durante el primer mes de edad los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-} mostraban un patrón normal de ondas de PEATC, mientras que en los ratones nulos se apreciaba una sordera congénita profunda. A los 12 meses los tres genotipos presentan una pérdida auditiva severa. (B) Umbrales de PEATC en respuesta a estímulos tipo click en ratones *Igf1*^{+/+} (azul) *Igf1*^{+/-} (negro) e *Igf1*^{-/-} (rojo) a diferentes edades. Los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-} mostraban un aumento en los umbrales auditivos asociado a la edad, mientras que los ratones *Igf1*^{-/-} eran sordos desde la edad más joven estudiada. ***, p<0,001; ###, p<0,001; †, p=0,033. (C) Umbrales de PEATC en respuesta a tonos puros (8-28 kHz) en ratones *Igf1*^{+/+}, *Igf1*^{+/-} e *Igf1*^{-/-}. Los audiogramas en los ratones *Igf1*^{-/-} fueron siempre elevados. ***, p<0,001; ###, p<0,001; ##, p=0,01 (6 meses, 16 y 28 kHz; 9 meses, 8 y 28 kHz) ó p=0,003 (6 meses, 20 kHz); #, p=0,046; ††, p=0,006; †, p=0,024 (9 meses, 8 kHz), p=0,013 (9 meses, 20 kHz) ó p=0,032 (12 meses, 28 kHz). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA y el test de Bonferroni. Los datos se presentan como la media±ESM. * indica la comparación entre *Igf1*^{-/-} y otros genotipos; # entre ratones *Igf1*^{-/-} e *Igf1*^{+/+}; † entre *Igf1*^{-/-} e *Igf1*^{+/-} y § entre *Igf1*^{+/-} e *Igf1*^{+/+}.

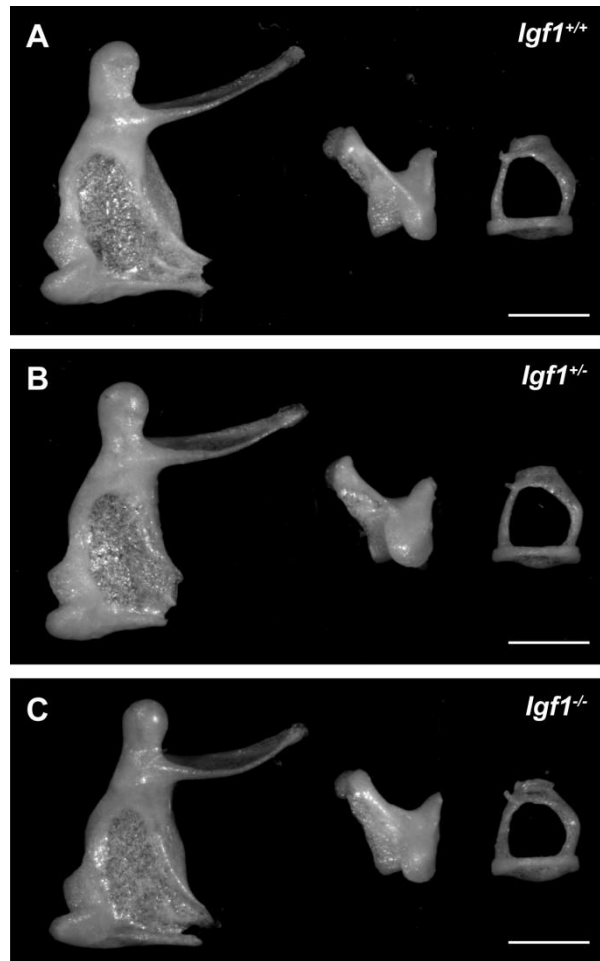


Figura 12. Anatomía del oído medio de los ratones *Igf1^{+/+}*, *Igf1^{+/-}* e *Igf1^{-/-}*. Martillo (izquierda), yunque (centro) y estribo (derecha) de los ratones *Igf1^{+/+}* (A), *Igf1^{+/-}* (B) e *Igf1^{-/-}* (C) al mes de edad. La comparación de los huesecillos entre los tres genotipos no puso de manifiesto ninguna diferencia evidente en su estructura o tamaño.

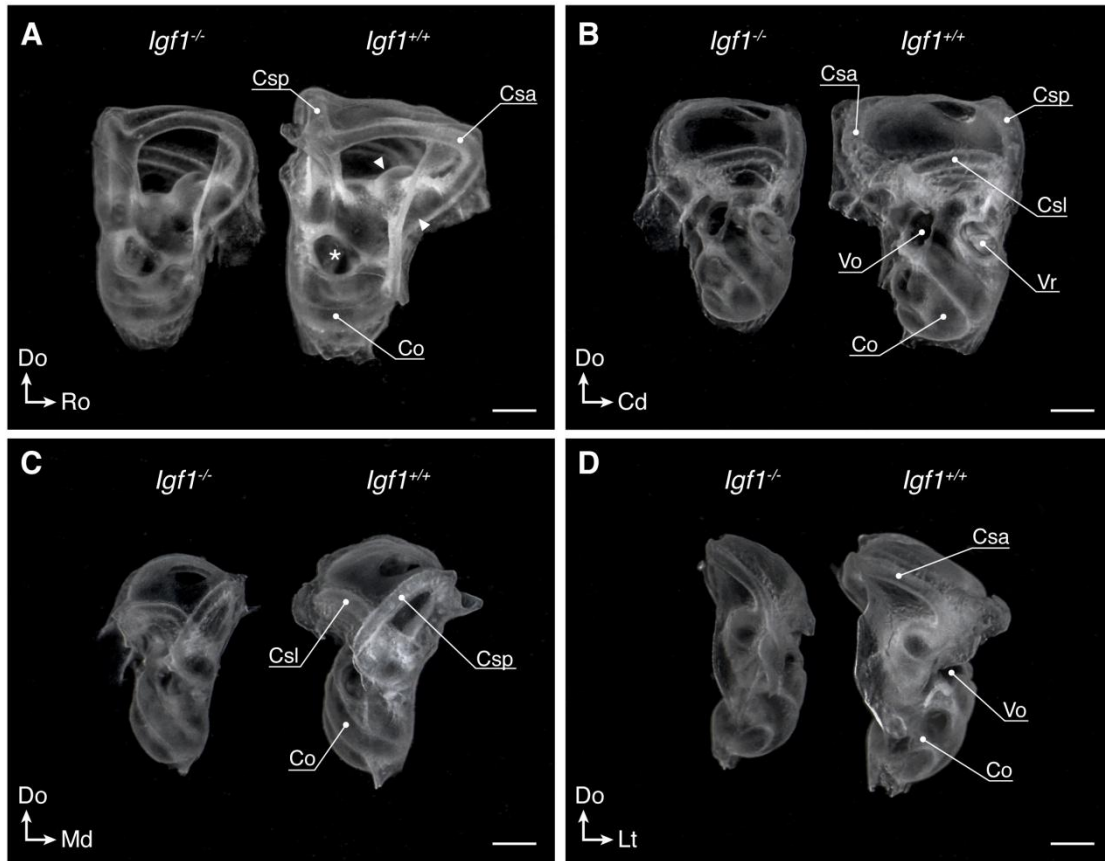


Figura 13. Anatomía del oído interno de los ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}*. (A-D) Imágenes tomadas tras el aclaramiento del oído interno de los ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* de un mes de edad. (A) vista medial, (B) vista lateral, (C) vista caudal y (D) vista rostral. El oído interno del ratón *Igf1^{-/-}* mostraba un aspecto normal, pero con un tamaño menor y diferencias en la conformación espacial con unos canales semicirculares acortados respecto a los del ratón *Igf1^{+/+}*. Abreviaturas: Co, cóclea; Csa, Csl y Csp, canales semicirculares anterior, lateral y posterior; Vo, ventana oval; Vr, ventana redonda; Cd, caudal; Do, dorsal; Lt, lateral Md, medial; Ro, rostral; Punta de flecha: ampulla ósea; asterisco, orificio del meato acústico interno, origen del VIII nervio craneal.

4. Disminución de la densidad neuronal del ganglio auditivo asociado a la edad en el ratón *Igf1^{+/+}* y degeneración de la estría vascular en el ratón *Igf1^{-/-}*

Se ha analizado la morfología de la cóclea en los ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* a los 3, 7 y 12 meses de edad. A las edades estudiadas, la citoarquitectura general de la cóclea fue similar en ambos genotipos, aunque las diferencias ya mencionadas relativas al tamaño coclear se mantienen entre genotipos. En algunos animales se apreció algún tipo de daño coclear de forma individual, pero en general los ratones mantuvieron intactas la estructura general de la cóclea y las células ciliadas externas e internas del órgano de Corti hasta el año de edad (figura 14A,B y figura 15). A esta misma edad, el ratón *Igf1^{+/+}* presentaba menos neuronas en el ganglio auditivo que ratones más jóvenes del mismo genotipo (figura 14C,E,G). Sin embargo, cuando se compararon ratones de un año de edad se observó que la densidad neuronal en el ganglio

auditivo era muy similar para los dos genotipos (figura 14C-H). Los ratones *Igf1^{+/+}* presentaban una pérdida de neuronas del ganglio auditivo con el envejecimiento y esta alteración anatómica podría estar relacionada con el aumento del umbral auditivo asociado a la edad. En los ratones *Igf1^{-/-}* no se observaron cambios evidentes en el ganglio auditivo durante el envejecimiento, lo cual estaba en consonancia con los resultados funcionales del estudio de PEATC, aunque a partir de los 3 meses de edad se producía una degeneración progresiva de la estría vascular que aparecía más corta y engrosada, con defectos en la vascularización como la dilatación de los capilares y que no se observaban en los ratones *Igf1^{+/+}* (figura R7A-H). En los ratones *Igf1^{-/-}* de 3 y 12 meses de edad, el marcaje de Kir4.1 (figura 16I-K) y Na-K-ATPasa (figura 16A,B,E,F) comparado al de los ratones *Igf1^{+/+}* reflejaba las importantes alteraciones de la estría vascular.

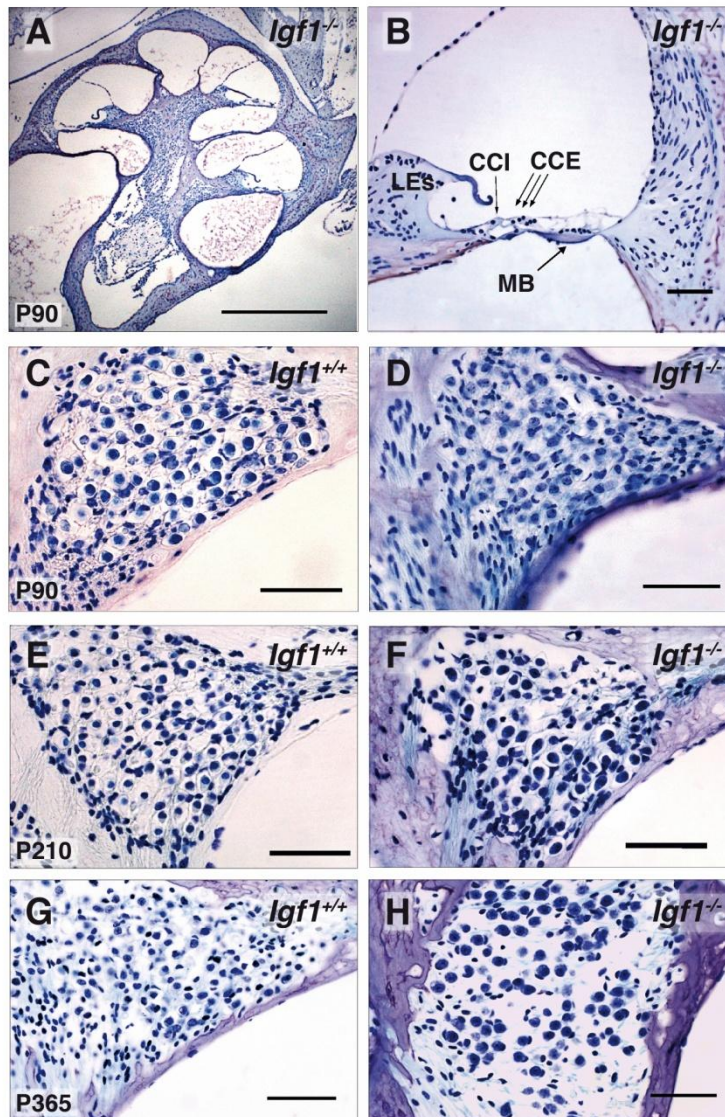


Figura 14. Estudio comparado de la morfología coclear durante el envejecimiento en ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-}. (A,B) Sección y primer plano de la vuelta basal de la cóclea pertenecientes a un ratón *Igf1*^{-/-} de 3 meses de edad. La disposición de los distintos tipos celulares en el órgano de Corti fue aparentemente normal. CCI, células ciliadas internas; CCE, células ciliadas externas; MB, membrana basilar; LEs, limbo espiral. (C-H) Comparación de la morfología del ganglio auditivo y su densidad neuronal para ambos genotipos y a las distintas edades estudiadas. Se observó una disminución en la densidad de neuronas del ganglio auditivo del ratón *Igf1*^{+/+} con el envejecimiento, de manera que, a los 12 meses de edad, la morfología del ganglio coclear era similar en ambos genotipos. Barra de escala 50 μm; 0,5 mm en (A).

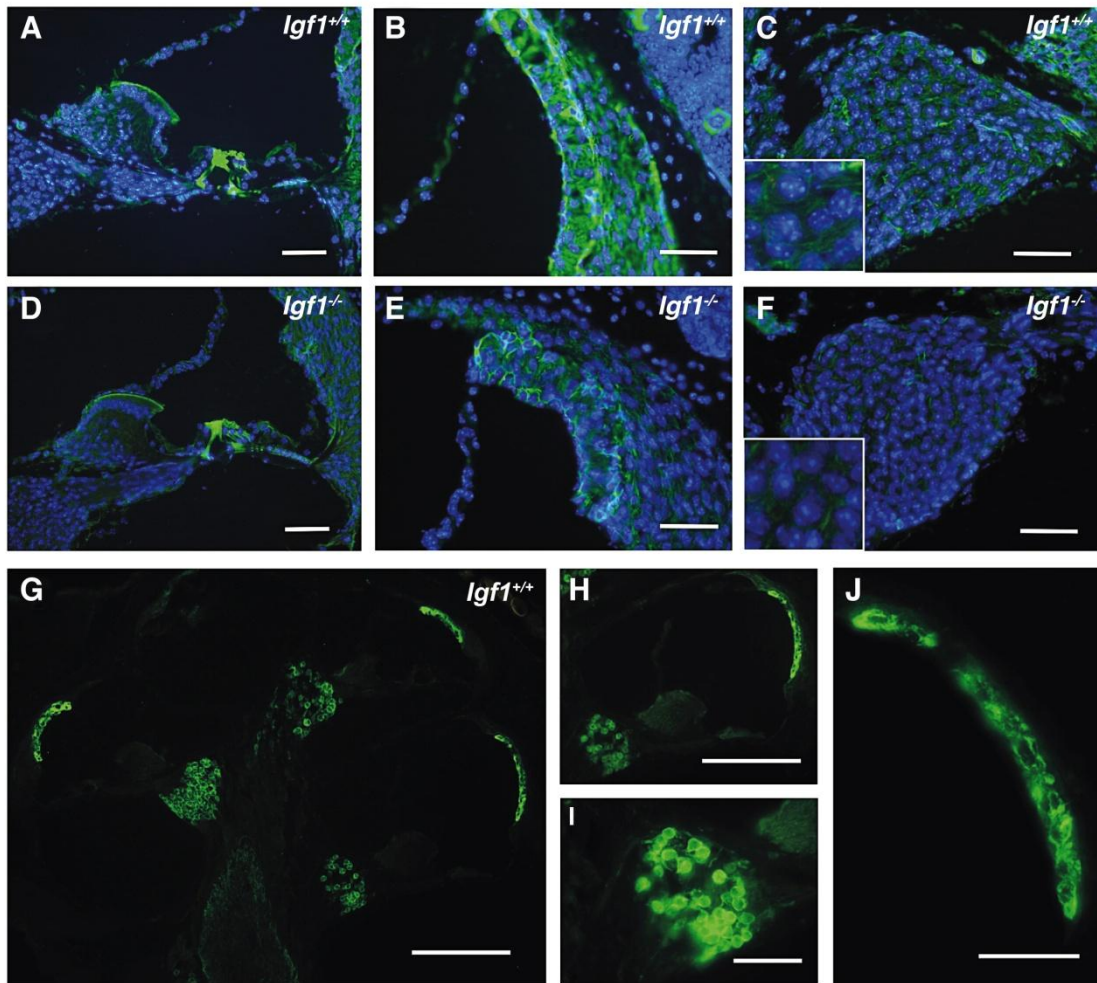


Figura 15. Estudio de la cóclea mediante histoquímica en ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* de 7 meses de edad. (A-C) La histoquímica de faloidina en la vuelta basal de la cóclea de los ratones *Igf1^{+/+}* era normal y se marcaron las células ciliadas y las células pilares del órgano de Corti. (D-F) Se observó una disminución en el tamaño de la escala media y la estría vascular de los ratones *Igf1^{-/-}*, aunque el marcaje con faloidina del órgano de Corti era normal. (B,E) La estría vascular del ratón *Igf1^{+/+}* era normal, a diferencia de la del ratón nulo. (C,F) Marcaje del ganglio auditivo de los ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}*. Los recuadros muestran amplificado detalle de los núcleos de las células del ganglio. Se analizaron de 4 a 6 ratones por condición. Barra de escala 50 μ m. (G-J) La inmunohistoquímica del canal de potasio Kir4.1 (KCNJ10) en el ratón *Igf1^{+/+}* puso de manifiesto la disminución en la densidad de neuronas del ganglio, especialmente en la base de la cóclea, y en algunas zonas de la estría vascular como consecuencia del envejecimiento.

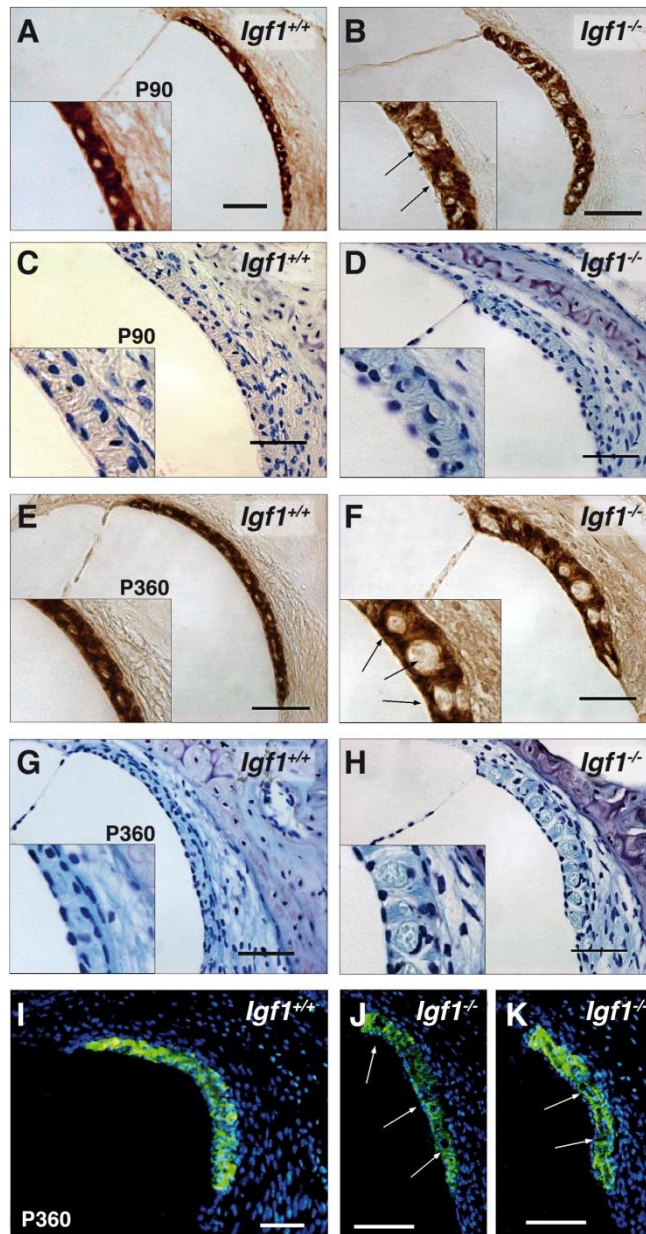


Figura 16. Estudio comparativo de la estría vascular durante el envejecimiento en los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-}. Tinciones de Na-K-ATPasa (A,B,E,F) y violeta de cresilo (C,D,G,H) en la estría vascular de ratones de 3 (A-D) y 12 (E-H) meses de edad en las que se muestran las diferencias morfológicas asociadas al envejecimiento para cada genotipo. La estría vascular en el ratón *Igf1*^{-/-} presentaba una morfología anómala, con engrosamiento y acortamiento de la misma y una dilatación evidente de los espacios vasculares (flechas). La expresión de Kir4.1 (I-K) en la estría vascular de los ratones nulos a los 12 meses de edad corroboraba dicha alteración y había una pérdida relativa de expresión en la estría. Se analizaron de 4 a 6 ratones por condición. Barra de escala 50 μ m.

5. Patrón de expresión de *Igf1* e *Igf1r* en la cóclea a edades prenatal y postnatal temprana

Estudios previos ya habían mostrado la expresión de IGF-1 mediante inmunotinción en distintas estructuras de la cóclea como la estría vascular, el limbo espiral y las células de soporte sensoriales, así como en subpoblaciones neuronales del ganglio auditivo a día postnatal (P)20 (Camarero et al., 2001). Sin embargo, puesto que el IGF-1 es una hormona secretada por el hígado, era importante determinar si se sintetizaba también en la cóclea o no. Para ello se realizó una hibridación *in situ* de *Igf1* e *Igf1r* en los estadios embrionarios (E) 15,5, E18,5 y postnatal P5 (figura 17). En los estadios E15,5 y E18,5 el epitelio auditivo se puede dividir en *greater epithelial ridge* (GER), que incluye una única fila de células ciliadas internas y *lesser epithelial ridge* (LER), que incluye tres filas de células ciliadas externas (figura 17A,B). A P5 (figura 17C) la estructura del órgano de Corti es muy similar a la del adulto. Los patrones de expresión temporal de *Igf1* e *Igf1r* observados se muestran de forma esquemática (figura 17A-C) coloreados en azul y rojo respectivamente.

A E15,5 el ARNm de *Igf1* se expresó claramente en el área correspondiente a la futura estría vascular y de forma más débil en aquellas áreas que dan lugar a la membrana de Reissner, el limbo espiral y el surco externo (figura 17D,G). A E18,5 *Igf1* todavía se visualizó de forma evidente en la estría vascular y el limbo espiral, mientras que su expresión fue más débil en el surco externo de la membrana de Reissner (figura 17E,H). La expresión de *Igf1* a P5 se encontraba más restringida y se detectó en las células marginales de la estría vascular y solapando con las células que expresan el canal de potasio Kir4.1 (figura 17F, I, I'). Se observó una expresión más débil en los surcos interno y externo.

Igf1r se expresaba de forma ubicua a E15,5, pero fue más fuerte en GER, LER y ganglio auditivo (figura 17J,M). La expresión de *Prox1* se usó para definir el LER (figura R8M) (Birmingham-McDonogh et al., 2006). El patrón de expresión se mantuvo similar a E18,5 (figura 17K,N), aunque fue más marcado en la zona apical del ganglio auditivo (figura 17K'). Al igual que antes, la expresión de *Igf1r* se restringía postnatalmente y aparecía en el surco espiral interno y en las células de Hensen, Claudius y basales de la estría vascular, en un patrón de expresión complementario al mostrado por *Igf1* (figura 17L,O,O'). A las edades estudiadas (E15,5, E18,5, P5 y P15) el patrón celular de expresión de *Igf1r* en la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-} no mostró ningún cambio cuando se comparó con la cóclea del ratón *Igf1*^{+/+} (figura 18). En la tabla 5 se muestra un resumen de la expresión.

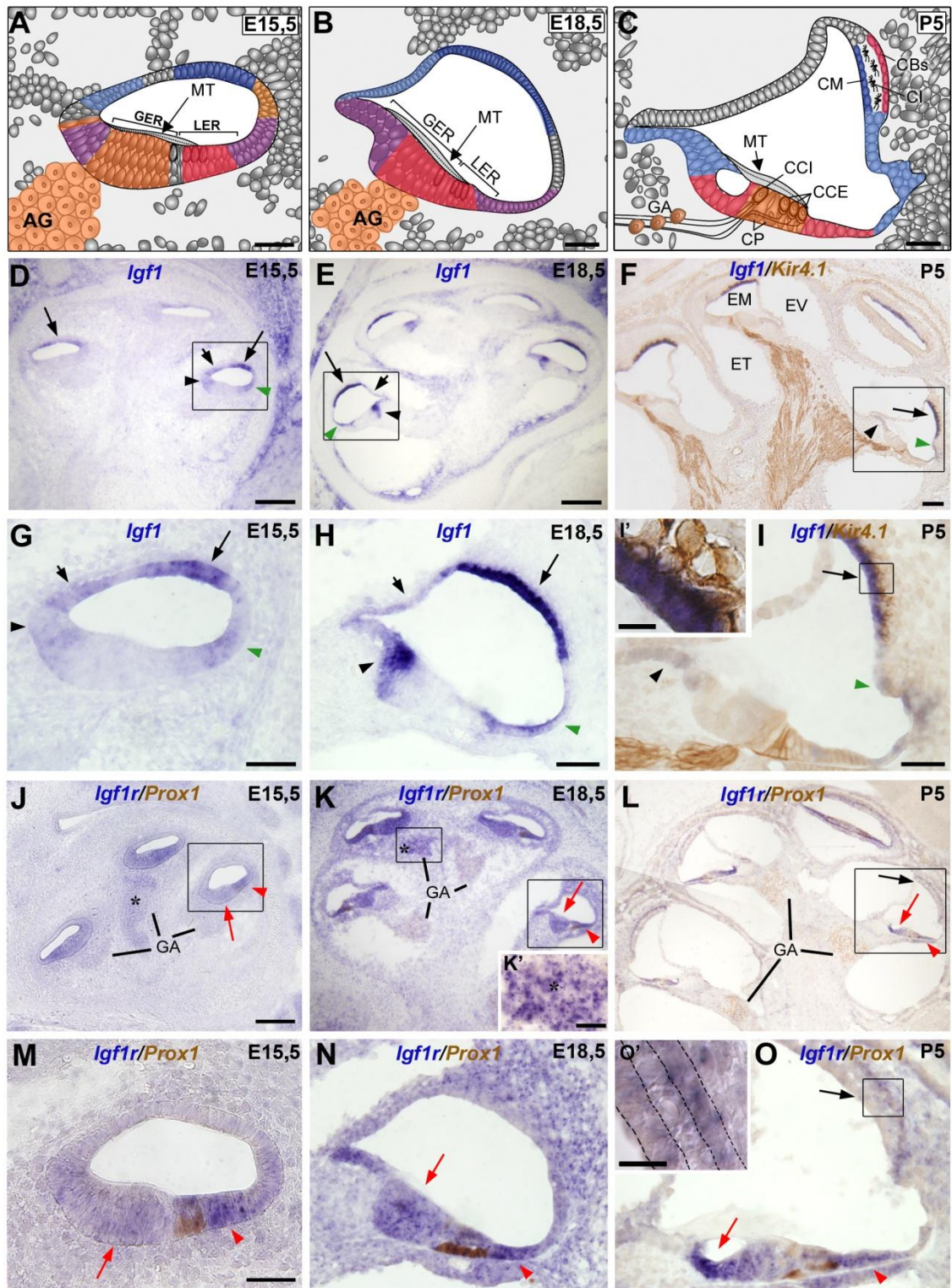


Figura 17. Expresión de ARNm de *Igf1* e *Igflr* en la cóclea. (A-C) Esquemas del órgano de Corti a E15,5, E18,5 y P5 que muestran la expresión de *Igf1* (en color azul), *Igflr* (naranja y rojo) o ambos (morado). (D-O) Hibridación *in situ* de *Igf1* (D-I, I') e *Igflr* (J-O, O') en embriones *Igf1*^{+/+} a E15,5 (D, G, J, M) y E18,5 (E, H, K, N) y en ratones *Igf1*^{+/+} a P5 (F, I, L, O). Se realizó una inmunotinción doble con anti-Kir4.1 para identificar las proyecciones neurales, la estría vascular y las células pilares (F, I, I') y con anti-Prox1 para identificar las células de Deiter, las células pilares y las neuronas auditivas (J-O, O'). (D-I)

La expresión de *Igf1* se localizó en la estría vascular (flecha negra larga), limbo espiral (cabeza de flecha negra), surco externo (cabeza de flecha verde) y membrana de Reissner (flecha negra corta). (J,K,M,N) A E15,5 y E18,5 *Igf1r* se expresaba en el GER (flecha roja) y en el LER (cabeza de flecha roja). (L,O) A P5 la expresión de *Igf1r* presentó un patrón complementario al de *Igf1* y se observó en el surco espiral interno (flecha roja) y en las células de Claudius y Hensen (cabeza de flecha roja). *Igf1r* se localizó también en el AG (asterisco en J,K,K') y en las células basales de la estría vascular (O'). Se probaron en paralelo tres embriones por genotipo y en tres experimentos diferentes. GER, *greater epithelial ridge*; LER, *lesser epithelial ridge*; MT, membrana tectoria; GA, ganglio auditivo; CCI, células ciliadas internas; CCE, células ciliadas externas; CP, células pilares; CM, células marginales; CI, células intermedias; CBs, células basales; EV, escala vestibular; EM, escala media; ET, escala timpánica. Barras de escala: 50 μ m (A,B,C); 150 μ m (D,E,F,J,K,L); 50 μ m (G,H,I,M,N,O); 10 μ m (I'); 20 μ m (O') y 30 μ m (K').

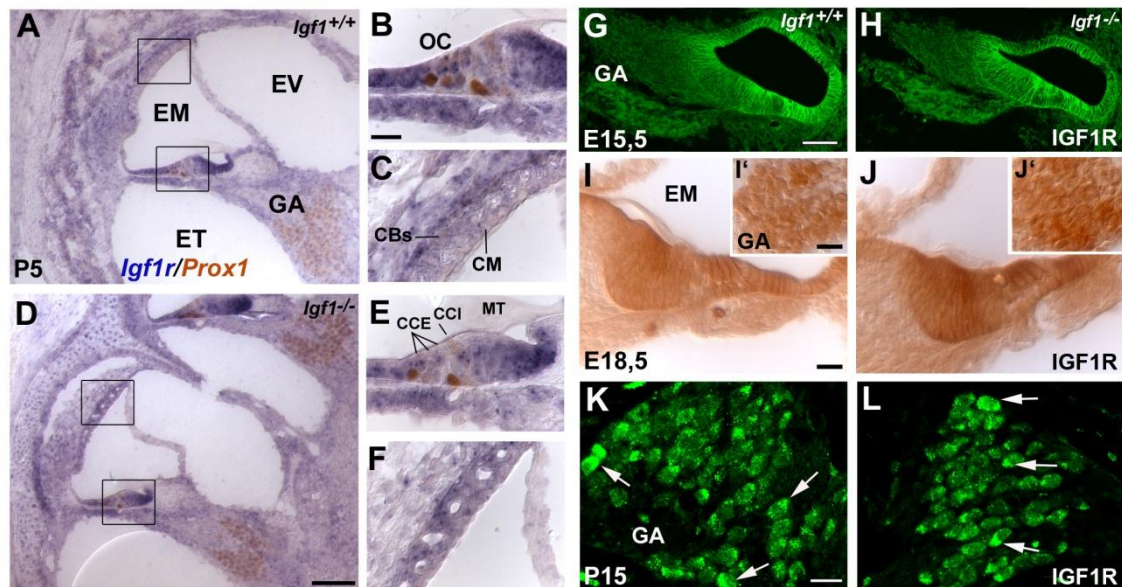


Figura 18. Patrón de expresión espacio-temporal de *Igf1r* y de la proteína IGF1R en la cóclea de los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-}. (A-F) La expresión de ARNm del gen *Igf1r* fue igual para ambos genotipos: *Igf1*^{+/+} (A,B,C) e *Igf1*^{-/-} (D,E,F) a P5. La expresión de IGF1R se localizó en el órgano de Corti y en el ganglio auditivo a E15,5 (G,H) y E18,5 (I,I',J,J') en ambos genotipos. A P15 se observó la expresión principalmente en las neuronas del ganglio auditivo (K,L), y tampoco se observaron diferencias a este edad. GA, ganglio auditivo; EV, escala vestibular; EM, escala media; ET, escala timpánica; OC, órgano de Corti CBs, células basales; CM, células marginales; CCI, células ciliadas internas; CCE, células ciliadas externas; MT, membrana tectoria. Barras de escala: 150 μ m (A,D); 20 μ m (B,C,E,F); 20 μ m (G,H); 100 μ m (I,J); 20 μ m (I'J'); 20 μ m (K,L).

6. Expresión de genes del sistema IGF y modulación de actividades quinasa en la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-}

Se estudiaron los perfiles de expresión temporal de distintos genes del sistema IGF en la cóclea de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} mediante PCR en tiempo real. Se seleccionaron los genes *Igf1*, *Igf1r*, *Ins2*, *Igf2*, *Igfbp2* e *Igfbp3* para el estudio de su expresión a distintos puntos temporales prenatales (E15,5 y E18,5) y postnatales (P5, P15, P30, P60 y P90). En los ratones *Igf1*^{+/+} la expresión de *Igf1* se mantenía alta durante el desarrollo, con una disminución postnatal moderada, mientras que en la cóclea de los ratones *Igf1*^{-/-} se encontraba ausente como era de esperar. La expresión de *Igf2* se mantenía alta durante el desarrollo y caía rápidamente tras el nacimiento. Los niveles de expresión de *Igf2* no mostraron diferencias significativas entre los ratones control y los mutantes en los distintos puntos temporales estudiados (datos no mostrados). La expresión de *Igf1r* en la cóclea de los ratones *Igf1*^{+/+} disminuyó drásticamente entre E15,5 a P5, y posteriormente volvió a aumentar de forma moderada con la edad (figura 19B). En la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-}, se observaba un aumento en la expresión de *Igf1r* respecto a la del animal control tras el nacimiento que se mantenía a lo largo del periodo estudiado. No se detectó *Ins2* en los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} a ninguna de las edades estudiadas (datos no mostrados). La expresión de IGFBP se ha descrito en la cóclea de diferentes especies (Cho et al., 2002; Park et al., 2007). A E15,5 se detectaron niveles elevados en la expresión de *Igfbp2* e *Igfbp3* en ambos genotipos, aunque la expresión disminuía de forma rápida en torno a la época perinatal. La cóclea del ratón *Igf1*^{-/-} mostraba una expresión ligeramente superior de dichos genes (figura 19C,D) (Tabla5).

La unión específica de IGF-1 a su receptor IGF1R conduce su fosforilación y a su consiguiente activación. Los aminoácidos fosforilados actúan como sitios de unión para distintas proteínas, como el sustrato del receptor de insulina tipo 2 (IRS2) (Taniguchi et al., 2006), que a su vez activarán diferentes rutas de señalización. Se estudiaron los niveles de activación de IGF1R e IRS2 en extractos proteicos de cóclea de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} a distintas edades (E15,5, E18,5, P5, P60 y P90) y se observó que la activación de IGF1R es menor en la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-} que en el control a todas las edades estudiadas (figura 20A,B). La tasa de unión a grupos fosfato por parte de IGF1R en el ratón *Igf1*^{-/-} aumentaba ligeramente (30%; $p < 0,05$) a partir de la edad E18,5 y hasta P90, cuando se comparaba frente al ratio de activación observado a P15 (figura 20C). No se detectaron cambios en los niveles de IRS2 a las edades estudiadas (figura 20D).

La señalización de IGF-1 se encuentra regulada por una red de mediadores intracelulares entre los que se incluye la vía de PI3K-AKT y la cascada de las MAP quinasas. En la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-} a E18,5 disminuían los niveles relativos de actividad de las formas fosforiladas de Akt Ser473 (31%; $p < 0,01$) y ERK1/2 (56%; $p < 0,05$), mientras que se

encontraban muy incrementados los de p38 MAPK fosforilada (261%; $p < 0,005$), cuando se comparaban con los encontrados en la cóclea del ratón *Igf1*^{+/+} (figura 20A,D). La activación de las rutas de Akt y ERK1/2 MAPK es esencial para la supervivencia y la proliferación celular, mientras que la de p38 MAPK forma parte de la respuesta celular al estrés que puede estar provocada por agentes como luz ultravioleta, calor, shock osmótico o citoquinas inflamatorias (Kumar et al., 2003). Estos datos indicaban que el déficit de IGF-1 a E18,5 disminuía la actividad de las vías que controlan la proliferación celular y la supervivencia, mientras que aumentaban las relacionadas con la respuesta celular al estrés.

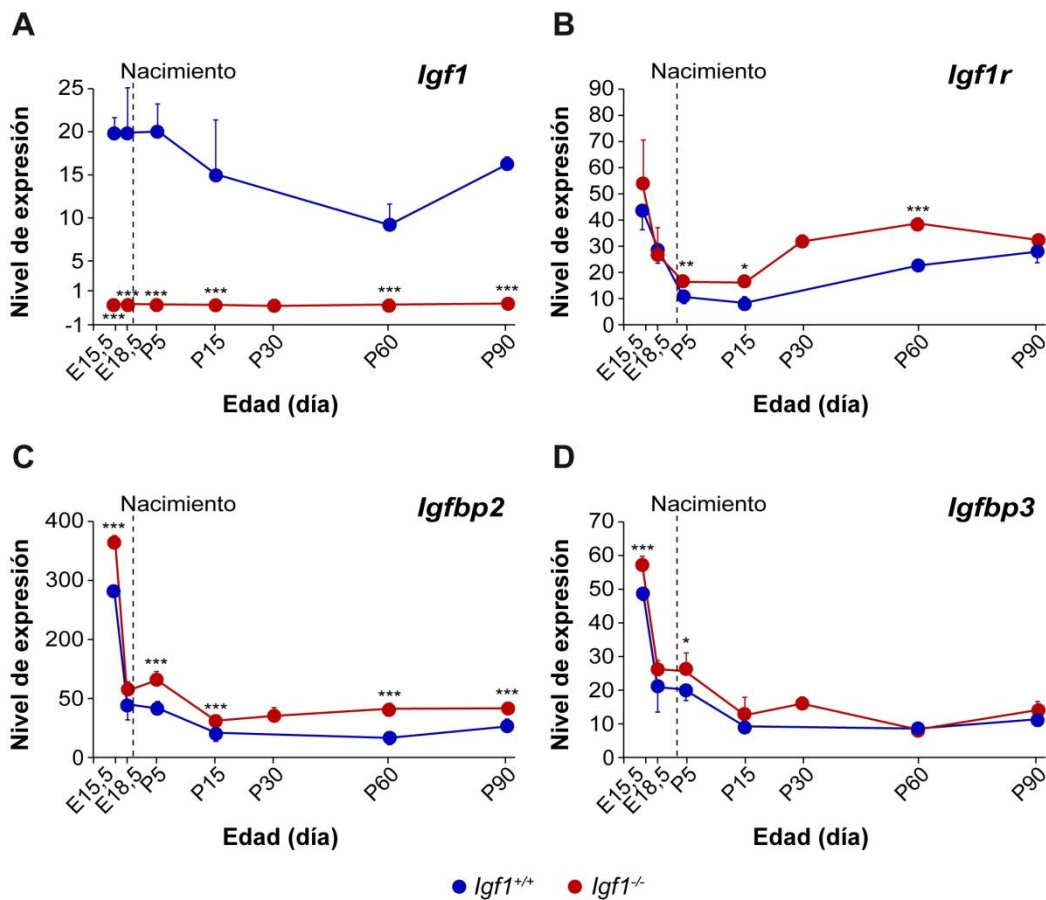


Figura 19. Curso temporal de la expresión de ARNm en genes del sistema IGF en la cóclea de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} a E18,5. (A-D) Niveles de expresión de ARNm de los genes *Igf1*, *Igf1r*, *Igfbp2* y *Igfbp3* mediante PCR en tiempo real en ratones *Igf1*^{+/+} (azul) e *Igf1*^{-/-} (rojo) a edad prenatal (E15,5 y E18,5; n=8) y postnatal (P5, P15, P30, P60 y P90; n=6). Como control endógeno se utilizó el gen *Rn18S*. La expresión estimada de los genes se calculó como $2^{-\Delta C_t} \times 10^6$. (A) La expresión de *Igf1* era alta en la cóclea del ratón *Igf1*^{+/+} e inexistente en la del ratón nulo. (B) La expresión de *Igf1r* disminuía de forma marcada en la cóclea del ratón *Igf1*^{+/+} entre E15,5 y P5, aumentando posteriormente con la edad. En la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-}, *Igf1r* seguía un patrón similar al anterior, pero presentaba niveles superiores en todos los puntos de edad estudiados. Los niveles de ARNm de *Igfbp2* (C) e *Igfbp3* (D) eran elevados a E15,5 para disminuir de forma drástica a continuación y sus perfiles eran ligeramente superiores en la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-}.

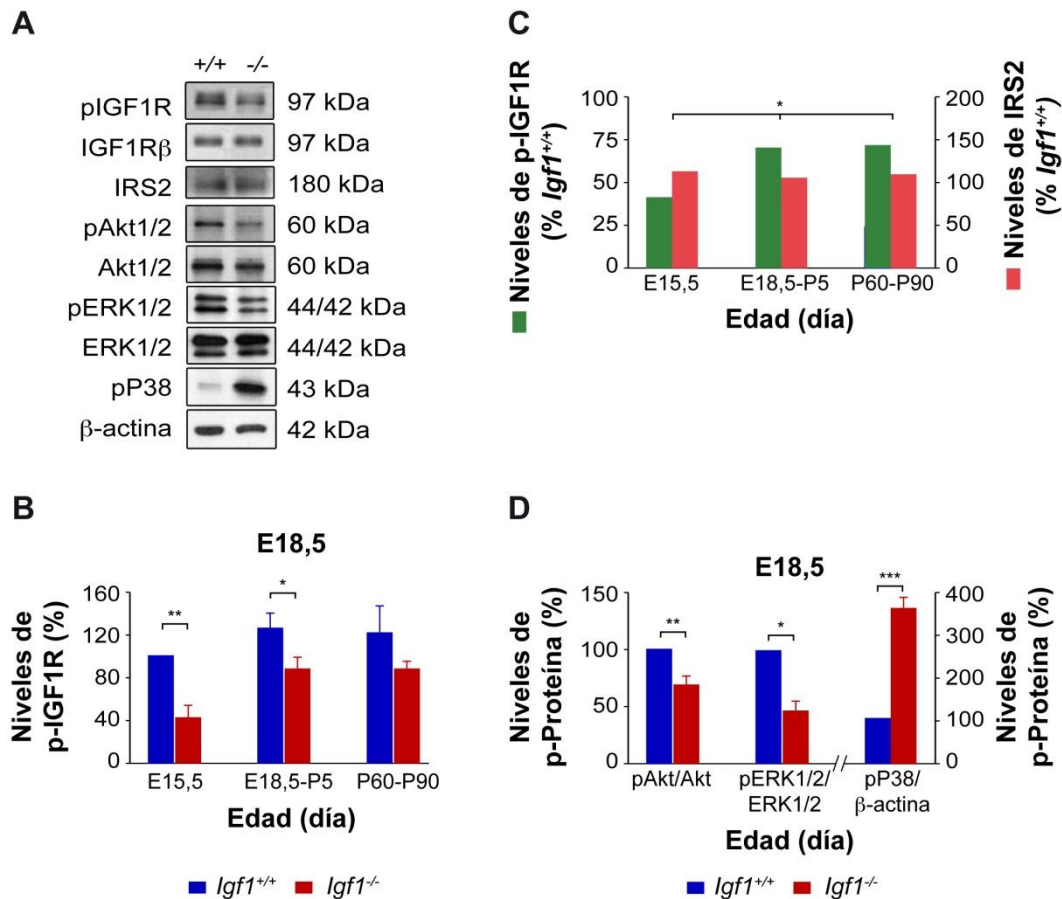


Figura 20. Niveles de activación de los mediadores de la señalización en la cóclea de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} a E18,5. (A) Las imágenes de *Western blotting* mostraron que IGF-1 modulaba la activación de IGF1R, ERK, Akt y p38 MAPK e E18,5. (B) La deficiencia de IGF-1 modificaba los niveles de activación de IGF1R desde la etapa embrionaria hasta postnatal. Los extractos proteicos obtenidos de cócleas de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} a E15,5, E18,5, P5, P60 y P90 (n=6; procedentes de, al menos, dos experimentos diferentes) se analizaron mediante técnicas de inmunodetección para estimar la presencia de la forma activada de IGF1R. Se utilizó IGF1R como control de carga. Las bandas específicas se midieron mediante densitometría con el software *ImageJ* para cuantificar el nivel de expresión. Los resultados se normalizaron y a la expresión detectada para el extracto coclear del ratón *Igf1*^{+/+} a E15,5 se le asignó un valor arbitrario igual a 100. Barras azules: ratón *Igf1*^{+/+}; barras rojas: ratón *Igf1*^{-/-}. (C) De la misma forma se estudiaron los niveles de p-IGF1R e IRS2 en extractos proteicos de cóclea de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} a E15,5, E18,5, P5, P60 y P90. Los datos se presentan como el porcentaje del nivel de proteínas en el ratón nulo frente al *Igf1*^{+/+}. Barras verdes: expresión de p-IGF1R; barras naranjas: expresión de IRS2. (D) Para determinar los niveles de las formas activadas de Akt^{Ser473}, ERK y p38 MAPK, se analizaron mediante inmunodetección extractos de proteína de cóclea de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} a E18,5. Como controles de carga se utilizaron β-actina y las formas no activadas de AKT y ERK1/2. Tras el revelado las películas se escanearon, se cuantificaron con el software *ImageJ* y los niveles se normalizaron tomando como referencia las muestras del ratón *Igf1*^{+/+} (valor=100). Los valores se presentan como media±ESM de, al menos, tres experimentos diferentes y 6 ratones por condición para Akt, ERK y p38 MAPK. Barras

azules: ratón *Igf1*^{+/+}; barras rojas: ratón *Igf1*^{-/-}. La significación estadística en todos los casos se estimó mediante la prueba de la t de Student: ***p<0,005; **p<0,01; *p<0,05.

7. Expresión de genes del sistema IGF en diferentes tejidos del ratón deficiente en *Igf1* y en la cóclea del ratón deficiente en *Igf1r*

Se estudio la expresión de distintos genes del sistema IGF en el hueso femoral y en los núcleos cocleares procedentes de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-}, así como en la cóclea de los ratones *UBC-CreERT2; Igf1r*^{fl/+} e *Igf1r*^{fl/fl} entre los 2 y 4 meses de edad para determinar los efectos de la deficiencia de *Igf1* en otros tejidos y de *Igf1r* en la cóclea, además de la posible compensación por parte de otros componentes del sistema IGF en respuesta a dichos déficits (Tabla 5).

La expresión de *Igf2*, *Igf1r* e *Irs2* se encontraba aumentada en el fémur del ratón *Igf1*^{-/-} en comparación con el ratón *Igf1*^{+/+}, mientras que no se modificaba la expresión del gen *Ptpn1*. Este gen codifica la síntesis de una proteína tirosina fosfatasa que regula de forma negativa la señalización del sistema IGF, conduciendo a la inactivación de los receptores de IGF-1 e insulina (IGF1R e IR) y bloqueando la señal en pasos posteriores de la ruta (figura 21A).

Se estudió la expresión de *Igf1*, *Igf2* e *Igf1r* en los núcleos cocleares de ratones *Igf1*^{+/+}, *Igf1*^{+/-} e *Igf1*^{-/-} en edad adulta. Los niveles de *Igf1* en el ratón deficiente en este tejido, al igual que en la cóclea, eran prácticamente inexistentes. La expresión de *Igf1r* aumentaba significativamente en el ratón *Igf1*^{+/-} respecto a los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-}. No se detectaron cambios significativos en la expresión de *Igf2* entre genotipos (figura 21B).

En la cóclea de los ratones *UBC-CreERT2; Igf1r*^{fl/+}, que son modelos deficientes condicionales en *Igf1r*, disminuyó la expresión de *Igf1r* un 40% respecto a la encontrada en los ratones control *Igf1r*^{fl/fl}. No se encontraron cambios significativos en la expresión de los genes que codifican para la síntesis de los factores *Igf1* e *Igf2* o de los sustratos del receptor de insulina *Irs1* e *Irs2* cuando se compararon ambos genotipos. La expresión de *Ptpn1* aumenta en la cóclea de los ratones *UBC-CreERT2; Igf1r*^{fl/+} de forma ligera, aunque significativa (figura 21C)

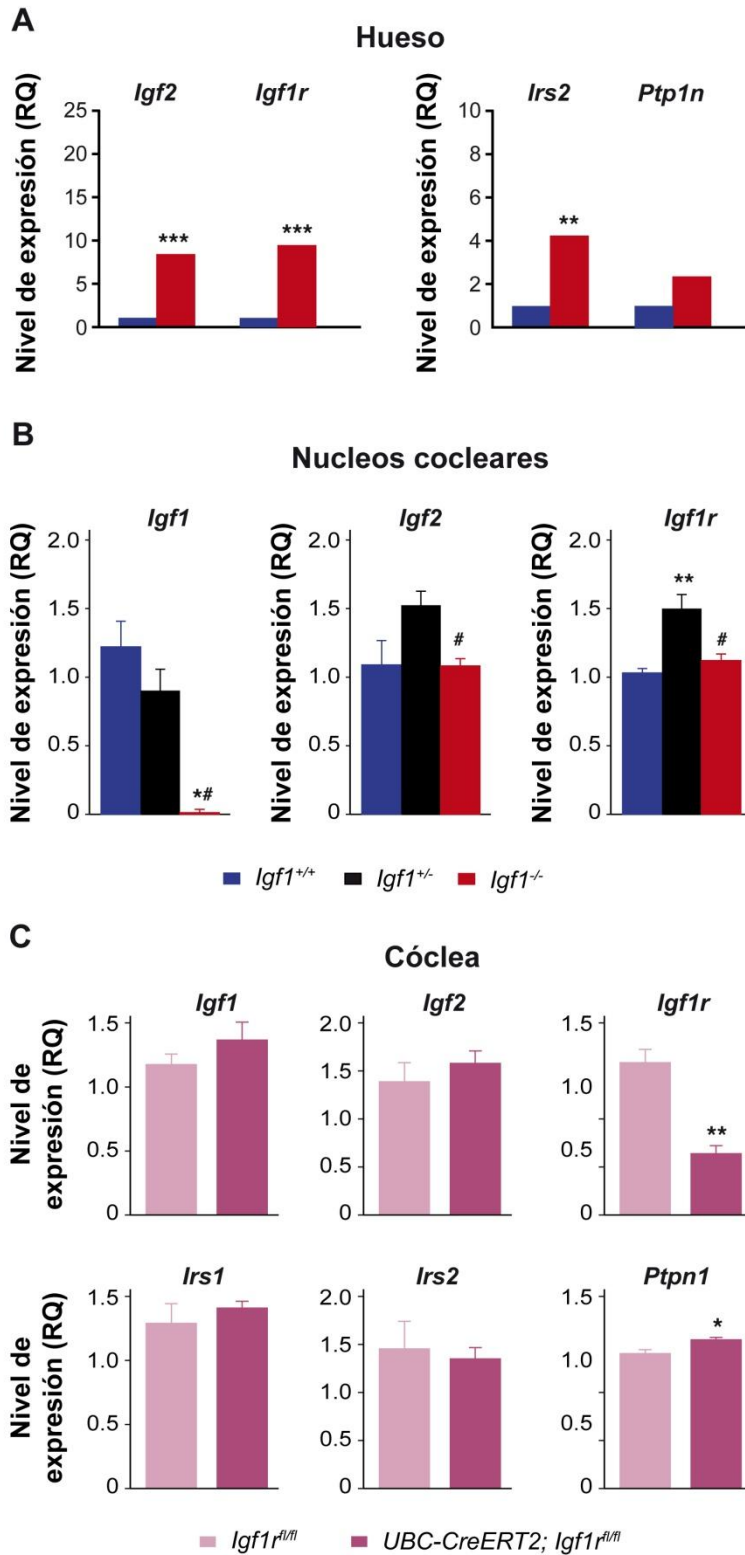


Figura 21. Determinación mediante RT-qPCR de la expresión génica de elementos del sistema IGF en distintos tejidos y modelos animales. (A) Los niveles de expresión de *Igf2*, *Igf1r* e *Irs2* se midieron en muestras de fémur de ratones *Igf1*^{+/+} (barras azules) e *Igf1*^{-/-} (barras rojas) de entre 2 y 3 meses de edad. Se observó un aumento de expresión de *Igf2*, *Igf1r* e *Irs2* en el ratón nulo respecto al control y no había cambios significativos en la expresión de *Ptpn1*. Se utilizaron 5 ratones por genotipo para el experimento. Como gen endógeno para normalizar los resultados de expresión se utilizó el gen de la

proteína ribosomal P0 (*Rplp0*). Los resultados se representan como la media de RQ±ESM. Se utilizó el software *RealTime Statminer*® para el estudio de la expresión génica y el cálculo del p-valor ajustado, considerándose significativo cuando $p < 0,05$. (B) Los niveles de expresión de ARNm de *Igf1*, *Igf2* e *Igf1r* se estudiaron en los núcleos cocleares de ratones *Igf1*^{+/+}, *Igf1*^{+/-} e *Igf1*^{-/-} de 4 meses de edad. La expresión de *Igf1* disminuyó en el ratón deficiente respecto a los otros dos genotipos. La expresión de *Igf2* se mantuvo similar en la comparación entre genotipos y la de *Igf1r* disminuía en el ratón *Igf1*^{-/-} respecto al ratón *Igf1*^{+/-}. Se utilizaron al menos 3 ratones por genotipo en el experimento. Como genes endógenos se utilizaron el gen 18S (*Rn18S*) y la hipoxantina fosforribosil transferasa (*Hprt1*). Los resultados de expresión génica se calcularon mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se representan como la media de RQ±ESM. La significación estadística se estimó mediante ANOVA y prueba de la t de Student y los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$. * indica la comparación frente a *Igf1*^{+/+}; # frente a *Igf1*^{+/-}. (C) Se determinaron los niveles de expresión de los genes *Igf1*, *Igf2*, *Irs1*, *Irs2* y *Ptpn1* en la cóclea de los ratones *UBC-CreERT2*; *Igf1r*^{fl/+} y los utilizados como control *Igf1r*^{fl/fl} a los 2 meses de edad. Ambos genotipos fueron previamente tratados con tamoxifeno. Se utilizaron 3 ratones por genotipo para el experimento. Como gen endógeno para normalizar los resultados de expresión se utilizó el gen de la proteína ribosomal P0 (*Rplp0*). Los resultados se representan como la media de RQ±ESM. La significación estadística se estimó mediante la prueba de la t de Student y los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$. * indica la comparación frente a *Igf1r*^{fl/fl}.

Gen	Órgano	Edad	Patrón expresión	Expresión relativa	
				<i>Igf1</i> ^{-/-} (1)	<i>Ubc-CreERT2</i> ; <i>Igf1r</i> ^{fl/+} (2)
<i>Igf1</i>	Cóclea	E15,5	Esv, MR, LiE y SE	0,00	
		E18,5	Esv y LiE. Menor en MR.	0,00	
		P5	CCM y LiE. Menor SI y SE.	0,00	
		P15		0,00	
		P60		0,00	1,17
		P90		0,00	
	Núcleos cocleares	P120		0,00	
	Retina	P180		0,00	
		P300		0,00	
		P360		0,00	
<i>Igf2</i>	Cóclea	P60			1,13
	Fémur	P60-P90		8,42	
	Núcleos cocleares	P120		0,99	
	Retina	P180		0,89	
		P300		1,6	
P360			1,33		
<i>Ins1</i>	Núcleos cocleares	P120		1,01	
	Retina	P180		1,11	
		P300		1,22	
		P360		0,49	
<i>Ins2</i>	Núcleos cocleares	P120		0,14	
	Retina	P180		0,68	
		P300		0,62	
		P360		1,4	
<i>Igf1r</i>	Cóclea	E15,5	GER, LER y GA	1,27	
		E18,5	GER, LER y zona apical del GA	0,93	
		P5	SI, CH, CC y CBs	1,70	
		P15		1,87	
		P60		2,05	0,40
		P90		1,10	
	Fémur	P60-P90		9,31	
	Núcleos cocleares	P120		1,08	
	Retina	P180		1,14	
		P300		1,21	
		P360		1,52	

Gen	Órgano	Edad	Patrón expresión	Expresión relativa		
				<i>Igf1</i> ^{-/-} (1)	<i>UBC-CreERT2</i> ; <i>Igf1r</i> ^{fl/+} (2)	
<i>Insr</i>	Núcleos cocleares	P120		0,77		
		P180		1,28		
	Retina	P300		1,18		
		P360		1,67		
<i>Igfbp2</i>	Cóclea	E15,5		1,32		
		E18,5		1,55		
		P5		2,50		
		P15		1,50		
		P60		2,66		
		P90		1,60		
	Núcleos cocleares	P120		0,52		
<i>Igfbp3</i>	Cóclea	E15,5		1,38		
		E18,5		1,19		
		P5		1,30		
		P15		1,12		
		P60		0,96		
		P90		1,07		
	Núcleos cocleares	P120		1,19		
		P180		0,95		
		Retina	P300		1,38	
			P360		1,28	
<i>Irs1</i>	Cóclea	P60		1,08		
	Núcleos cocleares	P120		0,91		
		P180		1,1		
	Retina	P300		1,22		
		P360		1,92		
<i>Irs2</i>	Cóclea	P60		0,93		
	Fémur	P60-P90		4,17		
	Núcleos cocleares	P120		0,86		
		P180		1,02		
	Retina	P300		1,46		
		P360		1,84		
<i>Ptpn1</i>	Cóclea	P60		1,09		
	Fémur	P60-P90		2,29		
	Núcleos cocleares	P120		0,64		

Tabla 5. Expresión de elementos del sistema IGF en distintos tejidos y edades. El patrón de expresión se observó mediante técnica de hibridación *in situ* y la expresión relativa se cuantificó mediante RT-qPCR. (1) indica la comparación entre la expresión del ratón *Igf1*^{-/-} frente a la de su control *Igf1*^{+/+}. (2) indica la comparación entre la expresión del ratón *UBC-CreERT2; Igf1r*^{fl/+} frente a la de su control *Igf1r*^{fl/fl}. Los resultados de expresión génica se calcularon mediante el método de 2^{-ΔΔCt} (RQ) y para la comparación entre genotipos se adjudicó el valor de 1 a los datos del control. Abreviaturas: CB, células basales; CC, células de Claudius; CH, células de Hensen; CM, células marginales; Esv, estría vascular; GA, ganglio auditivo; GER, *greater epithelial ridge*; LER, *lesser epithelial ridge*; LiE, limbo espiral; MR, membrana de Reissner; SE, surco externo; SI, surco interno.

8. Identificación de genes expresados de forma diferencial en la cóclea de ratones *Igf1*^{-/-} a E18,5

Como ya se ha descrito en apartados anteriores, la deficiencia de IGF-1 afecta a los niveles de expresión de los elementos del sistema IGF y produce importantes alteraciones en las principales rutas de señalización. Estos datos, junto con las alteraciones morfológicas y la sordera neurosensorial grave que el déficit origina en ratón y en humano, dirigieron nuestro trabajo a profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen a la actividad de IGF-1 en la cóclea de ratón durante el desarrollo.

Para estudiar los genes diana de IGF-1 en el oído se hibridó ARNm de la cóclea de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} en un *array* de genoma completo de ratón (MOE430A) de Affymetrix. Los resultados se enviaron a *Gene Expression Omnibus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y se encuentran disponibles con el número de acceso GSE11821.

Para calcular los niveles de expresión de los genes y el intervalo de confianza de la muestra en los *arrays* de Affymetrix se utilizó un modelo desarrollado por el grupo PUMA y llamado *multi-mgMOS* (*multi-chip modified gamma Model for Oligonucleotide Signal*). Los transcritos significativos en términos de expresión diferencial, tanto los sobre-expresados como los disminuidos, se identificaron utilizando el algoritmo PPLR, acrónimo de *Probability of Positive Log Ratio*. Un valor de PPLR cercano a 1 significa una probabilidad alta de que el transcrito se encuentre sobre-expresado, mientras que cuando el valor de PPLR es bajo, cerca de 0, esto implica una probabilidad muy baja de sobre-expresión y por lo tanto, la probabilidad de que la expresión del transcrito se encuentre disminuida es alta. Para el análisis se eligió un umbral de significación de 0,05 y se seleccionaron los transcritos con PPLR por encima de 0,95 y por debajo de 0,05 como significativos. Sólo se seleccionaron para un estudio posterior aquellos genes que presentaban un ratio de cambio (*fold change*, FC) mayor a 1 o menor a -1 (FC>1 con PPLR>0,95 y FC<-1 con PPLR<0,05). Siguiendo este criterio, se observó que 64 genes presentaban un aumento de expresión en ausencia de IGF-1, mientras que en otros 167

genes la expresión aumentaba. Estos genes se clasificaron según sus procesos biológicos mediante el sistema PANTHER y la herramienta FatiGO perteneciente a Babelomics, y se compararon frente a los genes de *Mus Musculus* incluidos en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Con este análisis se pudieron identificar los procesos biológicos y actividades celulares asociados a los genes de la cóclea afectados por la deficiencia en IGF-1 (figura 22). Posteriormente se llevó a cabo una selección de dichos genes teniendo en cuenta la función biológica, expresión en el oído interno y asociación a algún tipo de sordera humana, así como otros parámetros técnicos como el nivel de expresión génica. En la tabla 1 del Anexo 1 se muestra la selección de genes expresados de forma diferencial en la cóclea en ausencia de IGF-1. Entre ellos se incluyen genes relacionados con defectos sensoriales (*Ush1c*, *Esrrb* y *Tub*) y transportadores de iones (*Cacna1f*, *Kcnd2*, *Kcnmb1*, *Mlc1*). La expresión de los transportadores de acetilcolina *Slc18a3* y *Slc5a7* y los moduladores de la función de la estra *Esrrb* y *Cldn18*, entre otros, ya había sido descrita anteriormente en la cóclea.

Para evaluar la especificidad de tejido de los genes diana de IGF-1 identificados mediante este estudio, se llevó a cabo un estudio paralelo con el ARN procedente de los pulmones de ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* (GSE17157; Pais et al., 2013). La comparación de los genes con expresión diferencial obtenidos en ambos estudios indicó que 94 genes aumentaban su expresión en el pulmón, mientras que sólo 64 lo hacían en la cóclea. No se encontraron genes comunes entre ambos tejidos. Por otra parte, en pulmón disminuía la expresión de 56 genes y en la cóclea lo hacía un total de 167 genes. En este último caso, sólo tres genes estaban presentes en ambos tejidos: la integrina alfa V (*Itgav*), el transportador *Slc4a1* y la peptidasa específica de ubiquitina 12 (*Usp12*).

Se confirmaron los cambios en los niveles de expresión de 15 genes de los *arrays* de cóclea mediante RT-qPCR utilizando sondas TaqMan cuando estaban disponibles o con técnicas de hibridación *in situ*. Mediante la RT-qPCR se pudo validar el resultado de los *arrays* en un 68% de los genes estudiados y se confirmó que los transcritos de *Akr1c13*, *Fgf15*, *FoxM1*, *Mash1*, *Rp1h*, *Six6* y *Ush1c* se expresaban en mayor medida en la cóclea del ratón *Igf1^{-/-}* (Boeda et al., 2002; Zheng et al., 2003; Gong et al., 2006; Sánchez-Calderón et al., 2007). Por el contrario, *Foxg1*, que se encuentra implicado en la morfogénesis del oído interno en mamíferos (Pauley et al., 2006) no presentó una expresión diferencial en la cóclea del ratón *Igf1^{-/-}*. Estos datos contribuyen a la comprensión de las bases moleculares que sustentan el retraso en la maduración del epitelio sensorial descrito en la deficiencia de IGF-1 (Camarero et al., 2001), ampliando la acciones de este factor y poniendo de manifiesto su relación con genes asociados al Síndrome de Usher como *Ush1c* (Boeda et al., 2002), *Rp1h* (Liu et al., 2008) y *Tub* (Carroll

et al., 2004) cuyas mutaciones dan lugar a sordo-ceguera en humanos (ORPHA886; <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php?lng=ES>).

Los estudios paralelos realizados mediante hibridación *in situ* confirmaron la expresión celular anómala de *Six6*, *Mash1* y del factor de crecimiento de fibroblastos *Fgf15*. Estos genes se expresaban en la cóclea del ratón deficiente en *Igf1*, mientras que su expresión en el ratón *Igf1^{+/+}* era muy baja o prácticamente inexistente. Dentro del sistema nervioso central, *Six6* se expresaba en la retina, placoda olfatoria, hipotálamo e hipófisis (López-Ríos et al., 1999). Aunque el ARN mensajero de *Six6* no se expresaba en el nervio auditivo del ratón *Igf1^{+/+}* a E18,5 (figura 23A,B), sus transcritos se detectaban claramente en el ratón *Igf1^{-/-}* (figura 23D,E). El factor de transcripción proneural bHLH *Mash1*, por otra parte, se detectaba con más intensidad en el nervio auditivo (NA) del ratón *Igf1^{-/-}* a E18,5 (Figura 23C,F). A P5 la expresión de *Mash1* era similar en ambos genotipos y se encontraba asociada a los cuerpos neuronales entre las fibras marcadas por mielina. Esto podría sugerir que, en este estadio, las células positivas para *Mash1* fueran neuronas ganglionares (Malmierca, 2003) (figura 24) y que IGF-1 participara de alguna manera en el destino neural tardío del ganglio auditivo.

Los factores de crecimiento de los fibroblastos y sus receptores juegan un papel importante durante el desarrollo del oído interno (Puligilla et al., 2007, Jacques et al., 2007). A E15,5 y E18,5 *Fgf15* no se expresaba normalmente en el órgano de Corti de los ratones control. Sin embargo, a E16,5 y E18,5 se han encontrado transcritos de dicho gen en las células interfalángicas y en las células del borde situadas cerca de las células ciliadas internas en la vuelta basal de la cóclea en ratones *Igf1^{-/-}* (datos no mostrados y figura 23G,J). Dichos transcritos se encuentran asociados a marcadores específicos como p75 para las células pilares y myoVIIa para las células ciliadas (figura R14I,J). A P5, la expresión de *Fgf15* en las células del borde y en las falángicas internas no mostraba diferencias entre genotipos (figura 23N-Q). La expresión de otros genes como *Fgf8* (figura 23K) y *Fgfr3* (figura R14L) se mantenía sin cambios en la cóclea del ratón *Igf1^{-/-}* a E18,5.

Se estudiaron los perfiles de expresión de *Akr1c13*, *Dnabj7*, *Fgf15*, *Fibp*, *Foxg1*, *Foxm1*, *Kcnd2*, *Kif17*, *Mash1*, *Shbg*, *Retnla*, *Rp1h*, *Six6*, *Slc19a2* y *Ush1c* en los estadios de E15,5, E18,5, P5, P15, P30, P60 y P90 en la cóclea de ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* mediante PCR en tiempo real. Se clasificaron en tres grupos: i) genes cuyos perfiles variaban durante el desarrollo embrionario, bien aumentando como era el caso de *Akr1c13*, *Fgf15*, *Foxm1* y *Six6* (figura 25A) o disminuyendo como *Dnabj7* (figura 25B) en la cóclea del ratón *Igf1^{-/-}*; ii) genes cuyos perfiles cambiaban durante los estadios postnatales, aumentando en el caso de *Fibp*, *Shbg*, *Slc19a2* y *Rp1h* (figura 25C) o disminuyendo en *Kif17* y *Retnla* (figura 25D) en la cóclea del ratón nulo; iii) genes en los que el déficit de *Igf1* alteraba sus niveles de expresión a lo largo de todo el

desarrollo embrionario y postnatal, como sucedía para *Mash1* y *Ush1c* (figura 25E) o *Kcnd2* (figura 25F).

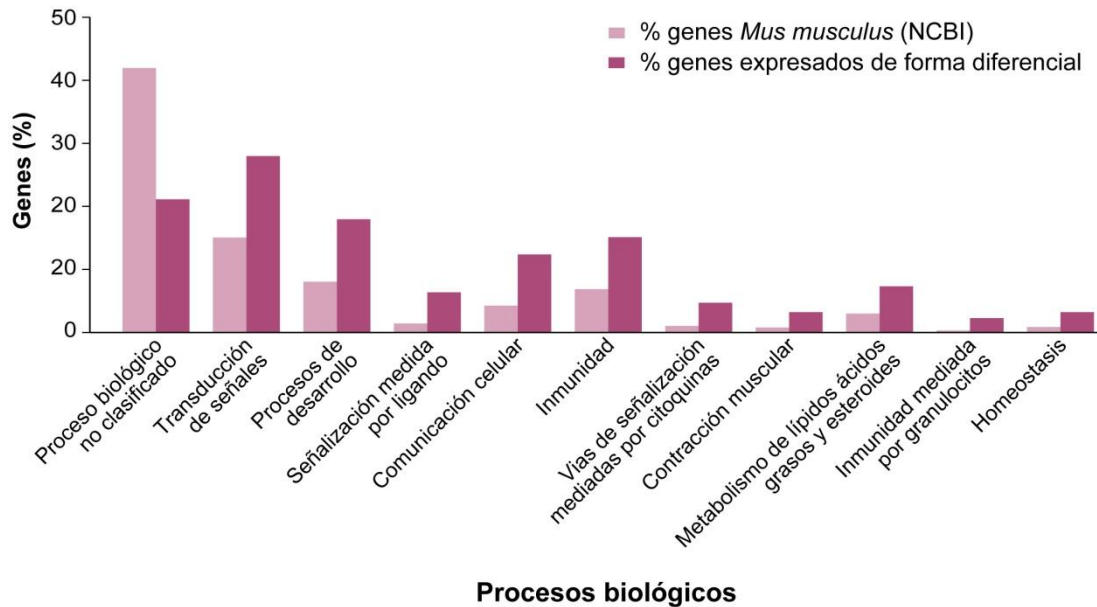


Figura 22. Genes expresados de forma diferencial en la cóclea del ratón *Igfl^{-/-}* agrupados en función de su categoría funcional. Los 231 genes cuya expresión variaba en los arrays de cóclea del ratón *Igfl^{-/-}* (barras negras) se compararon frente al genoma completo (barras blancas) de ratón (*Mus musculus*) recogido en la base de datos del NCBI y se clasificaron según su función biológica. Para el análisis estadístico de los procesos biológicos se utilizó la corrección de Bonferroni para múltiples test y se seleccionaron aquellos procesos con $p < 0,05$. Los genes cuya expresión cambiaba en la cóclea del ratón deficiente en *Igfl* a edad embrionaria están implicados en los siguientes procesos biológicos: transducción de señal, procesos de desarrollo, señalización mediada por ligando, comunicación celular, inmunidad y defensa, señalización mediada por citoquinas, contracción muscular, metabolismo de lípidos, ácidos grasos y esteroides, inmunidad mediada por granulocitos y homeostasis.

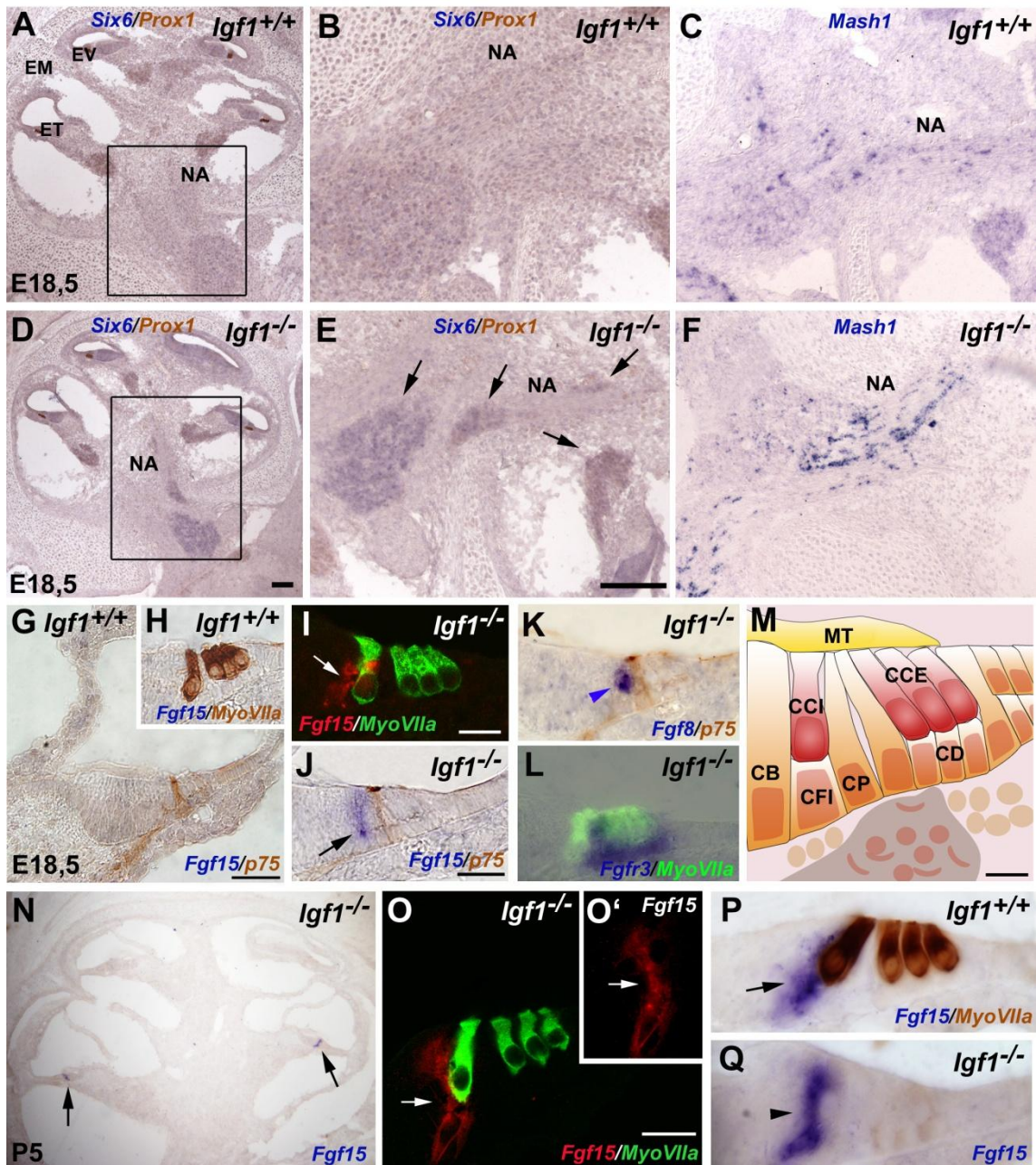


Figura 23. Aumento de expresión de *Six6*, *Mash1* y *Fgf15* en la cóclea embrionaria del ratón *Igf1*^{-/-}. Hibridación *in situ* de los transcritos de *Six6* (A,B,D,E), *Mash1* (C,F), *Fgf15* (G-J, N-Q), *Fgf8* (K) y *Fgfr3* (L) realizada en secciones de criostato procedentes de cócleas de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} a E18,5 (A-L) y P5 (N-Q). (M) Esquema del órgano de Corti en el que se muestran los diferentes tipos de células a E18,5. La expresión de *Six6* y *Mash1* era superior en el nervio auditivo (NA) de la cóclea *Igf1*^{-/-} a E18,5. La expresión de ARNm de *Fgf15* se localizó en las células del borde (CB) y en las células falángicas internas (CFI) del ratón *Igf1*^{-/-} a E18,5 (flechas en I y J) mientras que se encontraba ausente en el ratón *Igf1*^{+/+} (G,H). La expresión de *Fgf8* (cabeza de flecha azul en K) se detectó en las células ciliadas internas del

ratón *Igf1^{-/-}* (CCI) y la de *Fgfr3* (marcaje azul en L) en las células de soporte del mismo ratón. A P5, la expresión de *Fgf15* se observó en las CFI y CB en la vuelta basal de la cóclea de los ratones *Igf1^{-/-}* (flechas en N,O,O',P) e *Igf1^{+/+}* (cabeza de flecha en Q). La inmunotinción con *Prox1* (marrón en A,B,D,E), *Miosina VIIa* (marrón en H,P; verde en I,L,O) y *p75* (marrón en G,J,K) sirvió para identificar las células de soporte, las células ciliadas internas y externas y las células del pilar respectivamente. Se testaron en paralelo tres embriones por genotipo en tres experimentos diferentes. NA, nervio auditivo; EV, escala vestibular; EM, escala media; ET, escala timpánica; CD, células de Deiter; CCI, células ciliadas internas; CCE, células ciliadas externas; CP, células pilares; MT, membrana tectoria. Barras de escala: 100 μm (A,D,N); 100 μm (B,C,E,F); 50 μm (G); 20 μm (I,O,O'); 30 μm (H,J,K,L,P,Q) y 10 μm (M).

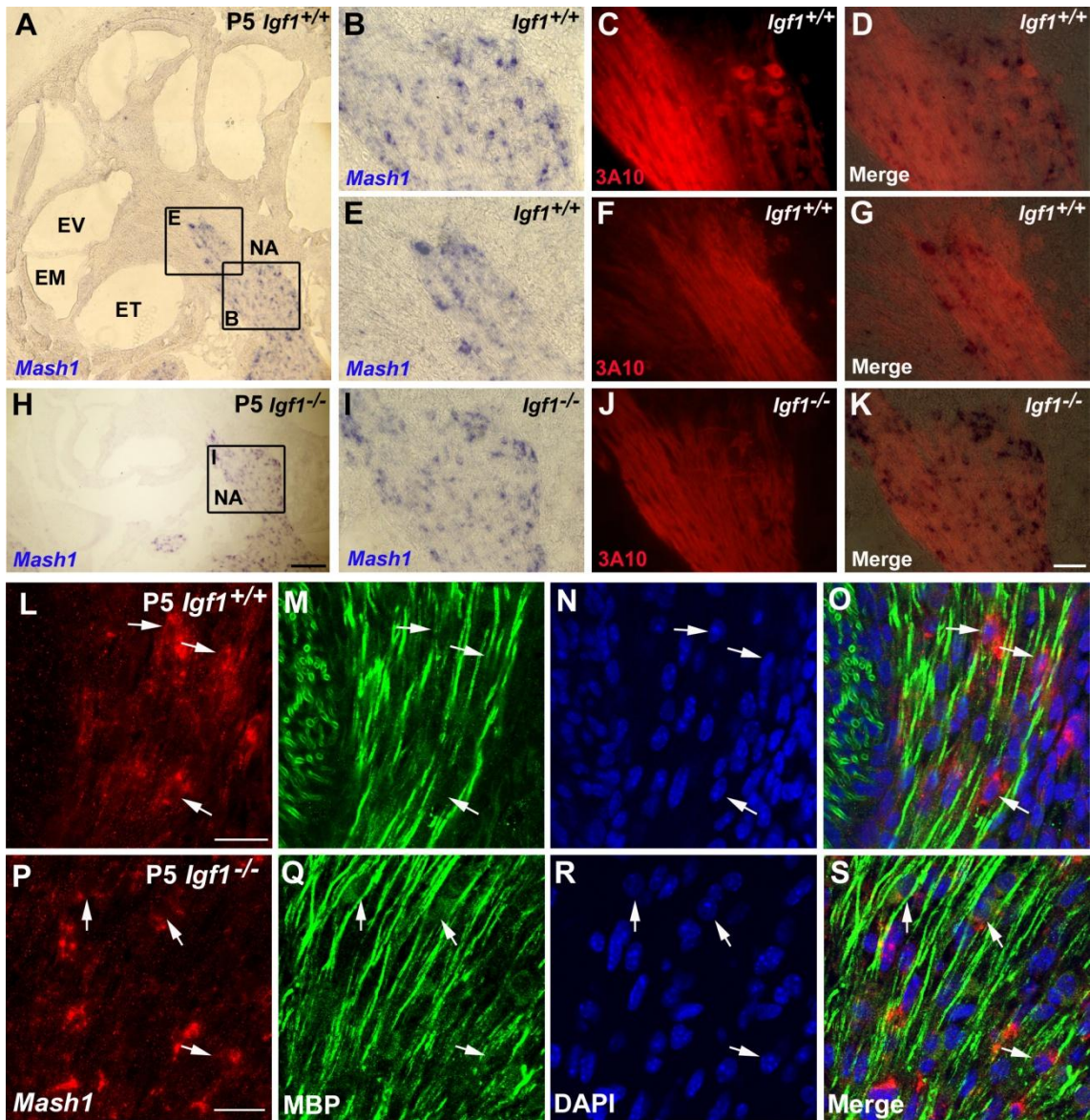


Figura 24. Expresión de *Mash1* en el nervio auditivo de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} a P5. (A-K) La hibridación *in situ* de *Mash1* se realizó en secciones de criostato de cócleas de ratones *Igf1*^{+/+} (A-G) e *Igf1*^{-/-} (H-K) a P5. Los axones del nervio auditivo (NA) se tiñeron con 3A10 (rojo; C,D,F,G,J,K). A P5 la expresión de *Mash1* en el nervio auditivo no mostró diferencias entre genotipos (B-G,I-K). Las imágenes B, E e I muestran, aumentado de tamaño, lo mismo que aparece en las zonas encuadradas de A y H, respectivamente. Las imágenes D, G y K se consiguieron al fundir el marcaje obtenido con *Mash1* y 3A10. (L-S) Hibridación *in situ* de *Mash1* en rojo (L,P,O,S) e inmunohistoquímica con proteína básica de mielina (MBP) en verde (M,Q,O,S). Los núcleos celulares se tiñeron en azul con DAPI (N,R,O,S). A P5, la expresión de *Mash1* aparecía rodeando al núcleo y se asociaba al soma celular, se podrían tratar de neuronas del ganglio que se encuentran embebidas en los axones auditivos (flechas blancas; L-S). Se testaron en paralelo tres embriones por genotipo en tres experimentos diferentes. NA, nervio auditivo; EV, escala vestibular; EM, escala media; ET, escala timpánica. Barras de escala: 150 μ m (A,H); 30 μ m (B-G,I-K); 35 μ m (L-O); 20 μ m (P-S).

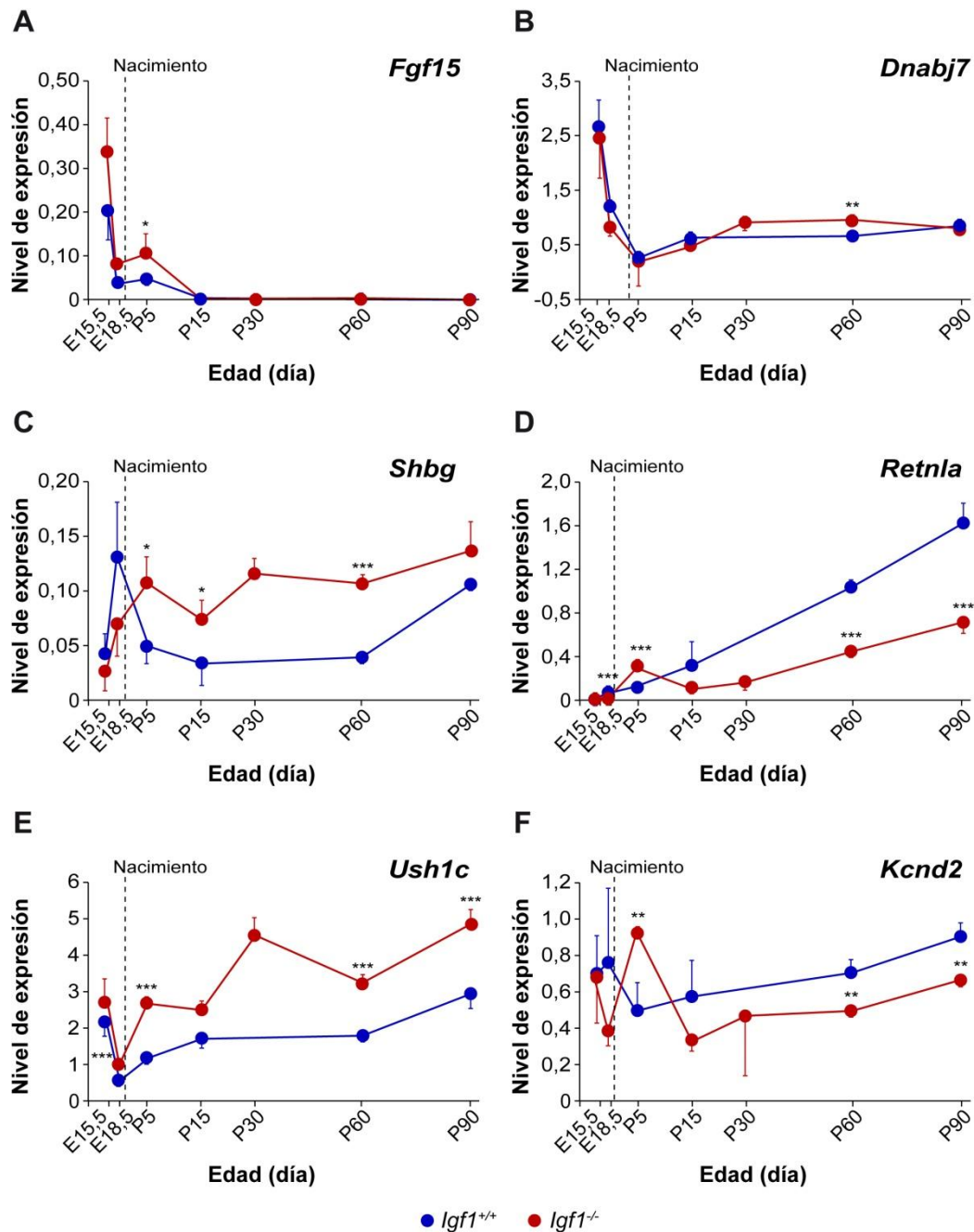


Figura 25. Curso temporal de la expresión de ARNm en genes diana de IGF-1. Análisis mediante PCR en tiempo real del ARNm procedente de la cóclea de ratones *Igf1*^{+/+} (azul) e *Igf1*^{-/-} (rojo) obtenido a distintas edades: E15,5, E18,5, P5, P15, P30, P60 y P90. Como control endógeno se utilizó el gen *Rn18S*. Los niveles de expresión de los genes se calcularon como $2^{-\Delta Ct} \times 10^6$. Los perfiles de expresión de *Fgf15* (A) y *Dnabj7* (B) fueron similares, con niveles altos a E15,5 que disminuían de E18,5 en adelante. Los niveles de *Shbg*, más elevados en el ratón *Igf1*^{-/-}, aumentaron a partir de P5 (C). La expresión de *Retna* fue mayor en el ratón *Igf1*^{+/+} y aumentó progresivamente con la edad (D). Los niveles de ARNm de *Ush1c* aumentaron con la edad en la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-} y la expresión era mayor a la presentada por el ratón *Igf1*^{+/+} (E). Los niveles de expresión de *Kcnd2* eran menores en la cóclea del ratón nulo que en la del ratón *Igf1*^{+/+} (F). La significación estadística estimada mediante la prueba de la t de Student fue: ***p<0,005; **p<0,01; *p<0,05. Se utilizaron 6 ratones/genotipo.

9. Expresión de genes de autofagia en la cóclea de los ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}*

La autofagia es un proceso catabólico clave durante el desarrollo embrionario que proporciona la energía necesaria para la remodelación de órganos y tejidos (Aburto et al., 2012 Cells). Estudios previos habían demostrado la importancia de la autofagia en el desarrollo del oído interno de distintas especies (Marino et al., 2010; Aburto et al., 2012 Cell Death). Por otra parte, el IGF-1 y su ruta de señalización tienen una fuerte relación con el control de la autofagia (Sobolewska et al., 2009; Bains et al., 2009; Renna et al., 2013).

Debido a la importancia de este proceso en la etapa embrionaria y para discernir si estaba regulado por IGF-1, se estudió a continuación la expresión comparada de genes de autofagia en la cóclea de los ratones *Igf1^{-/-}* e *Igf1^{+/+}* de E18,5. Los genes implicados en procesos relacionados con la autofagia se seleccionaron y clasificaron atendiendo a criterios previamente descritos (Klionsky, 2005; Mizushima, 2007; Chen and Klionsky, 2011; Gordy and He, 2012; Rubinstein and Kimchi, 2012, Feng et al., 2014). La mayoría de los genes no mostraron diferencias de expresión entre genotipos (tabla 6), salvo en el caso de los transcritos *Ndp52*, *Tlr1* y *Tlr6*. *Ndp52*, que se encontraba aumentado en la cóclea de el ratón deficiente, tiene es importante en la inmunidad por el papel que juega modulando la autofagia. NDP52 es un receptor de autofagia para patógenos ubiquitinilados con capacidad de unión a LC3 y ubiquitina de forma simultánea (Thurston et al., 2009; Kraft et al., 2010). *Tlr1* y *Tlr6* son miembros de la familia de receptores tipo *toll* (TLR) que tienen un papel clave en el sistema inmune innato (Shi y Kehrl, 2008; Yordy et al., 2013). Los datos de los *arrays* mostraron una mayor expresión de *Tlr1* y una disminución de *Tlr6* en la cóclea del ratón *Igf1^{-/-}* cuando se comparó con el control *Igf1^{+/+}*, mientras que la expresión de otros miembros de la familia TLR no se modificaba. La activación de TLR1 a través de MydD88, junto con otros miembros de la familia TLR, incluyendo TLR6, activa la autofagia en macrófagos (Shi y Kehrl, 2008).

Símbolo	Gen	Expresión de <i>Igf1^{+/+}</i>	Expresión de <i>Igf1^{-/-}</i>	Fold Change
1- Genes de la maquinaria de autofagia				
Genes implicados en la formación de vacuolas de autofagia				
<i>Atg12</i>	Autophagy-related 12 (yeast)	5.41	5.36	-0.053
<i>Atg4b</i>	Autophagy-related 4B (yeast)	7.09	7.09	-0.001
<i>Atg4d</i>	Autophagy-related 4D (yeast)	5.42	5.39	-0.023
<i>Atg5</i>	Autophagy-related 5 (yeast)	6.79	6.79	-0.001
<i>Becn1</i>	Beclin 1	7.16	7.16	0.006
<i>Gabarap</i>	Gaba receptor associated protein	10.95	10.95	-0.003
<i>Gabarapl1</i>	Gaba receptor-associated protein-like 1	8.46	8.45	-0.004
<i>Gabarapl2</i>	Gaba receptor-associated protein-like 2	8.25	8.24	-0.016
<i>Rgs19</i>	Regulator of G-protein signaling 19	7.20	7.10	-0.104

<i>Ulk1</i>	Unc-51 like kinase 1 (C. elegans)	6.28	6.22	-0.057
Genes responsables del transporte				
<i>Atg10</i>	Autophagy-related 10 (yeast)	6.19	6.19	-0.006
<i>Atg3</i>	Autophagy-related 3 (yeast)	4.54	4.49	-0.051
<i>Atg7</i>	Autophagy-related 7 (yeast)	4.39	4.41	0.027
<i>Rab24</i>	RAB24, member RAS oncogene family	7.65	7.54	-0.109
Genes responsables de la fusión del autofagosoma-lisosoma/vacuola				
<i>Lamp1</i>	Lysosomal membrane glycoprotein 1	10.51	10.51	-0.003
<i>Npc1</i>	Niemann Pick type C1	7.70	7.70	-0.005
Genes implicados en autofagia y ubiquitinilación				
<i>Bag3</i>	Bcl2-associated athanogene 3	7.35	7.12	-0.233
<i>Foxo3</i>	Forkhead box O3	7.57	7.56	-0.004
<i>Hdac6</i>	Histone deacetylase 6	8.01	8.01	0.006
<i>Nbr1</i>	Neighbor of Brca1 gene 1	8.55	8.35	0.204
<i>Ndp52</i>	Nuclear domain 10 protein 52	3.21	2.11	-1.099
2- Genes de reguladores de la autofagia				
Genes de autofagia y apoptosis				
<i>Bad</i>	Bcl-associated death promoter	7.02	7.03	0.010
<i>Bak1</i>	Bcl2-antagonist/killer 1	3.43	3.42	-0.010
<i>Bax</i>	Bcl2-associated X protein	8.09	8.08	-0.004
<i>Bcl2</i>	B-cell leukemia/lymphoma 2	5.06	5.02	-0.033
<i>Casp3</i>	Caspase 3	7.73	7.68	-0.041
<i>Casp8</i>	Caspase 8	7.12	6.89	-0.227
<i>Fadd</i>	Fas TNFRSF6-associated via death domain	6.11	6.05	-0.059
<i>Mapk8</i>	Mitogen activated protein kinase 8	6.74	6.73	-0.007
<i>Uvrag</i>	UV radiation resistance associated gene	7.70	7.48	-0.219
Genes de autofagia y ciclo celular				
<i>Cdkn1b</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (P27)	5.70	5.73	0.030
<i>Cdkn2a</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	3.74	3.56	-0.175
<i>Eif4ebp1</i>	Eukaryotic translation initiation factor 4Ebp1	7.04	7.04	0.006
<i>Eif2ak4</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2ak4	6.05	6.32	0.278
Genes reguladores de autofagia en otros procesos celulares				
<i>Mapk14</i>	Mitogen activated protein kinase 14	5.26	5.13	-0.131
<i>Rps6kb1</i>	Ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1	6.08	6.05	-0.028
<i>Tlr1</i>	Toll-like receptor 1	1.42	3.04	1.615
<i>Tlr6</i>	Toll-like receptor 6	3.49	1.17	-2.314

Tabla 6. Nivel de expresión de genes de autofagia en la cóclea de los ratones *Igfl^{+/+}* e *Igfl^{-/-}* a edad embrionaria. El transcriptoma de la cóclea de los ratones *Igfl^{+/+}* e *Igfl^{-/-}* se estudio utilizando

GeneChip® Mouse Genome 430A2.0 Arrays (Affymetrix), un array de genoma completo con una cobertura de 39.000 transcritos. Los genes de autofagia se clasificaron en 1) Genes de la maquinaria autofágica y 2) Genes reguladores de la autofagia. Para el análisis de los *arrays* se utilizó un método probabilístico (PPLR) que reduce el número de falsos positivos y facilita la selección de genes expresados de forma diferencial. El ratio de cambio en este caso se ha expresado como la diferencia entre el nivel de expresión del ratón *Igf1*^{-/-} e *Igf1*^{+/+} (*Fold Change*). Los genes aparecen listados en una única categoría aunque, atendiendo al tipo de clasificación elegida, alguno de ellos fuese susceptible de aparecer en más de una.

10. La localización intracelular y los niveles de FoxM1 y MEF2 se encuentran regulados en la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-} de manera diferencial

En ratones embrionarios, FoxM1 se encuentra asociado al control del ciclo celular y a la reparación del ADN en progenitores neurales y su expresión disminuye tras la diferenciación (Karsten et al., 2003). FoxM1 modifica los niveles nucleares del inhibidor de ciclinas dependientes de quinasas p27^{Kip1} y es esencial para la citocinesis (Zhang et al., 2003; Wang et al., 2005). Como ya se había observado en el estudio de los *arrays* y confirmado posteriormente mediante RT-qPCR, en la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-} a E18,5 los niveles de expresión de FoxM1 se encontraban aumentados con respecto al control (FC *array*= 1,7; FC PCR= 1,2). Para estudiar las posibles consecuencias funcionales derivadas del cambio en los niveles de expresión de *Foxm1*, se analizaron extractos proteicos citoplasmáticos y nucleares procedentes de cócleas de ratones a distintas edades. A E18,5 los niveles de proteína en el núcleo aumentaban un 154% (p<0,05) en el ratón *Igf1*^{-/-}, mientras que el componente citoplasmático disminuía un 57% (p>0,005). A P15 los niveles proteicos de FoxM1 aumentaban un 13% en el extracto nuclear de la cóclea y en el extracto citoplasmático disminuían un 50% (p<0,05, figura 26A,B). Los niveles de proteína en el citoplasma para p27^{Kip1} aumentaban un 121% (p<0,05) en el ratón nulo a E18,5, mientras que la fracción nuclear disminuía un 27% (p<0,05). A P15 los niveles en citoplasma de p27^{Kip1} se incrementaban un 24% en el ratón *Igf1*^{-/-} y la fracción nuclear disminuía un 58%, aunque las diferencias no eran estadísticamente significativas (figura 26A,B). Estas diferencias en la localización subcelular de FoxM1 y p27^{Kip1} encontradas en la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-} sugerían que FoxM1 podía estar modulando la señalización nuclear de p27^{Kip1}. Los niveles de expresión relativos de *Foxm1* permanecían elevados durante el desarrollo y disminuían en estadios posnatales en el ratón *Igf1*^{-/-} cuando se comparaba frente al *Igf1*^{+/+} (figura 26C). A P15 FoxM1 se localizaba en la estría vascular, el ganglio auditivo y en el órgano de Corti de ambos genotipos (figura 26D-M).

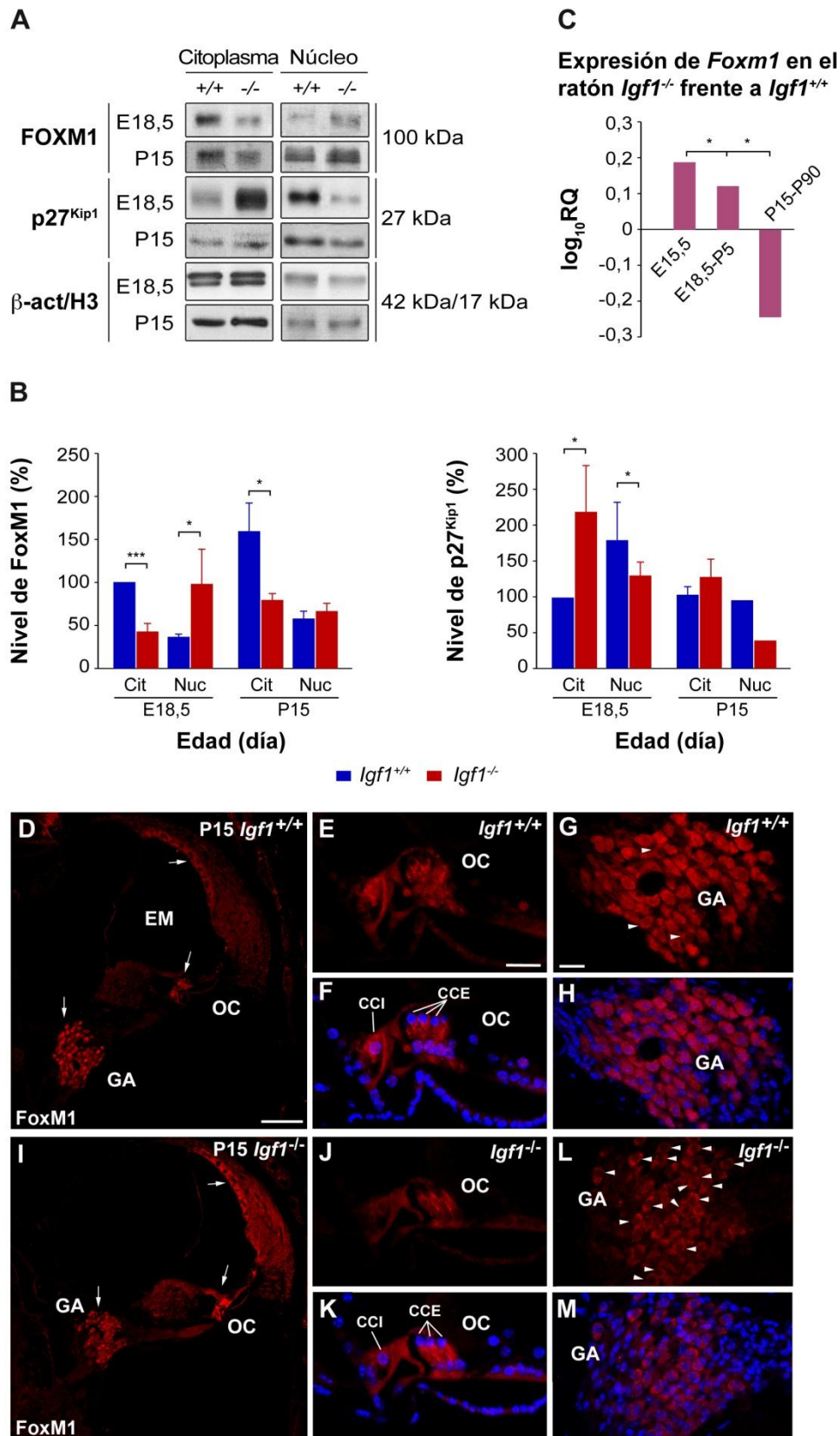


Figura 26. La deficiencia en IGF-1 modula los niveles y la localización intracelular de FoxM1 y p27^{Kip1}. (A,B) Para detectar la presencia de FoxM1 y p27^{Kip1} mediante *western blotting* se prepararon extractos de proteínas de las fracciones citoplasmática y nuclear de, al menos, 12 cócleas diferentes de ratones *Igf1*^{+/+} o *Igf1*^{-/-} a diferentes edades: E18,5 y P15 que se utilizaron en seis o más experimentos

diferentes. Como controles de carga se utilizaron β -actina para la fracción citoplasmática e histona H3 para la nuclear. Las bandas específicas para cada anticuerpo se densitometraron con el software *ImageJ* y los resultados se normalizaron asignando el valor 100 a la fracción citoplasmática de *Igfl*^{+/+}. (C) Expresión relativa de *FoxM1* en la cóclea del ratón nulo frente al *Igfl*^{+/+} estimada mediante PCR en tiempo real a E15,5, E18,5-P5 y P15-P90. Los datos se presentan como el promedio del log₁₀RQ. (D-M) Expresión de *FoxM1* en la cóclea de ratones *Igfl*^{+/+} (D-H) e *Igfl*^{-/-} (I-M) a P15. La expresión se localizó en el ganglio auditivo, la estría vascular y el órgano de Corti (flechas blancas). La significación estadística estimada mediante el test de la t de Student fue de: ***p<0,005; **p<0,01; *p<0,05. Las barras de histograma azul y roja corresponden a ratones *Igfl*^{+/+} e *Igfl*^{-/-}, respectivamente. Cit, citoplasma; Nuc, núcleo. GA, ganglio auditivo; CCI, células ciliadas internas; OC, órgano de Corti; CCE, células ciliadas externas; SM, escala media. Barra de escala: 100 μ m (D,I); 20 μ m (E,F,J,K) y 20 μ m (G,H,L,M).

Con la finalidad de identificar posibles reguladores transcripcionales comunes en genes diana de IGF-1 en la cóclea, se buscaron las regiones promotoras 5'UTR (*untranslated región*) de los genes seleccionados utilizando el programa MEME (<http://meme-suite.org/>) para la identificación de motivos comunes. Se escogieron aquellos que presentaban el p-valor más bajo y con el programa TESS (Transcription Element Search System; <http://www.cbil.upenn.edu/tess>) se buscaron sitios de unión a factores de transcripción en secuencias de ADN. Por último, se seleccionaron las secuencias consenso con mayor probabilidad de sitios de unión. A partir de dos análisis diferentes realizados en genes cuya expresión aumentaba en la cóclea del ratón *Igfl*^{-/-} se identificó, con una alta probabilidad de alineamiento, un posible sitio de unión para el factor de transcripción MEF2. La familia de factores de transcripción de MEF2 está compuesta por cuatro isoformas, nombradas de A a D. Las proteínas MEF2 se encuentran muy expresadas en el tejido muscular, donde actúan regulando el desarrollo del músculo cardíaco y esquelético junto con la diferenciación del músculo liso (Black y Olson, 1998). MEF2 también se encuentra fuera del músculo regulando el desarrollo del cerebro, sistema inmunológico, vasos sanguíneos y muchos otros tejidos (Dodou et al., 1995; revisado en Heidenreich y Linseman, 2004 y Potthoff y Olson, 2007). En células musculares los niveles de MEF2 están modulados por IGF-1 que produce un retraso en la degradación de MEF2, por la vía del proteosoma dependiente de ubiquitina, permitiendo su paso al núcleo (Montessuit et al., 2004). Se ha estudiado la expresión y regulación en la cóclea de los miembros de la familia de MEF2 (figura 27). Los estudios de inmunodetección mediante *western blotting* mostraron que tanto los niveles como la localización subcelular de MEF2 se encontraba alterada en la cóclea del ratón *Igfl*^{-/-} en comparación con el *Igfl*^{+/+} (figura 27A,B,C). A E18,5, los niveles de proteína MEF2A disminuían un 26% en el citoplasma (p<0,05) y un 32% (p<0,01) en el núcleo, mientras que a P15 disminuía un 40% la fracción citoplasmática (p<0,05) y no cambiaba la nuclear (figura 27B). Por otro lado, la expresión de MEF2D en la

cóclea del ratón *Igf1^{-/-}* a E18,5 era similar en el citoplasma y disminuía un 43% en el núcleo ($p < 0,05$). A P15 MEF2D disminuía en ambas fracciones, aunque la bajada sólo fue significativa en la fracción citoplasmática (25%, $p < 0,01$) (figura 27C). Se estudiaron los perfiles de expresión temporal de *Mef2a*, *Mef2c* y *Mef2d* en la cóclea de ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* mediante PCR en tiempo real desde E15,5 a P90 (figura R18D). Los niveles de expresión de *Mef2a* y *Mef2d* en la cóclea embrionaria y adulta del ratón *Igf1^{-/-}* se modificaron a lo largo del tiempo según un patrón común a ambos genes, siendo un poco mayor a E15,5 y disminuyendo progresivamente con la edad. Por el contrario, los niveles de expresión de *Mef2c* fueron más bajos a todas las edades estudiadas y la proteína MEF2C no pudo ser detectada. Por último, se estudió la expresión de *Mef2a* y *Mef2d* en los núcleos cocleares de ratones *Igf1^{+/+}*, *Igf1^{+/-}* e *Igf1^{-/-}* a los 4 meses de edad y, al igual que en la cóclea, se observó una disminución en la expresión de ambos genes en el ratón deficiente (figura 28).

En la figura 29 se muestra mediante inmunotinción la localización de MEF2A y MEF2D a E18,5 y P15 en la cóclea de ratones de ambos genotipos. A E18,5 MEF2A se marcaba claramente en las neuronas del ganglio auditivo, aunque en el ratón *Igf1^{-/-}* presenta un patrón celular más difuso (figura 29A,B,C). A P15 el marcaje de MEF2A era visible en el ganglio auditivo (figura 29I,J,K), en las células pilares, células de Deiter y células ciliadas internas (figura 29L,M) de ambos genotipos. La expresión de MEF2D se observó en el ganglio auditivo y el órgano de Corti a E18,5 (figura 29D,E,F,G,H) y P15 (figura 29N,O,P,Q). A E18,5 el marcaje de MEF2D era fuerte y localizado en su mayoría en el citoplasma de las células ciliadas en el ratón *Igf1^{-/-}* (figura 29H), mientras que a P15 la intensidad del marcaje disminuía en el ratón nulo (figura 29O,Q) y se hacía más nuclear en las neuronas y células ciliadas internas de la cóclea del ratón *Igf1^{+/+}* (figura 29N,P).

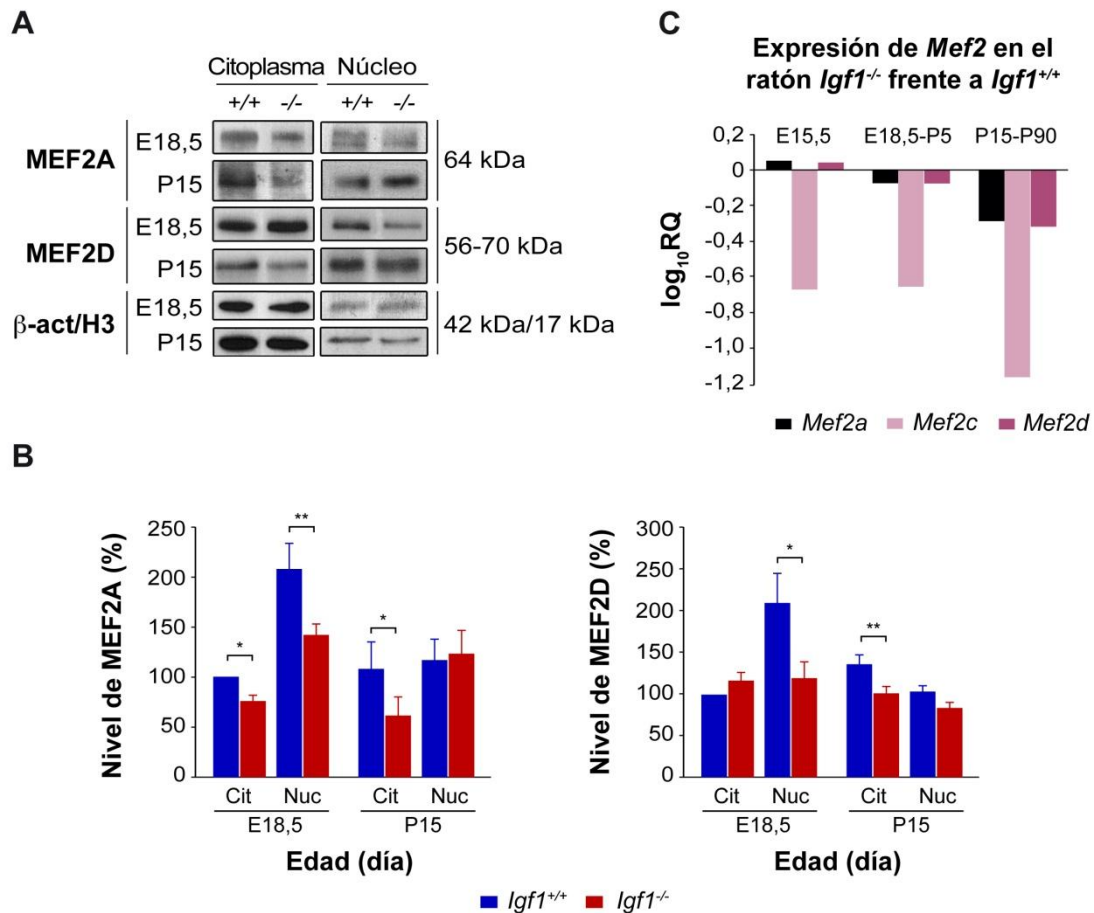


Figura 27. La deficiencia de IGF-1 modifica los niveles y la localización intracelular de MEF2. (A,B,C) Inmunodetección de MEF2A y MEF2D en las fracciones citoplasmática y nuclear de extractos proteicos obtenidos a partir de la cóclea de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} a E18,5 y P15 (n=21, a partir de al menos 7 experimentos diferentes). Como controles de carga se utilizaron β-actina para la fracción citoplasmática e histona H3 para la nuclear. Para determinar los niveles de expresión media se cuantificaron las bandas específicas mediante densitometría con el software *ImageJ*. Los resultados se normalizaron respecto a β-actina e histona y a los datos de la fracción citoplasmática de la cóclea del ratón *Igf1*^{+/+} a E18,5 se les asignó un valor de 100. El resto de datos se presentaron como porcentajes referidos a dicho valor y se representaron gráficamente. (D) La expresión de *Mef2a*, *Mef2c* y *Mef2d* se midió mediante PCR en tiempo real a E15,5, E18,5-P5, y P15-P90 en la cóclea de ratones *Igf1*^{-/-} y se compararon frente a los controles *Igf1*^{+/+}. Los datos se representan como la media del log₁₀RQ. La significación estadística estimada mediante el test de la t de Student fue: ***p<0,005; **p<0,01; *p<0,05. Barras azules: ratón *Igf1*^{+/+}; barras rojas: ratón *Igf1*^{-/-}. Cit, citoplasma; Nuc, núcleo; β-act, β-actina; H3, histona H3.

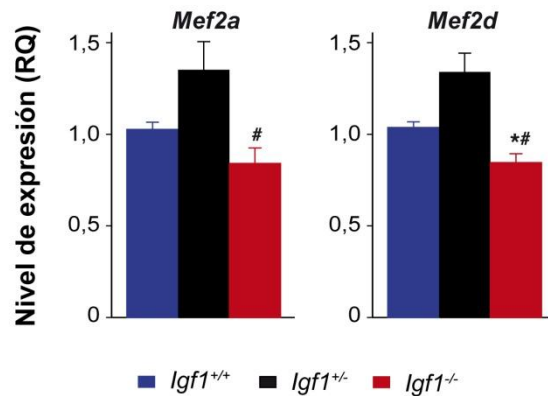


Figura 28. Determinación mediante RT-qPCR de la expresión génica de *Mef2a* y *Mef2d* en los núcleos cocleares de ratones deficientes en *Igf1*. (A,B) Los niveles de expresión de ARNm de *Mef2a* y *Mef2d* se estudiaron en los núcleos cocleares de ratones *Igf1*^{+/+}, *Igf1*^{+/-} e *Igf1*^{-/-} de 4 meses de edad. La expresión de ambos genes *Igf1* disminuyó en el ratón deficiente respecto a los otros dos genotipos. Se utilizaron al menos 3 ratones por genotipo en el experimento. Como genes endógenos se utilizaron el gen 18S (*Rn18S*) y la hipoxantina fosforribosil transferasa (*Hprt1*). Los resultados de expresión génica se calcularon mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y se representan como la media de $RQ \pm ESM$. La significación estadística se estimó mediante ANOVA y prueba de la t de Student y los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$. # indica la comparación frente a *Igf1*^{+/-}.

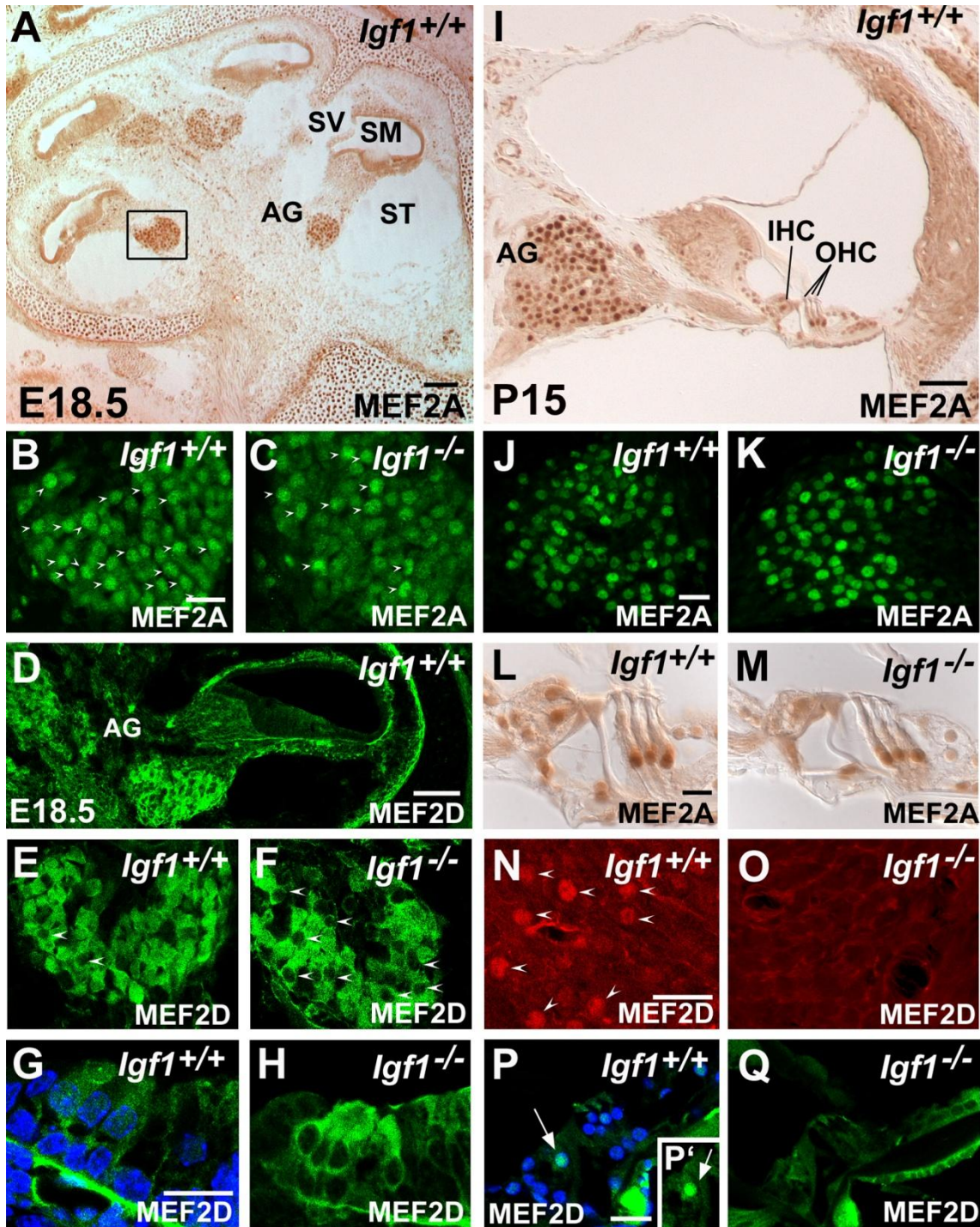


Figura 29. Inmunolocalización de MEF2A y MEF2D en la cóclea de ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}*. Expresión de MEF2A en la cóclea de ratones *Igf1^{+/+}* (A,B,I,J,L) e *Igf1^{-/-}* (C,K,M) a E18,5 (A-C) y P15 (I-M). A E18,5 MEF2A teñía de forma marcada los núcleos en el ganglio auditivo del ratón *Igf1^{+/+}* (cabezas de flecha en B), mientras que en el ratón *Igf1^{-/-}* aparecían menos núcleos marcados (cabezas de flecha en C) y la tinción parecía más citoplasmática. A P15 el marcaje era similar en las neuronas (J,K), células de Deiter, células pilares y células ciliadas internas (L,M) en ambos genotipos. La expresión de MEF2D a E18,5 aparecía en el ganglio auditivo (E,F) y en el órgano de Corti (G,H). La expresión de MEF2D era

menos nuclear en el ratón *Igfl^{-/-}* (cabezas de flecha en F que señalan los núcleos no marcados, H) que en el *Igfl^{+/+}* (E,G). A P15, la expresión de MEF2D se observó en el núcleo de las neuronas auditivas (N) y en las células ciliadas internas (P,P') del ratón *Igfl^{+/+}*, pero no en el ratón nulo(O,Q). GA, ganglio auditivo; EV, escala vestibular; EM, escala media; ET, escala timpánica; CCI, células ciliadas internas; CCE, células ciliadas externas. Barras de escala: 100 μm (A); 25 μm (B,C,E,F); 75 μm (D); 100 μm (I); 20 μm (G,H); 20 μm (J,K); 20 μm (L,M); 20 μm (N,O); 20 μm (P,P',Q).

Discusión

DISCUSIÓN

1. Estudio del oído interno del ratón deficiente en *Igf1* durante el desarrollo tardío.

Las mutaciones homocigotas en el gen *IGF1* cursan en el hombre con sordera bilateral sindrómica, retraso en el crecimiento intrauterino y postnatal, y déficit intelectual (Woods et al., 1996; Bonapace et al., 2003; Coutinho et al., 2007; Walenkamp et al., 2005 y 2007). Sin embargo, en la última mutación homocigota que se ha descrito para este gen, el paciente presentaba niveles variables de IGF-1 y su afinidad por el receptor IGF1R sólo se encontraba parcialmente disminuida (Netchine et al., 2009). En este caso, como ocurre en las mutaciones heterocigotas del gen *IGF1*, la audición era normal (van Duyvenvoor et al., 2010; Fuqua et al., 2012). Lo cual hace pensar que niveles bajos de IGF-1 son suficientes para que no haya pérdida auditiva pero no para el correcto crecimiento óseo. El ratón deficiente en *Igf1* presenta retraso en el crecimiento embrionario y postnatal (Liu et al., 1993; Baker et al., 1993) y sordera neurosensorial profunda al mes de edad (Cediell et al., 2006). Sin embargo, la deficiencia de IGF-1 no produce alteraciones evidentes de la función vestibular en el mismo modelo animal.

Para comprender esta diferencia entre los dos componentes funcionales del oído interno se estudió su anatomía. En los ratones deficientes en *Igf1* de un mes de edad no se aprecian diferencias evidentes en el tamaño o forma de la cadena de huesecillos que forman el oído medio, aunque a esta edad el peso corporal del ratón *Igf1*^{-/-}, comparado con el de los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{+/-}, es significativamente menor. Por otra parte, el oído interno del ratón nulo presenta una morfología aparentemente normal, pero su tamaño es menor que el del ratón *Igf1*^{+/+}. La organización celular, la citoarquitectura de la cóclea no cambia entre los genotipos, aunque en el ratón deficiente en *Igf1* se observa una reducción de su tamaño. Todos los tipos celulares están presentes y estructurados, tanto en la cóclea como en el vestíbulo. Las alteraciones encontradas entre genotipos son aparentemente leves, pero el déficit de IGF-1 en el ratón durante el desarrollo postnatal temprano altera la mielinización del ganglio auditivo y produce un retraso en la maduración de las neuronas auditivas que finalmente mueren por apoptosis (Camarero et al., 2001).

Al nivel molecular si se aprecian alteraciones importantes lo que correlaciona con la pérdida de función, aunque, paradójicamente, morfológicamente las diferencias en la cóclea entre los ratones *Igf1*^{-/-} e *Igf1*^{+/+} sean leves. La búsqueda de genes posibles dianas del IGF-1 en la cóclea mediante *arrays* y el posterior análisis de la expresión génica en la cóclea de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} durante el desarrollo, han permitido identificar numerosos genes que se expresan de forma diferencial en la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-}. Para profundizar en el conocimiento de las acciones de IGF-1 en el oído interno, se ha seleccionado una colección de los anteriores genes y se ha seguido una serie de abordajes complementarios para su análisis.

Entre estos genes cuya expresión se encuentra alterada en la cóclea a E18.5, hay algunos asociados a defectos sensoriales como *Tub*, *Rplh* y *Ush1c*. Este último codifica una proteína de los estereocilios llamada harmonina y las mutaciones de este gen son las causantes del Síndrome de Usher 1C que cursa con sordera y degeneración de retina (Boeda et al., 2002). El ratón *knock-in* del gen *Ush1c* reproduce en el modelo animal las mismas alteraciones que en el hombre. Desde el primer mes de vida, el ratón mutante es sordo y en la histología de la cóclea se ha podido observar la desorganización en las filas de células ciliadas y la pérdida de las mismas en la base y en la vuelta media de la cóclea. A la misma edad también es evidente la degeneración retiniana con pérdida progresiva de los fotorreceptores a partir de los 6 meses de edad (Lentz et al., 2010). Curiosamente, el ratón *knock-out* de *Ush1c* presenta sordera desde una edad temprana, pero no se han observado alteraciones de la retina hasta los 11 meses de edad (Tian et al., 2010). La degeneración de la retina también se asocia a mutaciones en el gen *Rplh* (Liu et al., 2009) cuyos niveles de expresión se encuentran elevados en el ratón *Igf1^{-/-}*. El ratón deficiente en *Tub* presenta pérdida auditiva progresiva y degeneración de los fotorreceptores (Carroll et al., 2004) y recientemente se ha demostrado que *Tub* es clave en la señalización de la insulina y la leptina a nivel hipotalámico y cuya regulación da lugar a efectos importantes en el metabolismo (Prada et al., 2013).

El aumento de expresión de IGF-1 en la retina del ratón produce importantes alteraciones en la vascularización del ojo del ratón y reproduce la mayoría de las alteraciones que se producen en la retinopatía diabética en el hombre (Ruberte et al., 2004). Por otra parte, la función visual del ratón *Igf1^{-/-}* es normal hasta los cuatro meses de edad y a partir de ese momento se produce una pérdida progresiva de la misma hasta el año de edad, momento en que los ratones son prácticamente ciegos. Esta deficiencia visual se desarrolla de forma paralela a la disminución de contactos celulares que se producen en la primera sinapsis de la vía auditiva, sin que se haya detectado un descenso en el número de células de la retina (datos no mostrados). Al contrario de lo que sucede en la función auditiva, la deficiencia de IGF-1 no compromete el desarrollo de la retina, aunque sí parece importante para la adecuada vascularización de la misma (Calvaruso et al., 1996; Hellstrom et al., 2002). En el bulbo olfatorio el déficit de IGF-1 también afecta gravemente el desarrollo del mismo (Otaegi et al., 2006), que presenta un tamaño reducido y una morfología anormal. Esta variabilidad observada en los efectos del IGF-1 aun considerando sólo los órganos sensoriales indica que los efectos del factor son específicos del órgano afectado.

Un gran porcentaje de los genes cuya expresión se encuentra alterada en el ratón nulo no habían sido descritos previamente en el oído interno. Entre ellos el gen *Fgf15*, factor de transcripción cuya expresión se encuentra muy aumentada en la etapa embrionaria, decae bruscamente en torno al nacimiento y ya no se recupera. El gen *Fgf15*, ortólogo en ratón del

Fgf19 (de pollo y humano), no es capaz de iniciar por sí sólo la inducción ótica (Wright et al., 2004). En el pollo este gen se expresa durante el desarrollo en el epitelio sensorial y en las neuronas de los ganglio auditivo y vestibular (Sánchez-Calderón et al., 2007). Durante el periodo embrionario tardío este gen se expresa únicamente en el ratón *Igf1*^{-/-} y presenta un patrón de expresión muy puntual limitándose a las células interfalángicas y las células del borde situadas cerca de las células ciliadas internas en la vuelta basal de la cóclea. Tras el nacimiento continúa la expresión, pero ya sin diferencias entre genotipos. Estos datos contribuyen a ampliar la información sobre la especificación del destino neural dentro del epitelio sensorial de la cóclea.

En la cóclea del ratón deficiente en *Igf1* se encuentra disminuida la expresión de genes como *Slc19a2*, *Slc5a7* y *Slc18a3* que se asocian al transporte de distintas moléculas en el organismo. Las mutaciones en el transportador de alta afinidad de tiamina (*Slc19a2*) cursan en el hombre con un síndrome caracterizado por diabetes, anemia y sordera neurosensorial. En la cóclea este transportador se expresa más en las células ciliadas internas que en las externas (Fleming et al., 2001) y su delección en el ratón conduce a una pérdida selectiva de células ciliadas internas (Lieberman et al., 2006). Un estudio posterior en este mismo modelo animal ha demostrado que las células ciliadas internas no son necesaria para la supervivencia de las neuronas del ganglio auditivo y ha puesto de manifiesto la importancia de las células de soporte del órgano de Corti en la supervivencia neuronal del oído interno adulto (Zilberstein et al., 2012). En la cóclea embrionaria del ratón deficiente en *Igf1* disminuye también la expresión de dos transportadores de neurotransmisores que son el transportador de colina *Slc5a7* y el de acetilcolina *Slc18a3*. Ambos se expresan en las células ciliadas del ratón durante el desarrollo (Bergeron et al., 2005) y son importantes para el tráfico en las vesículas sinápticas. También está disminuida la expresión de *Vamp1* que codifica una proteína de membrana de las vesículas sinápticas y se expresa en los polos células ciliadas, cerca de la sinapsis aferente y los estereocilios (Safieddine y Wenthold, 1999; Safieddine et al., 2002). El hecho de que la menor expresión de estos genes pueda afectar la transmisión en dichas vesículas, es coherente con observaciones previas de sinapsis anormales en las células ciliadas internas del ratón nulo *Igf1* (Camarero et al., 2001). Por el contrario, aumenta la expresión de *Mlc1*, que codifica una proteína que se localiza en las fibras aferentes de las células ciliadas internas (Tejido et al., 2007). Todos estos datos sustentan la idea de que IGF-1 es una molécula importante en la maduración de las neuronas auditivas y el refinamiento de las conexiones sinápticas en las células ciliadas del órgano de Corti.

Las alteraciones de la homeostasis y el transporte de iones también se asocian a la deficiencia de IGF-1 dado que genes como *Kcnd2*, *Kif17*, *Kcnmb1* y *Cacna1f* presentan niveles más bajos en la cóclea del ratón nulo. El gen *Kcnd2* codifica para el canal de potasio Kv4.2 que

se expresa en neuronas que inervan las células ciliadas del apex de la cóclea (Adamson et al., 2002). Este canal, que se encuentra exclusivamente en dendritas y regula su excitabilidad, es transportado desde la célula a las dendritas de las neuronas por *Kif17* (Chu et al., 2006; revisado por Wong-Riley y Besharse, 2012). El canal de potasio activado por calcio *Kcnmb1* se expresa en las células ciliadas de la cóclea (Langer et al., 2003), aunque el ratón nulo no presenta un fenotipo coclear obvio, ni discapacidad auditiva (Ruttiger et al., 2004). Por el contrario, la presencia del canal de calcio *Cacna1f* no se había descrito anteriormente en la cóclea del ratón, aunque ya se conocían mutaciones de este gen en humano que cursan con alteraciones de la función visual (las primeras fueron descritas por Strom et al., 1998). El ratón mutante condicional del gen *Cacna1f* presenta alteraciones en la neurotransmisión de la retina con una gran pérdida de sinapsis para los fotorreceptores (Mansergh et al., 2005). Además, entre los genes diferencialmente regulados en la cóclea del ratón nulo se incluye *Cldn18* que codifica una proteína de adhesión celular que se expresa en las células marginales de la estría vascular (Kitajiri et al., 2004) y el receptor relacionado con estrógeno *Esrrb*, cuyas mutaciones en el hombre cursan con una discapacidad auditiva autosómica recesiva no sindrómica (DFNB35) (Collin et al., 2008). Este receptor se expresa en las células marginales de la estría y controla el desarrollo de estas células productoras de la endolinfa en la cóclea (Chen y Nathans, 2005). Estos datos en su conjunto sugieren que la homeostasis y transporte de iones se encuentran afectados en la cóclea del ratón deficiente en *Igfl*.

Entre los defectos encontrados en el ratón deficiente, destacan la pérdida neuronal y las alteraciones en el ganglio auditivo. Esto sugiere que el IGF-1 promueve la diferenciación y supervivencia neuronal durante el desarrollo prenatal y postnatal temprano. En el estudio de los *arrays* de la cóclea del ratón deficiente en *Igfl* se confirmó que factores de transcripción como *Six6* y *Mash1* que regulan la especificación del destino neural se expresaban de forma diferencial. *Six6* es un miembro de la familia *Six/sine oculis* que se expresa en la retina, tálamo e hipotálamo desde el periodo neonatal hasta la edad adulta (Conte et al., 2005). El ratón deficiente en *Six6* presenta hipoplasia de la glándula pituitaria y de la retina, a menudo con ausencia de quiasma y nervio óptico. *Six6* regula la proliferación de células progenitoras durante la retinogénesis y el desarrollo de la glándula pituitaria en mamíferos (Li et al., 2002). *Mash1* es un factor de transcripción proneural de la familia *hélix-loop-hélix* (bHLH), que participa en la especificación de los progenitores neurales, promueve la salida del ciclo celular y la migración neuronal, y es importante en la especificación final de la identidad neuronal en el cerebro (Nakada et al., 2004; Castro et al., 2006). Recientemente se ha descrito que la sobre-expresión de *Mash1*, sólo o junto a *NeuroD1*, es suficiente para reprogramar células epiteliales no sensoriales de la cóclea a neuronas funcionales en etapa embrionaria y postnatal (Nishimura et al., 2014). La expresión de *Mash1* se localiza en la parte central del nervio auditivo, en la zona

de transición de la glía (Knipper et al., 1998), donde *Atoh1*, otro miembro perteneciente a la familia de factores de transcripción de bHLH (Fritzsche et al., 2006), juega un papel fundamental en la especificación de las células ciliadas internas y las neuronas auditivas centrales (Maricich et al., 2009). Estos datos en conjunto sugieren que los factores de transcripción bHLH son claves para la diferenciación y supervivencia de las neuronas de las vías auditivas central y periférica. La expresión de *Six6* y *Mash1* se encuentra aumentada en la cóclea embrionaria del ratón *Igf1*^{-/-}. Durante el desarrollo del oído interno en pollo se ha observado que IGF-1 promueve la diferenciación de los progenitores óticos neuronales a neuronas auditivas maduras (Camarero et al., 2003). Estos datos sugieren que durante el desarrollo normal del oído interno IGF-1 modula convenientemente la expresión de *Six6* y *Mash1* para facilitar la diferenciación neuronal.

El análisis *in silico* de los promotores de genes que regulados por IGF-1 confirmo que factores implicados en la diferenciación neuronal están muy regulados por el IGF-1. Este estudio ha puesto de manifiesto la importancia de MEF2 y su modulación por IGF-1 en la cóclea. La familia de factores de transcripción MEF2 (*Myocyte enhancer factor 2*) está codificada por cuatro genes *Mef2a, b, c* y *d* con diferencias en sus patrones de expresión según el tejido o el punto temporal, pero que se expresan conjuntamente a lo largo del desarrollo y en el músculo esquelético adulto y otros tejidos (Heidenreich y Linseman, 2004; Potthoff y Olson, 2007; Neely et al., 2009). Además existen evidencias de que estos factores de transcripción pueden actuar de manera no redundante en el músculo esquelético de mamíferos y regular de forma individual distintos genes en este tejido (Estrella et al., 2014). IGF-1 interacciona con algunos de estos factores para dar diferentes resultados: i) bloquea la degradación de MEF2D mediada por caspasas durante la apoptosis neuronal y aumenta la vida media de las neuronas (Butts et al., 2003); ii) estimula la activación de MEF2C, factor clave en el desarrollo cardiovascular y en la hipertrofia cardíaca, lo que podría conducir a hipertrofia de los cardiomiocitos (Muñoz et al., 2009). En ambos tipos celulares IGF-I activa MEF2 al disminuir su tasa de degradación y prevenir la traslocación del núcleo al citoplasma (Montessuit et al., 2004). MEF2 se encuentra implicado en la modulación de la plasticidad sináptica del cerebro de los roedores durante el desarrollo y en la edad adulta (Flavell et al., 2006; Rashid et al., 2014).

En este tejido, MEF2A y MEF2D se expresan de forma conjunta en casi todas las neuronas del cuerpo estriado y la corteza cerebral, pero no en astrocitos. En general, ambos factores se localizan en el núcleo de las neuronas, aunque a nivel subcortical también se ha observado la expresión citoplasmática de MEF2A (Neely et al., 2009). En la cóclea del ratón deficiente en *Igf1* a E18,5 y P15 los factores de transcripción MEF2A y D se localizan principalmente en las neuronas del ganglio auditivo. Los niveles nucleares de proteína de MEF2A y MEF2B son elevados en ambos casos durante el periodo embrionario y disminuyen

en la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-} en desarrollo. De la misma forma, la expresión de los genes *Mef2a* y *Mef2d* se encuentra aumentada en la cóclea del ratón nulo durante la etapa embrionaria y disminuye en la postnatal. Al igual que en la cóclea, la expresión de ambos genes en los núcleos cocleares del ratón nulo se encuentra disminuida en la etapa postnatal. Los datos anteriores hacen pensar que MEF2A y MEF2D son dianas importantes en la acción de IGF-1 en el oído interno y pueden tener un papel fundamental durante el desarrollo de la cóclea. Es la primera vez que los factores de transcripción MEF2 han sido descritos en el ganglio auditivo. La deficiencia de IGF-1 en los núcleos cocleares se podría asociar a cambios en la regulación sináptica de las neuronas auditivas de la vía central, y que son secundarios a la disminución de la expresión de MEF2.

Ya se ha comentado anteriormente el hecho de que es llamativo que el tamaño de la cóclea del ratón deficiente en *Igf1* sea prácticamente normal en el momento del nacimiento, si tenemos en cuenta las diferencias en el peso corporal y las alteraciones en el crecimiento que presentan estos animales. La fase proliferativa coclear finaliza en un estadio en el que podría ser la acción del IGF-2 la que mantiene esta etapa. Bien porque sea el factor que de forma natural esté actuando, bien porque existan uno o varios mecanismos adicionales de compensación de la mutación. El análisis in silico, ya citado, también indicó que la deficiencia de *Igf1* en la cóclea del ratón aumenta la expresión *Foxm1* durante el periodo embrionario y postnatal temprano. FoxM1 es un factor de transcripción asociado a proliferación perteneciente a la familia *Forkhead box* y cuyas funciones son críticas en la progresión del ciclo celular y en la mitosis (Wang et al, 2005; Laoukili et al, 2007). La expresión de FoxM1 se induce durante la fase G1 del ciclo celular y se mantiene durante la fase S y la mitosis (Ye et al., 1999). En el ratón se expresa durante el desarrollo embrionario y en el adulto sólo en células en proliferación (Korver et al., 1997). Una vez concluye la etapa de diferenciación y se produce la salida del ciclo celular, la expresión de FoxM1 se extingue (Korver et al., 1997). Su presencia en la cóclea en desarrollo no se había descrito previamente. La activación de este factor en la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-} se ha confirmado mediante estudio de su localización nuclear a edad embrionaria y postnatal y por la inhibición de una de sus dianas de ciclo celular que es el inhibidor de ciclina dependiente de quinasa p27^{Kip1}. Fox M1 promueve la progresión del ciclo celular mediante disminución de la expresión de p27kip1 a través de distintos mecanismos (Wang et al., 2005; Petrovic et al., 2007). Por el contrario, la expresión de otros genes implicados en ciclo celular se encuentra disminuida en la cóclea embrionaria del ratón deficiente en *Igf1*. Este es el caso de INCENP, proteína del centrómero que, junto con Aurora B, Survivina y Borealina, forma parte de un complejo proteico que actúa durante la mitosis a distintos niveles: corrección de errores en el anclaje de los cromosomas a los microtúbulos del huso mitótico, activación del mecanismo para el correcto ensamblaje del huso y regulación del sistema contráctil que regula la

citocinesis. Por tanto, niveles bajos de esta proteína se podrían asociar a una incorrecta segregación de los cromosomas (Ruchaud et al., 2007; Carmena et al., 2012). IGF-1 es un factor importante en la progresión del ciclo celular y se ha descrito que distintos tipos celulares presentes en el ratón *Igf1*^{-/-} durante el periodo postnatal temprano, incluyendo neuronas auditivas, son más pequeños e inmaduros que en el ratón *Igf1*^{+/+} (Adesanya et al., 1999; Camarero et al., 2001 y 2002). Estos datos sugieren que la activación de FoxM1 podría estar contribuyendo a compensar el desequilibrio en la progresión del ciclo celular causado por la deficiencia de IGF-1.

2. Patrón de expresión espacio-temporal de elementos del sistema IGF en la cóclea durante el desarrollo

Con el objetivo de comprender mejor que elementos del sistema IGF participan en la regulación del desarrollo auditivo, se estudiaron los elementos que lo conforman. Hay numerosísimos estudios dedicados a describir los patrones temporales y espaciales del sistema, según se detallan en la tabla 2 del anexo. Salvo en el caso de *Ins1* e *Ins2* cuya expresión está restringida al páncreas, la expresión del resto de los genes *Igf1*, *Igf2*, *Igf1r*, *Insr*, *Igfbp1*, *Igfbp2*, *Igfbp3*, *Igfbp4*, *Igfbp5*, *Igfbp6*, *Igfbp7*, *Irs1*, *Irs2* y *Ptpn1* se puede observar en una variedad de tejidos y órganos. Como técnicas de detección se han preferido la hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica (IHQ), aunque en aquellos casos en los que no había recopilados datos de expresión de estas técnicas también se han empleado datos provenientes de experimentos de RT-qPCR y *Western blotting*.

El *Igf1* y su receptor de alta afinidad *Igf1r* se expresan en la cóclea de ratón durante el desarrollo. A E15,5 *Igf1* se localiza en las zonas que darán lugar a la estría vascular, limbo espiral y surco externo. A E18,5 continúa en estría vascular y limbo espiral y a P5 su localización se restringe a las células marginales de la estría vascular. En el caso de *Igf1r*, se expresa de forma ubicua a E15,5 y E18,5 y a P5 su patrón de expresión se restringe al surco espiral interno y a las células de Hensen, Claudius y basales de la estría vascular. De la misma forma, un estudio de Okano y colaboradores (2011) localiza la expresión de *Igf1* a E13,5; E14,5; E16,5 y P0 en la zona de la futura estría vascular. La expresión de *Igf2* se superpone parcialmente a la de *Igf1* y se localiza en el borde lateral del conducto coclear y el mesénquima circundante. *Igf1r* se expresa desde E10,5 en la región ventral del otocisto con un patrón difuso, en E13,4; E14,5 y E16,5 se localiza en el conducto coclear y en el ganglio espiral y a P0 se restringe al conducto coclear y las células basales de la estría vascular. Los niveles de expresión de *Igf2* e *Igf1r* no varían a las tres edades estudiadas (E13,5; E16,5 y P0), mientras que la expresión de *Igf1* aumenta significativamente entre los distintos puntos temporales. El hecho de

que la expresión de *Igf2* en la cóclea se superponga a la de *Igf1* sugiere una posible compensación funcional en los ratones deficientes de *Igf1*. En un estudio posterior de Okano y Kelley (2013) se ha comprobado que las *Igfbp2*, 3, 4 y 5 se expresan durante el desarrollo embrionario en la cóclea con patrones específicos y complementarios. La expresión de cada una de ellas aumenta de forma significativa entre E13,5 y P0. Debido al papel principalmente modulador de las IGFBP en las vías de señalización del sistema IGF, esto podría sugerir que las IGFBP aumentan a la par que el IGF-1 con el fin de regular su presentación a tipos celulares concretos, cumpliendo funciones de almacenamiento, etc., que aún no están bien definidas.

En resumen, algunos de los elementos más importantes del sistema IGF se expresan en la cóclea durante el desarrollo siguiendo unas pautas específicas espacio-temporales. Cuando se compararon estos patrones con los que presentan los animales deficientes en *Igf1*, se obtuvieron algunas claves. Por ejemplo, los niveles de expresión de *Igf1r* aumentan tras el nacimiento y continúan elevados hasta los tres meses de edad por encima de los de los ratones silvestres. Esto en principio podría hacer pensar en una compensación parcial del déficit por un aumento de la expresión del receptor de IGF-1. Hipótesis que se confirma porque la fracción fosforilada, aunque menor que la del ratón silvestre, se mantiene con el tiempo en lugar de disminuir.

Las principales vías de señalización del sistema IGF se ven afectadas por la deficiencia de IGF-1 en la cóclea embrionaria, lo que va a suponer una desregulación intracelular. En este escenario disminuyen la vía de PI3K-Akt asociada a supervivencia y la de ERK1/2 asociada a proliferación y aumentan los niveles de la p38 MAPK que promueve acciones inflamatorias.

El estudio de la expresión del sistema en otros órganos indica que las acciones proliferativas se mantienen mediante una combinación IGF-2/IGFR1, mientras que las acciones en supervivencia no se compensan y el déficit crónico de IGF-1 causa inflamación en todos los tejidos estudiados.

3. Estudio del ratón deficiente en *Igf1* durante el envejecimiento auditivo

IGF-1 tiene un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso y en la neurogénesis durante la etapa adulta. Los niveles circulantes de IGF-1 disminuyen con la edad y este descenso se ha relacionado con alteraciones cerebrales y cognitivas asociadas a la edad. Las mutaciones en el gen *IGF1* que producen una disminución de los niveles de IGF-1 y de su afinidad por el receptor cursan con sordera neurosensorial (Woods et al., 1996; Bonapace et al., 2003; Coutinho et al., 2007; Walenkamp et al., 2005 y 2007). Aunque los niveles circulantes de IGF-1 disminuyen con la edad, no se ha demostrado que la pérdida de audición asociada al envejecimiento esté relacionada con la disminución en los niveles de este factor.

El estudio de los ratones *Igf1*^{+/+}, *Igf1*^{+/-} e *Igf1*^{-/-} a lo largo de un periodo de doce meses desde el nacimiento nos ha permitido comparar los niveles séricos de IGF-1 con el peso corporal y la glucemia entre genotipos. El peso corporal de los ratones deficientes en *Igf1* se ha mantenido significativamente bajo a lo largo de todo el periodo estudiado con respecto a los otros dos genotipos, lo cual es consistente con el fallo del crecimiento postnatal ya descrito (Baker et al., 1993). Los niveles de IGF-1 en los ratones *Igf1*^{+/+}, *Igf1*^{+/-} disminuyen progresivamente entre 1 y 12 meses, manteniéndose siempre más elevados en los ratones *Igf1*^{+/+} y no se detectaron en el caso de los ratones deficientes en *Igf1*.

Como ya se ha comentado anteriormente, los ratones *Igf1*^{-/-} presentan sordera profunda desde el mes de edad (Cediel et al., 2006) que se mantiene durante todo el periodo estudiado. Los ratones *Igf1*^{+/-} e *Igf1*^{+/+} comienzan a perder capacidad auditiva a partir de los 6 meses de edad, aunque en los primeros el incremento de los umbrales auditivos entre los 9-12 meses se produce antes. A los doce meses la pérdida auditiva en los dos genotipos es similar a la que presenta el ratón deficiente en *Igf1*. Desde el mes hasta los doce meses de edad, los umbrales auditivos del ratón *Igf1*^{+/+} experimentan una elevación gradual de 30-40 dB SPL, que progresa de forma paralela al descenso en sus niveles circulantes de IGF-1. En resumen, el ratón *Igf1*^{-/-} presenta una sordera temprana profunda, mientras que en los ratones *Igf1*^{+/-} e *Igf1*^{+/+} se produce un deterioro con la edad. Frente a estos datos que parecen indicar que el IGF-1 es un protector del envejecimiento, se ha postulado que una menor actividad del IGF1R y de la vía mTOR tiene un efecto protector, puesto que bajas tasas de actividad del IGF1R se asocian con retraso del envejecimiento, restricción calórica y aumento de la longevidad en diversas especies, incluyendo el ratón y el hombre (Berryman et al., 2008; Narasimhan et al., 2009; Salminen & Kaarniranta, 2010; White et al., 2014). En el ratón la restricción calórica aporta cierta protección frente a la presbiacusia y preserva de la degeneración a distintos elementos cocleares tales como las células del ganglio auditivo (Someya et al., 2007).

A pesar de su temprana aparición, la morfología aberrante coclear del ratón *Igf1*^{-/-} y el fenotipo de pérdida neuronal que presenta en torno al mes de edad no progresan durante el envejecimiento. No está claro si el fenotipo se debe a un defecto del programa de desarrollo, a una degeneración prematura o a ambos, aunque el análisis del transcriptoma de la cóclea del ratón deficiente en *Igf1* parece indicar más bien un retraso en el desarrollo. Por otro lado, en el ganglio coclear del ratón *Igf1*^{+/+} se produce una pérdida progresiva de neuronas que con la edad evoluciona hasta alcanzar una situación similar a la ya descrita para el ratón nulo en su etapa neonatal. Estos datos sugieren la posible existencia de una subpoblación de neuronas auditivas, dependientes de IGF-1 para su supervivencia o diferenciación final, aunque la mayor parte de las neuronas cocleares adultas pueden sobrevivir en ausencia de dicho factor. La pérdida neuronal asociada a la edad que se produce en el ganglio auditivo del ratón *Igf1*^{+/+} durante el

envejecimiento sigue un patrón temporal similar al descrito anteriormente para el descenso de los niveles de IGF-1 circulantes.

La degeneración de la cóclea se ha asociado a la disminución de los niveles de IGF-1 y al envejecimiento en otros modelos de pérdida auditiva asociada a la edad (Riva et al., 2007; Ng et al., 2015). En los ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* no se detecta pérdida de células ciliadas a las edades estudiadas. Sin embargo, la deficiencia de IGF-1 produce degeneración de la estructura encargada de la función metabólica en la cóclea, la estría vascular. Este fenómeno es similar, aunque más tardío, al presentado por el ratón *Irs2^{-/-}* con un fenotipo coclear diabético (Murillo-Cuesta et al., 2012). La degeneración de la estría vascular es una característica común en la fisiopatología de la presbiacusia de numerosas especies (Ohlemiller et al., 2009; Mannstrom et al., 2013) y de otras patologías que se asocian a pérdida auditiva como la diabetes mellitus, ciertas enfermedades autoinmunes y la hipertensión sistémica (Frisina et al., 2006; Fukushima et al., 2006).

Conclusiones

CONCLUSIONES

El estudio del modelo animal ha permitido observar cómo el descenso de los niveles de IGF-1 a lo largo de la vida natural del ratón silvestre va acompañado de un incremento de los umbrales auditivos y el estudio de la morfología coclear en este animal muestra una disminución de la densidad neuronal del ganglio auditivo que coincide en el tiempo con la pérdida auditiva.

La deficiencia de IGF-1 a edad temprana altera la función auditiva, pero no la función vestibular. Aunque morfológicamente las diferencias en la cóclea entre los ratones *Igf1*^{-/-} e *Igf1*^{+/+} puedan parecer leves, molecularmente si se han encontrado alteraciones que correlacionan con la pérdida de función.

El estudio de la expresión celular del IGF-1 y de su receptor de alta afinidad durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano en la cóclea muestra un patrón de expresión complementario entre factor y receptor. En la cóclea, los animales deficientes en *Igf1* presentan una mayor expresión génica del receptor durante los primeros meses de vida que indica que podría existir una compensación de la deficiencia crónica del IGF-1 por parte de otros elementos del sistema como IGF1R. En otros órganos estudiados el estudio de expresión indica que la proliferación se mantiene gracias a la acción combinada de IGF-2 e IGF1R.

La búsqueda de posibles dianas del IGF-1 en la cóclea mediante *arrays* y el posterior análisis de la expresión génica durante el desarrollo han permitido identificar numerosos genes que se expresan de forma diferencial en la cóclea del ratón *Igf1*^{-/-}:

Se describen por primera vez los factores de transcripción MEF2, moduladores de la plasticidad sináptica, en el ganglio auditivo del ratón.

Se ha estudiado la posible modulación por parte de IGF-I durante el desarrollo normal del oído de los factores de transcripción *Six6* y *Mash1* para facilitar la diferenciación neuronal.

Se ha estudiado la expresión de FoxM1 en la cóclea del ratón deficiente en *Igf1* cuya activación podría estar contribuyendo a compensar el desequilibrio en la progresión del ciclo celular causado por la deficiencia de IGF-1.

Bibliografía

- Abu-Safieh, L., E. B. Abboud, H. Alkuraya, H. Shamseldin, S. Al-Enzi, L. Al-Abdi, M. Hashem, D. Colak, A. Jarallah, H. Ahmad, S. Bobis, G. Nemer, F. Bitar, and F. S. Alkuraya. 2011. 'Mutation of IGFBP7 causes upregulation of BRAF/MEK/ERK pathway and familial retinal arterial macroaneurysms', *Am J Hum Genet*, 89: 313-9.
- Aburto, M. R., J. M. Hurle, I. Varela-Nieto, and M. Magarinos. 2012. 'Autophagy during vertebrate development', *Cells*, 1: 428-48.
- Aburto, M. R., M. Magarinos, Y. Leon, I. Varela-Nieto, and H. Sanchez-Calderon. 2012. 'AKT signaling mediates IGF-I survival actions on otic neural progenitors', *PLoS One*, 7: e30790.
- Aburto, M. R., H. Sanchez-Calderon, J. M. Hurle, I. Varela-Nieto, and M. Magarinos. 2012. 'Early otic development depends on autophagy for apoptotic cell clearance and neural differentiation', *Cell Death Dis*, 3: e394.
- Abuzzahab, M. J., A. Schneider, A. Goddard, F. Grigorescu, C. Lautier, E. Keller, W. Kiess, J. Klammt, J. Kratzsch, D. Osgood, R. Pfaffle, K. Raile, B. Seidel, R. J. Smith, S. D. Chernausek, and Group Intrauterine Growth Retardation Study. 2003. 'IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation', *N Engl J Med*, 349: 2211-22.
- Adams, T. E., V. C. Epa, T. P. Garrett, and C. W. Ward. 2000. 'Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor', *Cell Mol Life Sci*, 57: 1050-93.
- Adamson, C. L., M. A. Reid, Z. L. Mo, J. Bowne-English, and R. L. Davis. 2002. 'Firing features and potassium channel content of murine spiral ganglion neurons vary with cochlear location', *J Comp Neurol*, 447: 331-50.
- Adesanya, O. O., J. Zhou, C. Samathanam, L. Powell-Braxton, and C. A. Bondy. 1999. 'Insulin-like growth factor 1 is required for G2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 3287-91.
- Ahlgren, U., J. Jonsson, and H. Edlund. 1996. 'The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice', *Development*, 122: 1409-16.
- Andre, E., F. Conquet, M. Steinmayr, S. C. Stratton, V. Porciatti, and M. Becker-Andre. 1998. 'Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice', *Embo J*, 17: 3867-77.
- Annunziata, M., R. Granata, and E. Ghigo. 2011. 'The IGF system', *Acta Diabetol*, 48: 1-9.
- Araki, E., M. A. Lipes, M. E. Patti, J. C. Bruning, B. Haag, 3rd, R. S. Johnson, and C. R. Kahn. 1994. 'Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene', *Nature*, 372: 186-90.
- Arima, T., R. A. Drewell, K. L. Arney, J. Inoue, Y. Makita, A. Hata, M. Oshimura, N. Wake, and M. A. Surani. 2001. 'A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus', *Hum Mol Genet*, 10: 1475-83.
- Asayesh, A., T. Alanentalo, N. K. Khoo, and U. Ahlgren. 2005. 'Developmental expression of metalloproteases ADAM 9, 10, and 17 becomes restricted to divergent pancreatic compartments', *Dev Dyn*, 232: 1105-14.
- Attias, J., O. Zarchi, B. I. Nageris, and Z. Laron. 2012. 'Cochlear hearing loss in patients with Laron syndrome', *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 269: 461-6.
- Baguma-Nibasheka, M., and B. Kablar. 2008. 'Pulmonary hypoplasia in the connective tissue growth factor (Ctgf) null mouse', *Dev Dyn*, 237: 485-93.
- Bains, M., M. L. Florez-McClure, and K. A. Heidenreich. 2009. 'Insulin-like growth factor-I prevents the accumulation of autophagic vesicles and cell death in Purkinje neurons by increasing the rate of autophagosome-to-lysosome fusion and degradation', *J Biol Chem*, 284: 20398-407.
- Baker, J., J. P. Liu, E. J. Robertson, and A. Efstratiadis. 1993. 'Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth', *Cell*, 75: 73-82.
- Barrenas, M. L., A. Brattthall, and J. Dahlgren. 2005. 'The association between short stature and sensorineural hearing loss', *Hear Res*, 205: 123-30.

- Barrenas, M., K. Landin-Wilhelmsen, and C. Hanson. 2000. 'Ear and hearing in relation to genotype and growth in Turner syndrome', *Hear Res*, 144: 21-8.
- Baxter, R. C. 2000. 'Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278: E967-76.
- Belfiore, A. 2007. 'The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer', *Curr Pharm Des*, 13: 671-86.
- Ben Lagha, N., D. Seurin, Y. Le Bouc, M. Binoux, A. Berdal, P. Menuelle, and S. Babajko. 2006. 'Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-1) involvement in intrauterine growth retardation: study on IGFBP-1 overexpressing transgenic mice', *Endocrinology*, 147: 4730-7.
- Bergeron, A. L., A. Schrader, D. Yang, A. A. Osman, and D. D. Simmons. 2005. 'The final stage of cholinergic differentiation occurs below inner hair cells during development of the rodent cochlea', *J Assoc Res Otolaryngol*, 6: 401-15.
- Bhushan, A., N. Itoh, S. Kato, J. P. Thiery, P. Czernichow, S. Bellusci, and R. Scharfmann. 2001. 'Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis', *Development*, 128: 5109-17.
- Black, B. L., and E. N. Olson. 1998. 'Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14: 167-96.
- Blackshaw, S., S. Harpavat, J. Trimarchi, L. Cai, H. Huang, W. P. Kuo, G. Weber, K. Lee, R. E. Fraioli, S. H. Cho, R. Yung, E. Asch, L. Ohno-Machado, W. H. Wong, and C. L. Cepko. 2004. 'Genomic analysis of mouse retinal development', *PLoS Biol*, 2: E247.
- Boeda, B., A. El-Amraoui, A. Bahloul, R. Goodyear, L. Daviet, S. Blanchard, I. Perfettini, K. R. Fath, S. Shorte, J. Reiners, A. Houdusse, P. Legrain, U. Wolfrum, G. Richardson, and C. Petit. 2002. 'Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle', *Embo J*, 21: 6689-99.
- Boisclair, Y. R., R. P. Rhoads, I. Ueki, J. Wang, and G. T. Ooi. 2001. 'The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system', *J Endocrinol*, 170: 63-70.
- Bonapace, G., D. Concolino, S. Formicola, and P. Strisciuglio. 2003. 'A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency', *J Med Genet*, 40: 913-7.
- Bunn, R. C., and J. L. Fowlkes. 2003. 'Insulin-like growth factor binding protein proteolysis', *Trends Endocrinol Metab*, 14: 176-81.
- Butts, B. D., D. A. Linseman, S. S. Le, T. A. Laessig, and K. A. Heidenreich. 2003. 'Insulin-like growth factor-I suppresses degradation of the pro-survival transcription factor myocyte enhancer factor 2D (MEF2D) during neuronal apoptosis', *Horm Metab Res*, 35: 763-70.
- Calvaruso, G., R. Vento, M. Giuliano, M. Lauricella, E. Gerbino, and G. Tesoriere. 1996. 'Insulin-like growth factors in chick embryo retina during development', *Regul Pept*, 61: 19-25.
- Camarero, G., C. Avendano, C. Fernandez-Moreno, A. Villar, J. Contreras, F. de Pablo, J. G. Pichel, and I. Varela-Nieto. 2001. 'Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice', *J Neurosci*, 21: 7630-41.
- Camarero, G., Y. Leon, I. Gorospe, F. De Pablo, B. Alsina, F. Giraldez, and I. Varela-Nieto. 2003. 'Insulin-like growth factor 1 is required for survival of transit-amplifying neuroblasts and differentiation of otic neurons', *Dev Biol*, 262: 242-53.
- Camarero, G., M. A. Villar, J. Contreras, C. Fernandez-Moreno, J. G. Pichel, C. Avendano, and I. Varela-Nieto. 2002. 'Cochlear abnormalities in insulin-like growth factor-1 mouse mutants', *Hear Res*, 170: 2-11.
- Carmena, M., M. Wheelock, H. Funabiki, and W. C. Earnshaw. 2012. 'The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 789-803.
- Carroll, K., C. Gomez, and L. Shapiro. 2004. 'Tubby proteins: the plot thickens', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 55-63.
- Castro, D. S., D. Skowronska-Krawczyk, O. Armant, I. J. Donaldson, C. Parras, C. Hunt, J. A. Critchley, L. Nguyen, A. Gossler, B. Gottgens, J. M. Matter, and F. Guillemot. 2006.

- 'Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif', *Dev Cell*, 11: 831-44.
- Caton, J., P. Bringas, Jr., and M. Zeichner-David. 2005. 'IGFs increase enamel formation by inducing expression of enamel mineralizing specific genes', *Arch Oral Biol*, 50: 123-9.
- Cifuentes, Merchán. 1983. *El oído interno : ultraestructura, embriogénesis y algunos aspectos patológicos* (Universidad: Salamanca).
- Clemmons, D. R. 2001. 'Use of mutagenesis to probe IGF-binding protein structure/function relationships', *Endocr Rev*, 22: 800-17.
- Clemmons, D. R., M. Sleevi, G. Allan, and A. Sommer. 2007. 'Effects of combined recombinant insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 in type 2 diabetic patients on glycemic control and distribution of IGF-I and IGF-II among serum binding protein complexes', *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 2652-8.
- Collin, G. B., E. Cyr, R. Bronson, J. D. Marshall, E. J. Gifford, W. Hicks, S. A. Murray, Q. Y. Zheng, R. S. Smith, P. M. Nishina, and J. K. Naggert. 2005. 'Alms1-disrupted mice recapitulate human Alstrom syndrome', *Hum Mol Genet*, 14: 2323-33.
- Collin, R. W., E. Kalay, M. Tariq, T. Peters, B. van der Zwaag, H. Venselaar, J. Oostrik, K. Lee, Z. M. Ahmed, R. Caylan, Y. Li, H. A. Spierenburg, E. Eyupoglu, A. Heister, S. Riazuddin, E. Bahat, M. Ansar, S. Arslan, B. Wollnik, H. G. Brunner, C. W. Cremers, A. Karaguzel, W. Ahmad, F. P. Cremers, G. Vriend, T. B. Friedman, S. M. Leal, and H. Kremer. 2008. 'Mutations of ESRRB encoding estrogen-related receptor beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35', *Am J Hum Genet*, 82: 125-38.
- Combes, A. N., E. Lesieur, V. R. Harley, A. H. Sinclair, M. H. Little, D. Wilhelm, and P. Koopman. 2009. 'Three-dimensional visualization of testis cord morphogenesis, a novel tubulogenic mechanism in development', *Dev Dyn*, 238: 1033-41.
- Conover, C. A., L. K. Bale, M. T. Overgaard, E. W. Johnstone, U. H. Laursen, E. M. Fuchtbauer, C. Oxvig, and J. van Deursen. 2004. 'Metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein A is a critical growth regulatory factor during fetal development', *Development*, 131: 1187-94.
- Conte, I., J. Morcillo, and P. Bovolenta. 2005. 'Comparative analysis of Six 3 and Six 6 distribution in the developing and adult mouse brain', *Dev Dyn*, 234: 718-25.
- Coppens, A. G., R. Kiss, C. W. Heizmann, B. W. Schafer, and L. Poncelet. 2001. 'Immunolocalization of the calcium binding S100A1, S100A5 and S100A6 proteins in the dog cochlea during postnatal development', *Brain Res Dev Brain Res*, 126: 191-9.
- Couloigner, V., M. Teixeira, O. Sterkers, H. Rask-Andersen, and E. Ferrary. 2004. '[The endolymphatic sac: its roles in the inner ear]', *Med Sci (Paris)*, 20: 304-10.
- Courtland, H. W., S. Elis, Y. Wu, H. Sun, C. J. Rosen, K. J. Jepsen, and S. Yakar. 2011. 'Serum IGF-1 affects skeletal acquisition in a temporal and compartment-specific manner', *PLoS One*, 6: e14762.
- Coutinho, D. C., R. R. Coletta, E. M. Costa, P. R. Pachi, M. C. Boguszewski, D. Damiani, B. B. Mendonca, I. J. Arnhold, and A. A. Jorge. 2007. 'Polymorphisms identified in the upstream core polyadenylation signal of IGF1 gene exon 6 do not cause pre- and postnatal growth impairment', *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 4889-92.
- Coveney, D., A. J. Ross, J. D. Slone, and B. Capel. 2007. 'A microarray analysis of the XX Wnt4 mutant gonad targeted at the identification of genes involved in testis vascular differentiation', *Gene Expr Patterns*, 7: 82-92.
- Chang, W., P. ten Dijke, and D. K. Wu. 2002. 'BMP pathways are involved in otic capsule formation and epithelial-mesenchymal signaling in the developing chicken inner ear', *Dev Biol*, 251: 380-94.
- Chen, J., and J. Nathans. 2007. 'Estrogen-related receptor beta/NR3B2 controls epithelial cell fate and endolymph production by the stria vascularis', *Dev Cell*, 13: 325-37.
- Chen, P., J. E. Johnson, H. Y. Zoghbi, and N. Segil. 2002. 'The role of Math1 in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination', *Development*, 129: 2495-505.

- Chen, Y., and D. J. Klionsky. 2011. 'The regulation of autophagy - unanswered questions', *J Cell Sci*, 124: 161-70.
- Chiang, M. K., and J. G. Flanagan. 1996. 'PTP-NP, a new member of the receptor protein tyrosine phosphatase family, implicated in development of nervous system and pancreatic endocrine cells', *Development*, 122: 2239-50.
- Cho, Y., T. W. Gong, T. Stover, M. I. Lomax, and R. A. Altschuler. 2002. 'Gene expression profiles of the rat cochlea, cochlear nucleus, and inferior colliculus', *J Assoc Res Otolaryngol*, 3: 54-67.
- Choi, J. H., M. Kang, G. H. Kim, M. Hong, H. Y. Jin, B. H. Lee, J. Y. Park, S. M. Lee, E. J. Seo, and H. W. Yoo. 2011. 'Clinical and functional characteristics of a novel heterozygous mutation of the IGF1R gene and IGF1R haploinsufficiency due to terminal 15q26.2->qter deletion in patients with intrauterine growth retardation and postnatal catch-up growth failure', *J Clin Endocrinol Metab*, 96: E130-4.
- Chu, P. J., J. F. Rivera, and D. B. Arnold. 2006. 'A role for Kif17 in transport of Kv4.2', *J Biol Chem*, 281: 365-73.
- Danti, S., D. D'Alessandro, A. Pietrabissa, M. Petrini, and S. Berrettini. 2010. 'Development of tissue-engineered substitutes of the ear ossicles: PORP-shaped poly(propylene fumarate)-based scaffolds cultured with human mesenchymal stromal cells', *J Biomed Mater Res A*, 92: 1343-56.
- Davies, K., L. Bowden, P. Smith, W. Dean, D. Hill, H. Furuumi, H. Sasaki, B. Cattanaach, and W. Reik. 2002. 'Disruption of mesodermal enhancers for Igf2 in the minute mutant', *Development*, 129: 1657-68.
- De Meyts, P., and J. Whittaker. 2002. 'Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design', *Nat Rev Drug Discov*, 1: 769-83.
- De Wolf, E., R. Gill, S. Geddes, J. Pitts, A. Wollmer, and J. Grotzinger. 1996. 'Solution structure of a mini IGF-1', *Protein Sci*, 5: 2193-202.
- Deltour, L., P. Leduque, N. Blume, O. Madsen, P. Dubois, J. Jami, and D. Bucchini. 1993. 'Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 527-31.
- DeMambro, V. E., M. Kawai, T. L. Clemens, K. Fulzele, J. A. Maynard, C. Marin de Evsikova, K. R. Johnson, E. Canalis, W. G. Beamer, C. J. Rosen, and L. R. Donahue. 2010. 'A novel spontaneous mutation of Irs1 in mice results in hyperinsulinemia, reduced growth, low bone mass and impaired adipogenesis', *J Endocrinol*, 204: 241-53.
- Denley, A., J. C. Wallace, L. J. Cosgrove, and B. E. Forbes. 2003. 'The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review', *Horm Metab Res*, 35: 778-85.
- Denley, A., C. C. Wang, K. A. McNeil, M. J. Walenkamp, H. van Duyvenvoorde, J. M. Wit, J. C. Wallace, R. S. Norton, M. Karperien, and B. E. Forbes. 2005. 'Structural and functional characteristics of the Val44Met insulin-like growth factor I missense mutation: correlation with effects on growth and development', *Mol Endocrinol*, 19: 711-21.
- Dichmann, D. S., H. Yassin, and P. Serup. 2006. 'Analysis of pancreatic endocrine development in GDF11-deficient mice', *Dev Dyn*, 235: 3016-25.
- Diez-Roux, G., S. Banfi, M. Sultan, L. Geffers, S. Anand, D. Rozado, A. Magen, E. Canidio, M. Pagani, I. Peluso, N. Lin-Marq, M. Koch, M. Bilio, I. Cantiello, R. Verde, C. De Masi, S. A. Bianchi, J. Cicchini, E. Perroud, S. Mehmeti, E. Dagand, S. Schrunner, A. Nurnberger, K. Schmidt, K. Metz, C. Zwingmann, N. Brieske, C. Springer, A. M. Hernandez, S. Herzog, F. Grabbe, C. Sieverding, B. Fischer, K. Schrader, M. Brockmeyer, S. Dettmer, C. Helbig, V. Alunni, M. A. Battaini, C. Mura, C. N. Henrichsen, R. Garcia-Lopez, D. Echevarria, E. Puelles, E. Garcia-Calero, S. Kruse, M. Uhr, C. Kauck, G. Feng, N. Milyaev, C. K. Ong, L. Kumar, M. Lam, C. A. Semple, A. Gyenesei, S. Mundlos, U. Radelof, H. Lehrach, P. Sarmientos, A. Reymond, D. R. Davidson, P. Dolle, S. E. Antonarakis, M. L. Yaspo, S. Martinez, R. A. Baldock, G. Eichele, and A. Ballabio. 2011. 'A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo', *PLoS Biol*, 9: e1000582.

- Dodou, E., D. B. Sparrow, T. Mohun, and R. Treisman. 1995. 'MEF2 proteins, including MEF2A, are expressed in both muscle and non-muscle cells', *Nucleic Acids Res*, 23: 4267-74.
- Domene, H. M., V. Hwa, H. G. Jasper, and R. G. Rosenfeld. 2011. 'Acid-labile subunit (ALS) deficiency', *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25: 101-13.
- Downward, J. 2003. 'Role of receptor tyrosine kinases in G-protein-coupled receptor regulation of Ras: transactivation or parallel pathways?', *Biochem J*, 376: e9-10.
- Easterday, M. C., J. D. Dougherty, R. L. Jackson, J. Ou, I. Nakano, A. A. Paucar, B. Roobini, M. Dianati, D. K. Irvin, I. L. Weissman, A. V. Terskikh, D. H. Geschwind, and H. I. Kornblum. 2003. 'Neural progenitor genes. Germinal zone expression and analysis of genetic overlap in stem cell populations', *Dev Biol*, 264: 309-22.
- Eckstein, F., T. Pavicic, S. Nedbal, C. Schmidt, U. Wehr, W. Rambeck, E. Wolf, and A. Hoefflich. 2002. 'Insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) overexpression negatively regulates bone size and mass, but not density, in the absence and presence of growth hormone/IGF-I excess in transgenic mice', *Anat Embryol (Berl)*, 206: 139-48.
- Ester, W. A., H. A. van Duyvenvoorde, C. C. de Wit, A. J. Broekman, C. A. Ruivenkamp, L. C. Govaerts, J. M. Wit, A. C. Hokken-Koelega, and M. Losekoot. 2009. 'Two short children born small for gestational age with insulin-like growth factor 1 receptor haploinsufficiency illustrate the heterogeneity of its phenotype', *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 4717-27.
- Estrella, N. L., C. A. Desjardins, S. E. Nocco, A. L. Clark, Y. Maksimenko, and F. J. Naya. 2015. 'MEF2 transcription factors regulate distinct gene programs in mammalian skeletal muscle differentiation', *J Biol Chem*, 290: 1256-68.
- Fang, P., I. D. Schwartz, B. D. Johnson, M. A. Derr, C. T. Roberts, Jr., V. Hwa, and R. G. Rosenfeld. 2009. 'Familial short stature caused by haploinsufficiency of the insulin-like growth factor I receptor due to nonsense-mediated messenger ribonucleic acid decay', *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 1740-7.
- Federici, M., O. Porzio, L. Zucaro, A. Fusco, P. Borboni, D. Lauro, and G. Sesti. 1997. 'Distribution of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors in human tissues', *Mol Cell Endocrinol*, 129: 121-6.
- Feng, Y., D. He, Z. Yao, and D. J. Klionsky. 2014. 'The machinery of macroautophagy', *Cell Res*, 24: 24-41.
- Firth, S. M., and R. C. Baxter. 2002. 'Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins', *Endocr Rev*, 23: 824-54.
- Firth, S. M., D. R. Clemmons, and R. C. Baxter. 2001. 'Mutagenesis of basic amino acids in the carboxyl-terminal region of insulin-like growth factor binding protein-5 affects acid-labile subunit binding', *Endocrinology*, 142: 2147.
- Flavell, S. W., C. W. Cowan, T. K. Kim, P. L. Greer, Y. Lin, S. Paradis, E. C. Griffith, L. S. Hu, C. Chen, and M. E. Greenberg. 2006. 'Activity-dependent regulation of MEF2 transcription factors suppresses excitatory synapse number', *Science*, 311: 1008-12.
- Fleming, J. C., M. P. Steinkamp, R. Kawatsuji, E. Tartaglini, J. L. Pinkus, G. S. Pinkus, M. D. Fleming, and E. J. Neufeld. 2001. 'Characterization of a murine high-affinity thiamine transporter, Slc19a2', *Mol Genet Metab*, 74: 273-80.
- Forge, A., and T. Wright. 2002. 'The molecular architecture of the inner ear', *Br Med Bull*, 63: 5-24.
- Foulstone, E., S. Prince, O. Zaccaro, J. L. Burns, J. Harper, C. Jacobs, D. Church, and A. B. Hassan. 2005. 'Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer', *J Pathol*, 205: 145-53.
- Frasca, F., G. Pandini, P. Scalia, L. Sciacca, R. Mineo, A. Costantino, I. D. Goldfine, A. Belfiore, and R. Vigneri. 1999. 'Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells', *Mol Cell Biol*, 19: 3278-88.
- Frisina, R. D. 2009. 'Age-related hearing loss: ear and brain mechanisms', *Ann N Y Acad Sci*, 1170: 708-17.

- Frisina, S. T., F. Mapes, S. Kim, D. R. Frisina, and R. D. Frisina. 2006. 'Characterization of hearing loss in aged type II diabetics', *Hear Res*, 211: 103-13.
- Fritzsich, B., K. W. Beisel, and L. A. Hansen. 2006. 'The molecular basis of neurosensory cell formation in ear development: a blueprint for hair cell and sensory neuron regeneration?', *Bioessays*, 28: 1181-93.
- Fritzsich, B., S. Pauley, and K. W. Beisel. 2006. 'Cells, molecules and morphogenesis: the making of the vertebrate ear', *Brain Res*, 1091: 151-71.
- Fritzsich, B., L. Tessarollo, E. Coppola, and L. F. Reichardt. 2004. 'Neurotrophins in the ear: their roles in sensory neuron survival and fiber guidance', *Prog Brain Res*, 146: 265-78.
- Fukushima, H., S. Cureoglu, P. A. Schachern, M. M. Paparella, T. Harada, and M. F. Oktay. 2006. 'Effects of type 2 diabetes mellitus on cochlear structure in humans', *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 132: 934-8.
- Fuqua, J. S., M. Derr, R. G. Rosenfeld, and V. Hwa. 2012. 'Identification of a novel heterozygous IGF1 splicing mutation in a large kindred with familial short stature', *Horm Res Paediatr*, 78: 59-66.
- Gannage-Yared, M. H., J. Klammt, E. Chouery, S. Corbani, H. Megarbane, J. Abou Ghoch, N. Choucair, R. Pfaffle, and A. Megarbane. 2013. 'Homozygous mutation of the IGF1 receptor gene in a patient with severe pre- and postnatal growth failure and congenital malformations', *Eur J Endocrinol*, 168: K1-7.
- Ghosh, P., N. M. Dahms, and S. Kornfeld. 2003. 'Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 202-12.
- Goedken, M., S. McCormick, K. G. Leidal, K. Suzuki, Y. Kameoka, J. M. Astern, M. Huang, A. Cherkasov, and W. M. Nauseef. 2007. 'Impact of two novel mutations on the structure and function of human myeloperoxidase', *J Biol Chem*, 282: 27994-8003.
- Gomez, J. M. 2007. 'Serum leptin, insulin-like growth factor-I components and sex-hormone binding globulin. Relationship with sex, age and body composition in healthy population', *Protein Pept Lett*, 14: 708-11.
- Gong, Tzy-Wen L, I. Jill Karolyi, James MacDonald, Lisa Beyer, Yehoash Raphael, David C. Kohrman, Sally A. Camper, and Margaret I. Lomax. 2006. 'Age-Related Changes in Cochlear Gene Expression In Normal and Shaker 2 Mice', *JARO*, 7: 317-28.
- Gordy, C., and Y. W. He. 2012. 'The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead?', *Protein Cell*, 3: 17-27.
- Goto, Y., M. Nomura, K. Tanaka, A. Kondo, H. Morinaga, T. Okabe, T. Yanase, H. Nawata, R. Takayanagi, and E. Li. 2007. 'Genetic interactions between activin type IIB receptor and Smad2 genes in asymmetrical patterning of the thoracic organs and the development of pancreas islets', *Dev Dyn*, 236: 2865-74.
- Groigno, L., L. Richard-Parpaillon, and D. Boujard. 1999. 'Expression pattern of insulin receptor mRNA during *Xenopus laevis* embryogenesis', *Mech Dev*, 86: 151-4.
- Gronborg, M., B. S. Wulff, J. S. Rasmussen, T. Kjeldsen, and S. Gammeltoft. 1993. 'Structure-function relationship of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase', *J Biol Chem*, 268: 23435-40.
- Guillemot, F., and A. L. Joyner. 1993. 'Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system', *Mech Dev*, 42: 171-85.
- Guinan, J. J., Jr. 2006. 'Olivocochlear efferents: anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans', *Ear Hear*, 27: 589-607.
- Gunewardene, N., M. Dottori, and B. A. Nayagam. 2012. 'The convergence of cochlear implantation with induced pluripotent stem cell therapy', *Stem Cell Rev*, 8: 741-54.
- Haluzik, M., S. Yakar, O. Gavrilova, J. Setser, Y. Boisclair, and D. LeRoith. 2003. 'Insulin resistance in the liver-specific IGF-1 gene-deleted mouse is abrogated by deletion of the acid-labile subunit of the IGF-binding protein-3 complex: relative roles of growth hormone and IGF-1 in insulin resistance', *Diabetes*, 52: 2483-9.
- Harding, S. D., C. Armit, J. Armstrong, J. Brennan, Y. Cheng, B. Haggarty, D. Houghton, S. Lloyd-MacGilp, X. Pi, Y. Roochun, M. Sharghi, C. Tindal, A. P. McMahon, B. Gottesman, M. H. Little, K. Georgas, B. J. Aronow, S. S. Potter, E. W. Brunskill, E. M.

- Southard-Smith, C. Mendelsohn, R. A. Baldock, J. A. Davies, and D. Davidson. 2011. 'The GUDMAP database--an online resource for genitourinary research', *Development*, 138: 2845-53.
- Hardisty-Hughes, R. E., A. Parker, and S. D. Brown. 2010. 'A hearing and vestibular phenotyping pipeline to identify mouse mutants with hearing impairment', *Nat Protoc*, 5: 177-90.
- Hawkes, C., and S. Kar. 2004. 'The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system', *Brain Res Brain Res Rev*, 44: 117-40.
- Hayashi, T., D. Cunningham, and O. Bermingham-McDonogh. 2007. 'Loss of Fgfr3 leads to excess hair cell development in the mouse organ of Corti', *Dev Dyn*, 236: 525-33.
- Heidenreich, K. A., and D. A. Linseman. 2004. 'Myocyte enhancer factor-2 transcription factors in neuronal differentiation and survival', *Mol Neurobiol*, 29: 155-66.
- Hellstrom, A., B. Carlsson, A. Niklasson, K. Segnestam, M. Boguszewski, L. de Lacerda, M. Savage, E. Svensson, L. Smith, D. Weinberger, K. Albertsson Wikland, and Z. Laron. 2002. 'IGF-I is critical for normal vascularization of the human retina', *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 3413-6.
- Hemond, S. G., and D. K. Morest. 1991. 'Ganglion formation from the otic placode and the otic crest in the chick embryo: mitosis, migration, and the basal lamina', *Anat Embryol (Berl)*, 184: 1-13.
- Henderson, D., E. C. Bielefeld, K. C. Harris, and B. H. Hu. 2006. 'The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss', *Ear Hear*, 27: 1-19.
- Herrera, P. L., J. Huarte, F. Sanvito, P. Meda, L. Orci, and J. D. Vassalli. 1991. 'Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene', *Development*, 113: 1257-65.
- Hoffman, B. G., B. Zavaglia, J. Witzsche, T. Ruiz de Algora, M. Beach, P. A. Hoodless, S. J. Jones, M. A. Marra, and C. D. Helgason. 2008. 'Identification of transcripts with enriched expression in the developing and adult pancreas', *Genome Biol*, 9: R99.
- Holstein, Gay R. 2012. 'The vestibular system.' in Jürgen K. Mai and George Paxinos (eds.), *The human nervous system* (Elsevier Academic Press: Amsterdam ; Boston).
- Holley, S. J., S. B. Hall, and P. L. Mellon. 2002. 'Complementary expression of IGF-II and IGFBP-5 during anterior pituitary development', *Dev Biol*, 244: 319-28.
- Hooper, A. T., S. V. Shmelkov, S. Gupta, T. Milde, K. Bambino, K. Gillen, M. Goetz, S. Chavala, M. Baljevic, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, N. W. Gale, G. Thurston, G. D. Yancopoulos, L. Vahdat, T. Evans, and S. Rafii. 2009. 'Angiomodulin is a specific marker of vasculature and regulates vascular endothelial growth factor-A-dependent neoangiogenesis', *Circ Res*, 105: 201-8.
- Hua, Q. X., M. Liu, S. Q. Hu, W. Jia, P. Arvan, and M. A. Weiss. 2006. 'A conserved histidine in insulin is required for the foldability of human proinsulin: structure and function of an ALAB5 analog', *J Biol Chem*, 281: 24889-99.
- Hurtado-Chong, A., M. J. Yusta-Boyo, E. Vergano-Vera, A. Bulfone, F. de Pablo, and C. Vicario-Abejon. 2009. 'IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone', *Eur J Neurosci*, 30: 742-55.
- Iino, Y., K. Kakizaki, H. Katano, H. Saigusa, and S. Kanegasaki. 2005. 'Eosinophil chemoattractants in the middle ear of patients with eosinophilic otitis media', *Clin Exp Allergy*, 35: 1370-6.
- Inagaki, K., A. Tiulpakov, P. Rubtsov, P. Sverdlova, V. Peterkova, S. Yakar, S. Terekhov, and D. LeRoith. 2007. 'A familial insulin-like growth factor-I receptor mutant leads to short stature: clinical and biochemical characterization', *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 1542-8.
- Inanlou, M. R., and B. Kablar. 2005. 'Abnormal development of the intercostal muscles and the rib cage in Myf5^{-/-} embryos leads to pulmonary hypoplasia', *Dev Dyn*, 232: 43-54.
- Innes, A. M., and D. A. Dymant. 1993. Last update 2015. 'SHORT Syndrome.' in R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L. J. H. Bean, T. D. Bird, C.

- T. Fong, H. C. Mefford, R. J. H. Smith and K. Stephens (eds.), *GeneReviews(R)* (Seattle (WA)).
- Irizarry, R. A., B. M. Bolstad, F. Collin, L. M. Cope, B. Hobbs, and T. P. Speed. 2003. 'Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data', *Nucleic Acids Res*, 31: e15.
- Iwai, K., T. Nakagawa, T. Endo, Y. Matsuoka, T. Kita, T. S. Kim, Y. Tabata, and J. Ito. 2006. 'Cochlear protection by local insulin-like growth factor-1 application using biodegradable hydrogel', *Laryngoscope*, 116: 529-33.
- Jacques, B. E., M. E. Montcouquiol, E. M. Layman, M. Lewandoski, and M. W. Kelley. 2007. 'Fgf8 induces pillar cell fate and regulates cellular patterning in the mammalian cochlea', *Development*, 134: 3021-9.
- Jensen, P., S. Magdaleno, K. M. Lehman, D. S. Rice, E. R. Lavallie, L. Collins-Racie, J. M. McCoy, and T. Curran. 2004. 'A neurogenomics approach to gene expression analysis in the developing brain', *Brain Res Mol Brain Res*, 132: 116-27.
- Joglekar, M. V., V. S. Parekh, S. Mehta, R. R. Bhonde, and A. A. Hardikar. 2007. 'MicroRNA profiling of developing and regenerating pancreas reveal post-transcriptional regulation of neurogenin3', *Dev Biol*, 311: 603-12.
- Kanzaki, M. 2006. 'Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics', *Endocr J*, 53: 267-93.
- Karsten, S. L., L. C. Kudo, R. Jackson, C. Sabatti, H. I. Kornblum, and D. H. Geschwind. 2003. 'Global analysis of gene expression in neural progenitors reveals specific cell-cycle, signaling, and metabolic networks', *Dev Biol*, 261: 165-82.
- Kawaguchi, A., T. Ikawa, T. Kasukawa, H. R. Ueda, K. Kurimoto, M. Saitou, and F. Matsuzaki. 2008. 'Single-cell gene profiling defines differential progenitor subclasses in mammalian neurogenesis', *Development*, 135: 3113-24.
- Kawahira, H., N. H. Ma, E. S. Tzanakakis, A. P. McMahon, P. T. Chuang, and M. Hebrok. 2003. 'Combined activities of hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development', *Development*, 130: 4871-9.
- Kawashima, Y., S. Kanzaki, F. Yang, T. Kinoshita, K. Hanaki, J. Nagaiishi, Y. Ohtsuka, I. Hisatome, H. Ninomoya, E. Nanba, T. Fukushima, and S. Takahashi. 2005. 'Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short-stature child born with intrauterine growth retardation', *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 4679-87.
- Kedees, M. H., Y. Guz, P. M. Vuguin, C. Vargas, L. Cui, D. F. Steiner, M. J. Charron, and G. Teitelman. 2007. 'Nestin expression in pancreatic endocrine and exocrine cells of mice lacking glucagon signaling', *Dev Dyn*, 236: 1126-33.
- Kelly, M. C., and P. Chen. 2009. 'Development of form and function in the mammalian cochlea', *Curr Opin Neurobiol*, 19: 395-401.
- Kitajiri, S. I., M. Furuse, K. Morita, Y. Saishin-Kiuchi, H. Kido, J. Ito, and S. Tsukita. 2004. 'Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear', *Hear Res*, 187: 25-34.
- Klionsky, D. J. 2005. 'The molecular machinery of autophagy: unanswered questions', *J Cell Sci*, 118: 7-18.
- Kloting, N., L. Koch, T. Wunderlich, M. Kern, K. Ruschke, W. Krone, J. C. Bruning, and M. Bluher. 2008. 'Autocrine IGF-1 action in adipocytes controls systemic IGF-1 concentrations and growth', *Diabetes*, 57: 2074-82.
- Knipper, M., C. Bandtlow, L. Gestwa, I. Kopschall, K. Rohbock, B. Wiechers, H. P. Zenner, and U. Zimmermann. 1998. 'Thyroid hormone affects Schwann cell and oligodendrocyte gene expression at the glial transition zone of the VIIIth nerve prior to cochlea function', *Development*, 125: 3709-18.
- Koffler, T., K. Ushakov, and K. B. Avraham. 2015. 'Genetics of Hearing Loss: Syndromic', *Otolaryngol Clin North Am*.
- König, Horst Erich, Hans-Georg Liebich, and H. Bragulla. 2007. 'Vestibulocochlear organ.' in, *Veterinary anatomy of domestic mammals : textbook and colour atlas* (Schattauer: Stuttgart ; New York).
- Korver, W., J. Roose, and H. Clevers. 1997. 'The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells', *Nucleic Acids Res*, 25: 1715-9.

- Koyama, M., S. S. Spicer, and B. A. Schulte. 1999. 'Immunohistochemical localization of Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase IV in outer hair cells', *J Histochem Cytochem*, 47: 7-12.
- Kraft, C., M. Peter, and K. Hofmann. 2010. 'Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond', *Nat Cell Biol*, 12: 836-41.
- Krapp, A., M. Knofler, S. Frutiger, G. J. Hughes, O. Hagenbuchle, and P. K. Wellauer. 1996. 'The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein', *Embo J*, 15: 4317-29.
- Kruis, T., J. Klammt, A. Galli-Tsinopoulou, T. Wallborn, M. Schlicke, E. Muller, J. Kratzsch, A. Korner, R. Odeh, W. Kiess, and R. Pfaffle. 2010. 'Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation', *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 1137-42.
- Kuhn, S., N. Ingham, S. Pearson, S. M. Gribble, S. Clayton, K. P. Steel, and W. Marcotti. 2012. 'Auditory function in the Tc1 mouse model of down syndrome suggests a limited region of human chromosome 21 involved in otitis media', *PLoS One*, 7: e31433.
- Kumar, S., J. Boehm, and J. C. Lee. 2003. 'p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases', *Nat Rev Drug Discov*, 2: 717-26.
- Kyosseva, S. V. 2004. 'Mitogen-activated protein kinase signaling', *Int Rev Neurobiol*, 59: 201-20.
- Kyriakis, J. M., and J. Avruch. 2001. 'Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation', *Physiol Rev*, 81: 807-69.
- Ladher, R. K., K. U. Anakwe, A. L. Gurney, G. C. Schoenwolf, and P. H. Francis-West. 2000. 'Identification of synergistic signals initiating inner ear development', *Science*, 290: 1965-7.
- Ladher, R. K., T. J. Wright, A. M. Moon, S. L. Mansour, and G. C. Schoenwolf. 2005. 'FGF8 initiates inner ear induction in chick and mouse', *Genes Dev*, 19: 603-13.
- Lammert, E., J. Brown, and D. A. Melton. 2000. 'Notch gene expression during pancreatic organogenesis', *Mech Dev*, 94: 199-203.
- Langer, P., S. Grunder, and A. Rusch. 2003. 'Expression of Ca²⁺-activated BK channel mRNA and its splice variants in the rat cochlea', *J Comp Neurol*, 455: 198-209.
- Laoukili, J., M. Stahl, and R. H. Medema. 2007. 'FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer', *Biochim Biophys Acta*, 1775: 92-102.
- Lee, J. E., J. Pintar, and A. Efstratiadis. 1990. 'Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis', *Development*, 110: 151-9.
- Lee, Y. S., F. Liu, and N. Segil. 2006. 'A morphogenetic wave of p27Kip1 transcription directs cell cycle exit during organ of Corti development', *Development*, 133: 2817-26.
- Lefloch, R., J. Pouyssegur, and P. Lenormand. 2009. 'Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation', *Cell Cycle*, 8: 705-11.
- Leibovici, M., S. Safieddine, and C. Petit. 2008. 'Mouse models for human hereditary deafness', *Curr Top Dev Biol*, 84: 385-429.
- Leifke, E., V. Gorennoi, C. Wichers, A. Von Zur Muhlen, E. Von Buren, and G. Brabant. 2000. 'Age-related changes of serum sex hormones, insulin-like growth factor-1 and sex-hormone binding globulin levels in men: cross-sectional data from a healthy male cohort', *Clin Endocrinol (Oxf)*, 53: 689-95.
- Lentz, J. J., W. C. Gordon, H. E. Farris, G. H. MacDonald, D. E. Cunningham, C. A. Robbins, B. L. Tempel, N. G. Bazan, E. W. Rubel, E. C. Oesterle, and B. J. Keats. 2010. 'Deafness and retinal degeneration in a novel USH1C knock-in mouse model', *Dev Neurobiol*, 70: 253-67.
- Leonova, E. V., D. A. Fairfield, M. I. Lomax, and R. A. Altschuler. 2002. 'Constitutive expression of Hsp27 in the rat cochlea', *Hear Res*, 163: 61-70.
- Lewis, M. A., and K. P. Steel. 2010. 'MicroRNAs in mouse development and disease', *Semin Cell Dev Biol*, 21: 774-80.
- Li, H., J. C. Radford, M. J. Ragusa, K. L. Shea, S. R. McKercher, J. D. Zaremba, W. Soussou, Z. Nie, Y. J. Kang, N. Nakanishi, S. Okamoto, A. J. Roberts, J. J. Schwarz, and S. A.

- Lipton. 2008. 'Transcription factor MEF2C influences neural stem/progenitor cell differentiation and maturation in vivo', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 9397-402.
- Liang, L., W. H. Guo, D. R. Esquiliano, M. Asai, S. Rodriguez, J. Giraud, J. A. Kushner, M. F. White, and M. F. Lopez. 2010. 'Insulin-like growth factor 2 and the insulin receptor, but not insulin, regulate fetal hepatic glycogen synthesis', *Endocrinology*, 151: 741-7.
- Lieberman, M. C., E. Tartaglino, J. C. Fleming, and E. J. Neufeld. 2006. 'Deletion of SLC19A2, the high affinity thiamine transporter, causes selective inner hair cell loss and an auditory neuropathy phenotype', *J Assoc Res Otolaryngol*, 7: 211-7.
- Lioubinski, O., M. Muller, M. Wegner, and M. Sander. 2003. 'Expression of Sox transcription factors in the developing mouse pancreas', *Dev Dyn*, 227: 402-8.
- Lipinski, R. J., C. H. Cook, D. H. Barnett, J. J. Gipp, R. E. Peterson, and W. Bushman. 2005. 'Sonic hedgehog signaling regulates the expression of insulin-like growth factor binding protein-6 during fetal prostate development', *Dev Dyn*, 233: 829-36.
- Liu, J. P., J. Baker, A. S. Perkins, E. J. Robertson, and A. Efstratiadis. 1993. 'Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type I IGF receptor (Igf1r)', *Cell*, 75: 59-72.
- Liu, Q., A. Saveliev, and E. A. Pierce. 2009. 'The severity of retinal degeneration in Rplh gene-targeted mice is dependent on genetic background', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50: 1566-74.
- Liu, X., M. Milo, N. D. Lawrence, and M. Rattray. 2005. 'A tractable probabilistic model for Affymetrix probe-level analysis across multiple chips', *Bioinformatics*, 21: 3637-44.
- . 2006. 'Probe-level measurement error improves accuracy in detecting differential gene expression', *Bioinformatics*, 22: 2107-13.
- Lopez-Garcia, C., A. J. Lopez-Contreras, A. Cremades, M. T. Castells, F. Marin, F. Schreiber, and R. Penafiel. 2008. 'Molecular and morphological changes in placenta and embryo development associated with the inhibition of polyamine synthesis during midpregnancy in mice', *Endocrinology*, 149: 5012-23.
- Lopez-Rios, J., M. E. Gallardo, S. Rodriguez de Cordoba, and P. Bovolenta. 1999. 'Six9 (Optx2), a new member of the six gene family of transcription factors, is expressed at early stages of vertebrate ocular and pituitary development', *Mech Dev*, 83: 155-9.
- Machold, R., C. Klein, and G. Fishell. 2011. 'Genes expressed in Atoh1 neuronal lineages arising from the r1/isthmus rhombic lip', *Gene Expr Patterns*, 11: 349-59.
- Magarinos, M., J. Contreras, M. R. Aburto, and I. Varela-Nieto. 2012. 'Early development of the vertebrate inner ear', *Anat Rec (Hoboken)*, 295: 1775-90.
- Magariños, M., J. Contreras, and I. Varela-Nieto. 2014. 'Early Development of the Vertebrate Inner Ear' in R. Romand and Isabel Varela-Nieto (eds.), *Development of auditory and vestibular systems* (Academic Press: Oxford, UK Waltham, MA.).
- Magdaleno, S., P. Jensen, C. L. Brumwell, A. Seal, K. Lehman, A. Asbury, T. Cheung, T. Cornelius, D. M. Batten, C. Eden, S. M. Norland, D. S. Rice, N. Dosooye, S. Shakya, P. Mehta, and T. Curran. 2006. 'BGEM: an in situ hybridization database of gene expression in the embryonic and adult mouse nervous system', *PLoS Biol*, 4: e86.
- Malmierca, M. S. 2003. 'The structure and physiology of the rat auditory system: an overview', *Int Rev Neurobiol*, 56: 147-211.
- Mannstrom, P., B. Ulfhake, M. Kirkegaard, and M. Ulfendahl. 2013. 'Dietary restriction reduces age-related degeneration of stria vascularis in the inner ear of the rat', *Exp Gerontol*, 48: 1173-9.
- Mansergh, F., N. C. Orton, J. P. Vessey, M. R. Lalonde, W. K. Stell, F. Tremblay, S. Barnes, D. E. Rancourt, and N. T. Bech-Hansen. 2005. 'Mutation of the calcium channel gene *Cacna1f* disrupts calcium signaling, synaptic transmission and cellular organization in mouse retina', *Hum Mol Genet*, 14: 3035-46.
- Maricich, S. M., A. Xia, E. L. Mathes, V. Y. Wang, J. S. Oghalai, B. Fritzschi, and H. Y. Zoghbi. 2009. 'Atoh1-lineal neurons are required for hearing and for the survival of neurons in the spiral ganglion and brainstem accessory auditory nuclei', *J Neurosci*, 29: 11123-33.

- Marino, G., A. F. Fernandez, S. Cabrera, Y. W. Lundberg, R. Cabanillas, F. Rodriguez, N. Salvador-Montoliu, J. A. Vega, A. Germana, A. Fueyo, J. M. Freije, and C. Lopez-Otin. 2010. 'Autophagy is essential for mouse sense of balance', *J Clin Invest*, 120: 2331-44.
- McFadden, S. L., K. K. Ohlemiller, D. Ding, M. Shero, and R. J. Salvi. 2001. 'The Influence of Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Deficiencies on Noise-Induced Hearing Loss in Mice', *Noise Health*, 3: 49-64.
- McFadden, S. L., J. M. Woo, N. Michalak, and D. Ding. 2005. 'Dietary vitamin C supplementation reduces noise-induced hearing loss in guinea pigs', *Hear Res*, 202: 200-8.
- McGrath, K. E., and J. Palis. 1997. 'Expression of homeobox genes, including an insulin promoting factor, in the murine yolk sac at the time of hematopoietic initiation', *Mol Reprod Dev*, 48: 145-53.
- McWhirter, J. R., M. Goulding, J. A. Weiner, J. Chun, and C. Murre. 1997. 'A novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A-Pbx1', *Development*, 124: 3221-32.
- Mizushima, N. 2007. 'Autophagy: process and function', *Genes Dev*, 21: 2861-73.
- Montessuit, C., N. Rosenblatt-Velin, I. Papageorgiou, L. Campos, C. Pellieux, T. Palma, and R. Lerch. 2004. 'Regulation of glucose transporter expression in cardiac myocytes: p38 MAPK is a strong inducer of GLUT4', *Cardiovasc Res*, 64: 94-104.
- Moreno-Barriuso, N., A. V. Lopez-Malpartida, F. de Pablo, and J. G. Pichel. 2006. 'Alterations in alveolar epithelium differentiation and vasculogenesis in lungs of LIF/IGF-I double deficient embryos', *Dev Dyn*, 235: 2040-50.
- Morgan, D. O., J. C. Edman, D. N. Standring, V. A. Fried, M. C. Smith, R. A. Roth, and W. J. Rutter. 1987. 'Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein', *Nature*, 329: 301-7.
- Munoz, J. P., A. Collao, M. Chiong, C. Maldonado, T. Adasme, L. Carrasco, P. Ocaranza, R. Bravo, L. Gonzalez, G. Diaz-Araya, C. Hidalgo, and S. Lavandero. 2009. 'The transcription factor MEF2C mediates cardiomyocyte hypertrophy induced by IGF-1 signaling', *Biochem Biophys Res Commun*, 388: 155-60.
- Murillo-Cuesta, S., G. Camarero, A. Gonzalez-Rodriguez, L. Rodríguez-de la Rosa, D. J. Burks, C. Avendano, A. M. Valverde, and I. Varela-Nieto. 2012. 'Insulin receptor substrate 2 (IRS2)-deficient mice show sensorineural hearing loss that is delayed by concomitant protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) loss of function', *Mol Med*, 18: 260-9.
- Murillo-Cuesta, S., L. Rodríguez-de la Rosa, R. Cediell, L. Lassaletta, and I. Varela-Nieto. 2011. 'The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing', *Front Mol Neurosci*, 4: 11.
- Nagata, K., K. Masumoto, T. Uesugi, S. Yamamoto, K. Yoshizaki, S. Fukumoto, K. Nonaka, and T. Taguchi. 2007. 'Effect of insulin-like-growth factor and its receptors regarding lung development in fetal mice', *Pediatr Surg Int*, 23: 953-9.
- Nakada, Y., T. L. Hunsaker, R. M. Henke, and J. E. Johnson. 2004. 'Distinct domains within Mash1 and Math1 are required for function in neuronal differentiation versus neuronal cell-type specification', *Development*, 131: 1319-30.
- Nakagawa, T., K. Kumakawa, S. Usami, N. Hato, K. Tabuchi, M. Takahashi, K. Fujiwara, A. Sasaki, S. Komune, T. Sakamoto, H. Hiraumi, N. Yamamoto, S. Tanaka, H. Tada, M. Yamamoto, A. Yonezawa, T. Ito-Ihara, T. Ikeda, A. Shimizu, Y. Tabata, and J. Ito. 2014. 'A randomized controlled clinical trial of topical insulin-like growth factor-1 therapy for sudden deafness refractory to systemic corticosteroid treatment', *BMC Med*, 12: 219.
- Nakagawa, T., E. Ogino-Nishimura, H. Hiraumi, T. Sakamoto, N. Yamamoto, and J. Ito. 2012. 'Audiometric outcomes of topical IGF1 treatment for sudden deafness refractory to systemic steroids', *Otol Neurotol*, 33: 941-6.
- Nakagawa, T., T. Sakamoto, H. Hiraumi, Y. S. Kikkawa, N. Yamamoto, K. Hamaguchi, K. Ono, M. Yamamoto, Y. Tabata, S. Teramukai, S. Tanaka, H. Tada, R. Onodera, A. Yonezawa, K. Inui, and J. Ito. 2010. 'Topical insulin-like growth factor 1 treatment

- using gelatin hydrogels for glucocorticoid-resistant sudden sensorineural hearing loss: a prospective clinical trial', *BMC Med*, 8: 76.
- Nammo, T., K. Yamagata, T. Tanaka, T. Kodama, F. M. Sladek, K. Fukui, F. Katsube, Y. Sato, J. Miyagawa, and I. Shimomura. 2008. 'Expression of HNF-4alpha (MODY1), HNF-1beta (MODY5), and HNF-1alpha (MODY3) proteins in the developing mouse pancreas', *Gene Expr Patterns*, 8: 96-106.
- Narasimhan, S. D., K. Yen, and H. A. Tissenbaum. 2009. 'Converging pathways in lifespan regulation', *Curr Biol*, 19: R657-66.
- Nayagam, B. A., M. A. Muniak, and D. K. Ryugo. 2011. 'The spiral ganglion: connecting the peripheral and central auditory systems', *Hear Res*, 278: 2-20.
- Netchine, I., S. Azzi, M. Houang, D. Seurin, L. Perin, J. M. Ricort, C. Daubas, C. Legay, J. Mester, R. Herich, F. Godeau, and Y. Le Bouc. 2009. 'Partial primary deficiency of insulin-like growth factor (IGF)-I activity associated with IGF1 mutation demonstrates its critical role in growth and brain development', *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 3913-21.
- Netchine, I., S. Azzi, Y. Le Bouc, and M. O. Savage. 2011. 'IGF1 molecular anomalies demonstrate its critical role in fetal, postnatal growth and brain development', *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25: 181-90.
- Ng, L., E. Cordas, X. Wu, K. R. Vella, A. N. Hollenberg, and D. Forrest. 2015. 'Age-Related Hearing Loss and Degeneration of Cochlear Hair Cells in Mice Lacking Thyroid Hormone Receptor beta1', *Endocrinology*, 156: 3853-65.
- Ngo-Muller, V., and K. Muneoka. 2000. 'Influence of FGF4 on digit morphogenesis during limb development in the mouse', *Dev Biol*, 219: 224-36.
- Nishimura, K., R. M. Weichert, W. Liu, R. L. Davis, and A. Dabdoub. 2014. 'Generation of induced neurons by direct reprogramming in the mammalian cochlea', *Neuroscience*, 275: 125-35.
- O'Dell, S. D., and I. N. Day. 1998. 'Insulin-like growth factor II (IGF-II)', *Int J Biochem Cell Biol*, 30: 767-71.
- Ogata, N., D. Chikazu, N. Kubota, Y. Terauchi, K. Tobe, Y. Azuma, T. Ohta, T. Kadowaki, K. Nakamura, and H. Kawaguchi. 2000. 'Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover', *J Clin Invest*, 105: 935-43.
- Ohlemiller, K. K. 2008. 'Recent findings and emerging questions in cochlear noise injury', *Hear Res*, 245: 5-17.
- . 2009. 'Mechanisms and genes in human strial presbycusis from animal models', *Brain Res*, 1277: 70-83.
- Ohlemiller, K. K., and P. M. Gagnon. 2007. 'Genetic dependence of cochlear cells and structures injured by noise', *Hear Res*, 224: 34-50.
- Okano, T., and M. W. Kelley. 2013. 'Expression of insulin-like growth factor binding proteins during mouse cochlear development', *Dev Dyn*, 242: 1210-21.
- Okano, T., S. Xuan, and M. W. Kelley. 2011. 'Insulin-like growth factor signaling regulates the timing of sensory cell differentiation in the mouse cochlea', *J Neurosci*, 31: 18104-18.
- Pais, R. S., N. Moreno-Barriuso, I. Hernandez-Porrás, I. P. Lopez, J. De Las Rivas, and J. G. Pichel. 2013. 'Transcriptome analysis in prenatal IGF1-deficient mice identifies molecular pathways and target genes involved in distal lung differentiation', *PLoS One*, 8: e83028.
- Pandini, G., F. Frasca, R. Mineo, L. Sciacca, R. Vigneri, and A. Belfiore. 2002. 'Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved', *J Biol Chem*, 277: 39684-95.
- Park, E., J. D. Bell, and A. J. Baker. 2008. 'Traumatic brain injury: can the consequences be stopped?', *CMAJ*, 178: 1163-70.
- Park, J. Y., S. J. Jeong, H. D. Sa, J. Y. Lee, X. Liu, M. J. Cho, K. W. Lee, and J. H. Kim. 2015. 'Construction of a shuttle vector based on the small cryptic plasmid pJY33 from *Weissella cibaria* 33', *Plasmid*, 79: 30-6.

- Park, J. Y., Y. H. Park, D. H. Shin, and S. H. Oh. 2007. 'Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-mediated hair cell survival on the mouse utricle exposed to neomycin: the roles of IGFBP-4 and IGFBP-5', *Acta Otolaryngol Suppl*: 22-9.
- Park, Y. H. 2015. 'Stem Cell Therapy for Sensorineural Hearing Loss, Still Alive?', *J Audiol Otol*, 19: 63-7.
- Pauley, S., E. Lai, and B. Fritsch. 2006. 'Foxg1 is required for morphogenesis and histogenesis of the mammalian inner ear', *Dev Dyn*, 235: 2470-82.
- Petrovic, V., R. H. Costa, L. F. Lau, P. Raychaudhuri, and A. L. Tyner. 2008. 'FoxM1 regulates growth factor-induced expression of kinase-interacting stathmin (KIS) to promote cell cycle progression', *J Biol Chem*, 283: 453-60.
- Pollak, M. 2008. 'Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia', *Nat Rev Cancer*, 8: 915-28.
- Potthoff, M. J., and E. N. Olson. 2007. 'MEF2: a central regulator of diverse developmental programs', *Development*, 134: 4131-40.
- Powell-Braxton, L., P. Hollingshead, C. Warburton, M. Dowd, S. Pitts-Meek, D. Dalton, N. Gillett, and T. A. Stewart. 1993. 'IGF-I is required for normal embryonic growth in mice', *Genes Dev*, 7: 2609-17.
- Prada, P. O., P. G. Quaresma, A. M. Caricilli, A. C. Santos, D. Guadagnini, J. Morari, L. Weissmann, E. R. Ropelle, J. B. Carvalheira, L. A. Velloso, and M. J. Saad. 2013. 'Tub has a key role in insulin and leptin signaling and action in vivo in hypothalamic nuclei', *Diabetes*, 62: 137-48.
- Prasadan, K., M. Koizumi, S. Tulachan, C. Shiota, N. Lath, J. Paredes, P. Guo, Y. El-Gohary, M. Malek, S. Shah, and G. K. Gittes. 2011. 'The expression and function of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in the embryonic mouse pancreas', *Diabetes*, 60: 548-54.
- Previati, M., I. Lanzoni, E. Corbacella, S. Magosso, S. Giuffre, F. Francioso, D. Arcelli, S. Volinia, A. Barbieri, S. Hatzopoulos, S. Capitani, and A. Martini. 2004. 'RNA expression induced by cisplatin in an organ of Corti-derived immortalized cell line', *Hear Res*, 196: 8-18.
- Puligilla, C., F. Feng, K. Ishikawa, S. Bertuzzi, A. Dabdoub, A. J. Griffith, B. Fritsch, and M. W. Kelley. 2007. 'Disruption of fibroblast growth factor receptor 3 signaling results in defects in cellular differentiation, neuronal patterning, and hearing impairment', *Dev Dyn*, 236: 1905-17.
- Pulkkinen, M. A., B. Spencer-Dene, C. Dickson, and T. Otonkoski. 2003. 'The IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 is required for proper growth and branching of pancreatic ductal epithelium but not for differentiation of exocrine or endocrine cells', *Mech Dev*, 120: 167-75.
- Puscheck, E. E., E. Pergament, Y. Patel, J. Dreschler, and D. A. Rappolee. 1998. 'Insulin receptor substrate-1 is expressed at high levels in all cells of the peri-implantation mouse embryo', *Mol Reprod Dev*, 49: 386-93.
- Raile, K., J. Klammt, A. Schneider, A. Keller, S. Laue, R. Smith, R. Pfaffle, J. Kratzsch, E. Keller, and W. Kiess. 2006. 'Clinical and functional characteristics of the human Arg59Ter insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) mutation: implications for a gene dosage effect of the human IGF1R', *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 2264-71.
- Rajapaksha, H., C. Alvino, P. McCarthy, and B. E. Forbes. 2012. 'The insulin-like growth factor mutation database (IGFmdb)', *Growth Horm IGF Res*, 22: 158-66.
- Ramekers, D., H. Versnel, W. Grolman, and S. F. Klis. 2012. 'Neurotrophins and their role in the cochlea', *Hear Res*, 288: 19-33.
- Rappolee, D. A., K. S. Sturm, O. Behrendtsen, G. A. Schultz, R. A. Pedersen, and Z. Werb. 1992. 'Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos', *Genes Dev*, 6: 939-52.
- Rashid, A. J., C. J. Cole, and S. A. Josselyn. 2014. 'Emerging roles for MEF2 transcription factors in memory', *Genes Brain Behav*, 13: 118-25.

- Reinhard, J., A. Horvat-Brocker, S. Illes, A. Zaremba, P. Knyazev, A. Ullrich, and A. Faissner. 2009. 'Protein tyrosine phosphatases expression during development of mouse superior colliculus', *Exp Brain Res*, 199: 279-97.
- Renna, M., C. F. Bento, A. Fleming, F. M. Menzies, F. H. Siddiqi, B. Ravikumar, C. Puri, M. Garcia-Arencibia, O. Sadiq, S. Corrochano, S. Carter, S. D. Brown, A. Acevedo-Arozena, and D. C. Rubinsztein. 2013. 'IGF-1 receptor antagonism inhibits autophagy', *Hum Mol Genet*, 22: 4528-44.
- Riva, C., E. Donadieu, J. Magnan, and J. P. Lavieille. 2007. 'Age-related hearing loss in CD/1 mice is associated to ROS formation and HIF target proteins up-regulation in the cochlea', *Exp Gerontol*, 42: 327-36.
- Rivolta, M. N. 2010. 'Stem cells and cell lines from the human auditory organ: applications, hurdles and bottlenecks in the development of regenerative therapies for deafness', *Drug Discov Today*, 15: 283-6.
- Roback, E. W., A. J. Barakat, V. G. Dev, M. Mbikay, M. Chretien, and M. G. Butler. 1991. 'An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1---qter) and loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene', *Am J Med Genet*, 38: 74-9.
- Rodriguez-de la Rosa, L., L. Fernandez-Sanchez, F. Germain, S. Murillo-Cuesta, I. Varela-Nieto, P. de la Villa, and N. Cuenca. 2012. 'Age-related functional and structural retinal modifications in the Igf1-/- null mouse', *Neurobiol Dis*, 46: 476-85.
- Roth, T. N. 2015. 'Aging of the auditory system', *Handb Clin Neurol*, 129: 357-73.
- Rowan, S., C. M. Chen, T. L. Young, D. E. Fisher, and C. L. Cepko. 2004. 'Transdifferentiation of the retina into pigmented cells in ocular retardation mice defines a new function of the homeodomain gene Chx10', *Development*, 131: 5139-52.
- Rubel, E. W., and B. Fritsch. 2002. 'Auditory system development: primary auditory neurons and their targets', *Annu Rev Neurosci*, 25: 51-101.
- Ruberte, J., E. Ayuso, M. Navarro, A. Carretero, V. Nacher, V. Haurigot, M. George, C. Llombart, A. Casellas, C. Costa, A. Bosch, and F. Bosch. 2004. 'Increased ocular levels of IGF-1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease', *J Clin Invest*, 113: 1149-57.
- Abu-Safieh, L., E. B. Abboud, H. Alkuraya, H. Shamseldin, S. Al-Enzi, L. Al-Abdi, M. Hashem, D. Colak, A. Jarallah, H. Ahmad, S. Bobis, G. Nemer, F. Bitar, and F. S. Alkuraya. 2011. 'Mutation of IGF1BP7 causes upregulation of BRAF/MEK/ERK pathway and familial retinal arterial macroaneurysms', *Am J Hum Genet*, 89: 313-9.
- Aburto, M. R., J. M. Hurle, I. Varela-Nieto, and M. Magarinos. 2012. 'Autophagy during vertebrate development', *Cells*, 1: 428-48.
- Aburto, M. R., M. Magarinos, Y. Leon, I. Varela-Nieto, and H. Sanchez-Calderon. 2012. 'AKT signaling mediates IGF-I survival actions on otic neural progenitors', *PLoS One*, 7: e30790.
- Aburto, M. R., H. Sanchez-Calderon, J. M. Hurle, I. Varela-Nieto, and M. Magarinos. 2012. 'Early otic development depends on autophagy for apoptotic cell clearance and neural differentiation', *Cell Death Dis*, 3: e394.
- Abuzzahab, M. J., A. Schneider, A. Goddard, F. Grigorescu, C. Lautier, E. Keller, W. Kiess, J. Klammt, J. Kratzsch, D. Osgood, R. Pfaffle, K. Raile, B. Seidel, R. J. Smith, S. D. Chernausek, and Group Intrauterine Growth Retardation Study. 2003. 'IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation', *N Engl J Med*, 349: 2211-22.
- Adams, T. E., V. C. Epa, T. P. Garrett, and C. W. Ward. 2000. 'Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor', *Cell Mol Life Sci*, 57: 1050-93.
- Adamson, C. L., M. A. Reid, Z. L. Mo, J. Bowne-English, and R. L. Davis. 2002. 'Firing features and potassium channel content of murine spiral ganglion neurons vary with cochlear location', *J Comp Neurol*, 447: 331-50.

- Adesanya, O. O., J. Zhou, C. Samathanam, L. Powell-Braxton, and C. A. Bondy. 1999. 'Insulin-like growth factor 1 is required for G2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 3287-91.
- Ahlgren, U., J. Jonsson, and H. Edlund. 1996. 'The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice', *Development*, 122: 1409-16.
- Andre, E., F. Conquet, M. Steinmayr, S. C. Stratton, V. Porciatti, and M. Becker-Andre. 1998. 'Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice', *Embo J*, 17: 3867-77.
- Annunziata, M., R. Granata, and E. Ghigo. 2011. 'The IGF system', *Acta Diabetol*, 48: 1-9.
- Araki, E., M. A. Lipes, M. E. Patti, J. C. Bruning, B. Haag, 3rd, R. S. Johnson, and C. R. Kahn. 1994. 'Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene', *Nature*, 372: 186-90.
- Arima, T., R. A. Drewell, K. L. Arney, J. Inoue, Y. Makita, A. Hata, M. Oshimura, N. Wake, and M. A. Surani. 2001. 'A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus', *Hum Mol Genet*, 10: 1475-83.
- Asayesh, A., T. Alanentalo, N. K. Khoo, and U. Ahlgren. 2005. 'Developmental expression of metalloproteases ADAM 9, 10, and 17 becomes restricted to divergent pancreatic compartments', *Dev Dyn*, 232: 1105-14.
- Attias, J., O. Zarchi, B. I. Nageris, and Z. Laron. 2012. 'Cochlear hearing loss in patients with Laron syndrome', *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 269: 461-6.
- Baguma-Nibasheka, M., and B. Kablar. 2008. 'Pulmonary hypoplasia in the connective tissue growth factor (Ctgf) null mouse', *Dev Dyn*, 237: 485-93.
- Bains, M., M. L. Florez-McClure, and K. A. Heidenreich. 2009. 'Insulin-like growth factor-I prevents the accumulation of autophagic vesicles and cell death in Purkinje neurons by increasing the rate of autophagosome-to-lysosome fusion and degradation', *J Biol Chem*, 284: 20398-407.
- Baker, J., J. P. Liu, E. J. Robertson, and A. Efstratiadis. 1993. 'Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth', *Cell*, 75: 73-82.
- Barrenas, M. L., A. Bratthall, and J. Ahlgren. 2005. 'The association between short stature and sensorineural hearing loss', *Hear Res*, 205: 123-30.
- Barrenas, M., K. Landin-Wilhelmsen, and C. Hanson. 2000. 'Ear and hearing in relation to genotype and growth in Turner syndrome', *Hear Res*, 144: 21-8.
- Baxter, R. C. 2000. 'Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278: E967-76.
- Belfiore, A. 2007. 'The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer', *Curr Pharm Des*, 13: 671-86.
- Ben Lagha, N., D. Seurin, Y. Le Bouc, M. Binoux, A. Berdal, P. Menuelle, and S. Babajko. 2006. 'Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-1) involvement in intrauterine growth retardation: study on IGFBP-1 overexpressing transgenic mice', *Endocrinology*, 147: 4730-7.
- Bergeron, A. L., A. Schrader, D. Yang, A. A. Osman, and D. D. Simmons. 2005. 'The final stage of cholinergic differentiation occurs below inner hair cells during development of the rodent cochlea', *J Assoc Res Otolaryngol*, 6: 401-15.
- Bhushan, A., N. Itoh, S. Kato, J. P. Thiery, P. Czernichow, S. Bellusci, and R. Scharfmann. 2001. 'Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis', *Development*, 128: 5109-17.
- Black, B. L., and E. N. Olson. 1998. 'Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14: 167-96.
- Blackshaw, S., S. Harpavat, J. Trimarchi, L. Cai, H. Huang, W. P. Kuo, G. Weber, K. Lee, R. E. Fraioli, S. H. Cho, R. Yung, E. Asch, L. Ohno-Machado, W. H. Wong, and C. L. Cepko. 2004. 'Genomic analysis of mouse retinal development', *PLoS Biol*, 2: E247.
- Boeda, B., A. El-Amraoui, A. Bahloul, R. Goodyear, L. Daviet, S. Blanchard, I. Perfettini, K. R. Fath, S. Shorte, J. Reiners, A. Houdusse, P. Legrain, U. Wolfrum, G. Richardson, and

- C. Petit. 2002. 'Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle', *Embo J*, 21: 6689-99.
- Boisclair, Y. R., R. P. Rhoads, I. Ueki, J. Wang, and G. T. Ooi. 2001. 'The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system', *J Endocrinol*, 170: 63-70.
- Bonapace, G., D. Concolino, S. Formicola, and P. Strisciuglio. 2003. 'A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency', *J Med Genet*, 40: 913-7.
- Bunn, R. C., and J. L. Fowlkes. 2003. 'Insulin-like growth factor binding protein proteolysis', *Trends Endocrinol Metab*, 14: 176-81.
- Butts, B. D., D. A. Linseman, S. S. Le, T. A. Laessig, and K. A. Heidenreich. 2003. 'Insulin-like growth factor-I suppresses degradation of the pro-survival transcription factor myocyte enhancer factor 2D (MEF2D) during neuronal apoptosis', *Horm Metab Res*, 35: 763-70.
- Calvaruso, G., R. Vento, M. Giuliano, M. Lauricella, E. Gerbino, and G. Tesoriere. 1996. 'Insulin-like growth factors in chick embryo retina during development', *Regul Pept*, 61: 19-25.
- Camarero, G., C. Avendano, C. Fernandez-Moreno, A. Villar, J. Contreras, F. de Pablo, J. G. Pichel, and I. Varela-Nieto. 2001. 'Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice', *J Neurosci*, 21: 7630-41.
- Camarero, G., Y. Leon, I. Gorospe, F. De Pablo, B. Alsina, F. Giraldez, and I. Varela-Nieto. 2003. 'Insulin-like growth factor 1 is required for survival of transit-amplifying neuroblasts and differentiation of otic neurons', *Dev Biol*, 262: 242-53.
- Camarero, G., M. A. Villar, J. Contreras, C. Fernandez-Moreno, J. G. Pichel, C. Avendano, and I. Varela-Nieto. 2002. 'Cochlear abnormalities in insulin-like growth factor-1 mouse mutants', *Hear Res*, 170: 2-11.
- Carmena, M., M. Wheelock, H. Funabiki, and W. C. Earnshaw. 2012. 'The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 789-803.
- Carroll, K., C. Gomez, and L. Shapiro. 2004. 'Tubby proteins: the plot thickens', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 55-63.
- Castro, D. S., D. Skowronska-Krawczyk, O. Armant, I. J. Donaldson, C. Parras, C. Hunt, J. A. Critchley, L. Nguyen, A. Gossler, B. Gottgens, J. M. Matter, and F. Guillemot. 2006. 'Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif', *Dev Cell*, 11: 831-44.
- Caton, J., P. Bringas, Jr., and M. Zeichner-David. 2005. 'IGFs increase enamel formation by inducing expression of enamel mineralizing specific genes', *Arch Oral Biol*, 50: 123-9.
- Cifuentes, Merchán. 1983. *El oído interno : ultraestructura, embriogénesis y algunos aspectos patológicos* (Universidad: Salamanca).
- Clemmons, D. R. 2001. 'Use of mutagenesis to probe IGF-binding protein structure/function relationships', *Endocr Rev*, 22: 800-17.
- Clemmons, D. R., M. Sleevi, G. Allan, and A. Sommer. 2007. 'Effects of combined recombinant insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 in type 2 diabetic patients on glycemic control and distribution of IGF-I and IGF-II among serum binding protein complexes', *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 2652-8.
- Collin, G. B., E. Cyr, R. Bronson, J. D. Marshall, E. J. Gifford, W. Hicks, S. A. Murray, Q. Y. Zheng, R. S. Smith, P. M. Nishina, and J. K. Naggert. 2005. 'Alms1-disrupted mice recapitulate human Alstrom syndrome', *Hum Mol Genet*, 14: 2323-33.
- Collin, R. W., E. Kalay, M. Tariq, T. Peters, B. van der Zwaag, H. Venselaar, J. Oostrik, K. Lee, Z. M. Ahmed, R. Caylan, Y. Li, H. A. Spierenburg, E. Eyupoglu, A. Heister, S. Riazuddin, E. Bahat, M. Ansar, S. Arslan, B. Wollnik, H. G. Brunner, C. W. Cremers, A. Karaguzel, W. Ahmad, F. P. Cremers, G. Vriend, T. B. Friedman, S. M. Leal, and H. Kremer. 2008. 'Mutations of ESRRB encoding estrogen-related receptor beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35', *Am J Hum Genet*, 82: 125-38.

- Combes, A. N., E. Lesieur, V. R. Harley, A. H. Sinclair, M. H. Little, D. Wilhelm, and P. Koopman. 2009. 'Three-dimensional visualization of testis cord morphogenesis, a novel tubulogenic mechanism in development', *Dev Dyn*, 238: 1033-41.
- Conover, C. A., L. K. Bale, M. T. Overgaard, E. W. Johnstone, U. H. Laursen, E. M. Fuchtbauer, C. Oxvig, and J. van Deursen. 2004. 'Metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein A is a critical growth regulatory factor during fetal development', *Development*, 131: 1187-94.
- Conte, I., J. Morcillo, and P. Bovolenta. 2005. 'Comparative analysis of Six 3 and Six 6 distribution in the developing and adult mouse brain', *Dev Dyn*, 234: 718-25.
- Coppens, A. G., R. Kiss, C. W. Heizmann, B. W. Schafer, and L. Poncelet. 2001. 'Immunolocalization of the calcium binding S100A1, S100A5 and S100A6 proteins in the dog cochlea during postnatal development', *Brain Res Dev Brain Res*, 126: 191-9.
- Couloigner, V., M. Teixeira, O. Sterkers, H. Rask-Andersen, and E. Ferrary. 2004. '[The endolymphatic sac: its roles in the inner ear]', *Med Sci (Paris)*, 20: 304-10.
- Courtland, H. W., S. Elis, Y. Wu, H. Sun, C. J. Rosen, K. J. Jepsen, and S. Yakar. 2011. 'Serum IGF-1 affects skeletal acquisition in a temporal and compartment-specific manner', *PLoS One*, 6: e14762.
- Coutinho, D. C., R. R. Coletta, E. M. Costa, P. R. Pachi, M. C. Boguszewski, D. Damiani, B. B. Mendonca, I. J. Arnhold, and A. A. Jorge. 2007. 'Polymorphisms identified in the upstream core polyadenylation signal of IGF1 gene exon 6 do not cause pre- and postnatal growth impairment', *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 4889-92.
- Coveney, D., A. J. Ross, J. D. Slone, and B. Capel. 2007. 'A microarray analysis of the XX Wnt4 mutant gonad targeted at the identification of genes involved in testis vascular differentiation', *Gene Expr Patterns*, 7: 82-92.
- Chang, W., P. ten Dijke, and D. K. Wu. 2002. 'BMP pathways are involved in otic capsule formation and epithelial-mesenchymal signaling in the developing chicken inner ear', *Dev Biol*, 251: 380-94.
- Chen, J., and J. Nathans. 2007. 'Estrogen-related receptor beta/NR3B2 controls epithelial cell fate and endolymph production by the stria vascularis', *Dev Cell*, 13: 325-37.
- Chen, P., J. E. Johnson, H. Y. Zoghbi, and N. Segil. 2002. 'The role of Math1 in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination', *Development*, 129: 2495-505.
- Chen, Y., and D. J. Klionsky. 2011. 'The regulation of autophagy - unanswered questions', *J Cell Sci*, 124: 161-70.
- Chiang, M. K., and J. G. Flanagan. 1996. 'PTP-NP, a new member of the receptor protein tyrosine phosphatase family, implicated in development of nervous system and pancreatic endocrine cells', *Development*, 122: 2239-50.
- Cho, Y., T. W. Gong, T. Stover, M. I. Lomax, and R. A. Altschuler. 2002. 'Gene expression profiles of the rat cochlea, cochlear nucleus, and inferior colliculus', *J Assoc Res Otolaryngol*, 3: 54-67.
- Choi, J. H., M. Kang, G. H. Kim, M. Hong, H. Y. Jin, B. H. Lee, J. Y. Park, S. M. Lee, E. J. Seo, and H. W. Yoo. 2011. 'Clinical and functional characteristics of a novel heterozygous mutation of the IGF1R gene and IGF1R haploinsufficiency due to terminal 15q26.2->qter deletion in patients with intrauterine growth retardation and postnatal catch-up growth failure', *J Clin Endocrinol Metab*, 96: E130-4.
- Chu, P. J., J. F. Rivera, and D. B. Arnold. 2006. 'A role for Kif17 in transport of Kv4.2', *J Biol Chem*, 281: 365-73.
- Danti, S., D. D'Alessandro, A. Pietrabissa, M. Petrini, and S. Berrettini. 2010. 'Development of tissue-engineered substitutes of the ear ossicles: PORP-shaped poly(propylene fumarate)-based scaffolds cultured with human mesenchymal stromal cells', *J Biomed Mater Res A*, 92: 1343-56.
- Davies, K., L. Bowden, P. Smith, W. Dean, D. Hill, H. Furuumi, H. Sasaki, B. Cattanach, and W. Reik. 2002. 'Disruption of mesodermal enhancers for Igf2 in the minute mutant', *Development*, 129: 1657-68.

- De Meyts, P., and J. Whittaker. 2002. 'Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design', *Nat Rev Drug Discov*, 1: 769-83.
- De Wolf, E., R. Gill, S. Geddes, J. Pitts, A. Wollmer, and J. Grotzinger. 1996. 'Solution structure of a mini IGF-1', *Protein Sci*, 5: 2193-202.
- Deltour, L., P. Leduque, N. Blume, O. Madsen, P. Dubois, J. Jami, and D. Bucchini. 1993. 'Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 527-31.
- DeMambro, V. E., M. Kawai, T. L. Clemens, K. Fulzele, J. A. Maynard, C. Marin de Evsikova, K. R. Johnson, E. Canalis, W. G. Beamer, C. J. Rosen, and L. R. Donahue. 2010. 'A novel spontaneous mutation of Irs1 in mice results in hyperinsulinemia, reduced growth, low bone mass and impaired adipogenesis', *J Endocrinol*, 204: 241-53.
- Denley, A., J. C. Wallace, L. J. Cosgrove, and B. E. Forbes. 2003. 'The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review', *Horm Metab Res*, 35: 778-85.
- Denley, A., C. C. Wang, K. A. McNeil, M. J. Walenkamp, H. van Duyvenvoorde, J. M. Wit, J. C. Wallace, R. S. Norton, M. Karperien, and B. E. Forbes. 2005. 'Structural and functional characteristics of the Val44Met insulin-like growth factor I missense mutation: correlation with effects on growth and development', *Mol Endocrinol*, 19: 711-21.
- Dichmann, D. S., H. Yassin, and P. Serup. 2006. 'Analysis of pancreatic endocrine development in GDF11-deficient mice', *Dev Dyn*, 235: 3016-25.
- Diez-Roux, G., S. Banfi, M. Sultan, L. Geffers, S. Anand, D. Rozado, A. Magen, E. Canidio, M. Pagani, I. Peluso, N. Lin-Marq, M. Koch, M. Bilio, I. Cantiello, R. Verde, C. De Masi, S. A. Bianchi, J. Cicchini, E. Perroud, S. Mehmeti, E. Dagand, S. Schrunner, A. Nurnberger, K. Schmidt, K. Metz, C. Zwingmann, N. Brieske, C. Springer, A. M. Hernandez, S. Herzog, F. Grabbe, C. Sieverding, B. Fischer, K. Schrader, M. Brockmeyer, S. Dettmer, C. Helbig, V. Alunni, M. A. Battaini, C. Mura, C. N. Henrichsen, R. Garcia-Lopez, D. Echevarria, E. Puelles, E. Garcia-Calero, S. Kruse, M. Uhr, C. Kauck, G. Feng, N. Milyaev, C. K. Ong, L. Kumar, M. Lam, C. A. Semple, A. Gyenesei, S. Mundlos, U. Radelof, H. Lehrach, P. Sarmientos, A. Reymond, D. R. Davidson, P. Dolle, S. E. Antonarakis, M. L. Yaspo, S. Martinez, R. A. Baldock, G. Eichele, and A. Ballabio. 2011. 'A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo', *PLoS Biol*, 9: e1000582.
- Dodou, E., D. B. Sparrow, T. Mohun, and R. Treisman. 1995. 'MEF2 proteins, including MEF2A, are expressed in both muscle and non-muscle cells', *Nucleic Acids Res*, 23: 4267-74.
- Domene, H. M., V. Hwa, H. G. Jasper, and R. G. Rosenfeld. 2011. 'Acid-labile subunit (ALS) deficiency', *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25: 101-13.
- Downward, J. 2003. 'Role of receptor tyrosine kinases in G-protein-coupled receptor regulation of Ras: transactivation or parallel pathways?', *Biochem J*, 376: e9-10.
- Easterday, M. C., J. D. Dougherty, R. L. Jackson, J. Ou, I. Nakano, A. A. Paucar, B. Roobini, M. Dianati, D. K. Irvin, I. L. Weissman, A. V. Terskikh, D. H. Geschwind, and H. I. Kornblum. 2003. 'Neural progenitor genes. Germinal zone expression and analysis of genetic overlap in stem cell populations', *Dev Biol*, 264: 309-22.
- Eckstein, F., T. Pavicic, S. Nedbal, C. Schmidt, U. Wehr, W. Rambeck, E. Wolf, and A. Hoeflich. 2002. 'Insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) overexpression negatively regulates bone size and mass, but not density, in the absence and presence of growth hormone/IGF-I excess in transgenic mice', *Anat Embryol (Berl)*, 206: 139-48.
- Ester, W. A., H. A. van Duyvenvoorde, C. C. de Wit, A. J. Broekman, C. A. Ruivenkamp, L. C. Govaerts, J. M. Wit, A. C. Hokken-Koelega, and M. Losekoot. 2009. 'Two short children born small for gestational age with insulin-like growth factor 1 receptor haploinsufficiency illustrate the heterogeneity of its phenotype', *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 4717-27.
- Estrella, N. L., C. A. Desjardins, S. E. Nocco, A. L. Clark, Y. Maksimenko, and F. J. Naya. 2015. 'MEF2 transcription factors regulate distinct gene programs in mammalian skeletal muscle differentiation', *J Biol Chem*, 290: 1256-68.

- Fang, P., I. D. Schwartz, B. D. Johnson, M. A. Derr, C. T. Roberts, Jr., V. Hwa, and R. G. Rosenfeld. 2009. 'Familial short stature caused by haploinsufficiency of the insulin-like growth factor I receptor due to nonsense-mediated messenger ribonucleic acid decay', *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 1740-7.
- Federici, M., O. Porzio, L. Zucaro, A. Fusco, P. Borboni, D. Lauro, and G. Sesti. 1997. 'Distribution of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors in human tissues', *Mol Cell Endocrinol*, 129: 121-6.
- Feng, Y., D. He, Z. Yao, and D. J. Klionsky. 2014. 'The machinery of macroautophagy', *Cell Res*, 24: 24-41.
- Firth, S. M., and R. C. Baxter. 2002. 'Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins', *Endocr Rev*, 23: 824-54.
- Firth, S. M., D. R. Clemmons, and R. C. Baxter. 2001. 'Mutagenesis of basic amino acids in the carboxyl-terminal region of insulin-like growth factor binding protein-5 affects acid-labile subunit binding', *Endocrinology*, 142: 2147.
- Flavell, S. W., C. W. Cowan, T. K. Kim, P. L. Greer, Y. Lin, S. Paradis, E. C. Griffith, L. S. Hu, C. Chen, and M. E. Greenberg. 2006. 'Activity-dependent regulation of MEF2 transcription factors suppresses excitatory synapse number', *Science*, 311: 1008-12.
- Fleming, J. C., M. P. Steinkamp, R. Kawatsuji, E. Tartaglino, J. L. Pinkus, G. S. Pinkus, M. D. Fleming, and E. J. Neufeld. 2001. 'Characterization of a murine high-affinity thiamine transporter, Slc19a2', *Mol Genet Metab*, 74: 273-80.
- Forge, A., and T. Wright. 2002. 'The molecular architecture of the inner ear', *Br Med Bull*, 63: 5-24.
- Foulstone, E., S. Prince, O. Zaccaro, J. L. Burns, J. Harper, C. Jacobs, D. Church, and A. B. Hassan. 2005. 'Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer', *J Pathol*, 205: 145-53.
- Frasca, F., G. Pandini, P. Scalia, L. Sciacca, R. Mineo, A. Costantino, I. D. Goldfine, A. Belfiore, and R. Vigneri. 1999. 'Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells', *Mol Cell Biol*, 19: 3278-88.
- Frisina, R. D. 2009. 'Age-related hearing loss: ear and brain mechanisms', *Ann N Y Acad Sci*, 1170: 708-17.
- Frisina, S. T., F. Mapes, S. Kim, D. R. Frisina, and R. D. Frisina. 2006. 'Characterization of hearing loss in aged type II diabetics', *Hear Res*, 211: 103-13.
- Fritsch, B., K. W. Beisel, and L. A. Hansen. 2006. 'The molecular basis of neurosensory cell formation in ear development: a blueprint for hair cell and sensory neuron regeneration?', *Bioessays*, 28: 1181-93.
- Fritsch, B., S. Pauley, and K. W. Beisel. 2006. 'Cells, molecules and morphogenesis: the making of the vertebrate ear', *Brain Res*, 1091: 151-71.
- Fritsch, B., L. Tessarollo, E. Coppola, and L. F. Reichardt. 2004. 'Neurotrophins in the ear: their roles in sensory neuron survival and fiber guidance', *Prog Brain Res*, 146: 265-78.
- Fukushima, H., S. Cureoglu, P. A. Schachern, M. M. Paparella, T. Harada, and M. F. Oktay. 2006. 'Effects of type 2 diabetes mellitus on cochlear structure in humans', *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 132: 934-8.
- Fuqua, J. S., M. Derr, R. G. Rosenfeld, and V. Hwa. 2012. 'Identification of a novel heterozygous IGF1 splicing mutation in a large kindred with familial short stature', *Horm Res Paediatr*, 78: 59-66.
- Gannage-Yared, M. H., J. Klammt, E. Chouery, S. Corbani, H. Megarbane, J. Abou Ghoch, N. Choucair, R. Pfaffle, and A. Megarbane. 2013. 'Homozygous mutation of the IGF1 receptor gene in a patient with severe pre- and postnatal growth failure and congenital malformations', *Eur J Endocrinol*, 168: K1-7.
- Ghosh, P., N. M. Dahms, and S. Kornfeld. 2003. 'Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 202-12.
- Goedken, M., S. McCormick, K. G. Leidal, K. Suzuki, Y. Kameoka, J. M. Astern, M. Huang, A. Cherkasov, and W. M. Nauseef. 2007. 'Impact of two novel mutations on the structure and function of human myeloperoxidase', *J Biol Chem*, 282: 27994-8003.

- Gomez, J. M. 2007. 'Serum leptin, insulin-like growth factor-I components and sex-hormone binding globulin. Relationship with sex, age and body composition in healthy population', *Protein Pept Lett*, 14: 708-11.
- Gong, Tzy-Wen L, I. Jill Karolyi, James MacDonald, Lisa Beyer, Yehoash Raphael, David C. Kohrman, Sally A. Camper, and Margaret I. Lomax. 2006. 'Age-Related Changes in Cochlear Gene Expression In Normal and Shaker 2 Mice', *JARO*, 7: 317-28.
- Gordy, C., and Y. W. He. 2012. 'The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead?', *Protein Cell*, 3: 17-27.
- Goto, Y., M. Nomura, K. Tanaka, A. Kondo, H. Morinaga, T. Okabe, T. Yanase, H. Nawata, R. Takayanagi, and E. Li. 2007. 'Genetic interactions between activin type IIB receptor and Smad2 genes in asymmetrical patterning of the thoracic organs and the development of pancreas islets', *Dev Dyn*, 236: 2865-74.
- Groigno, L., L. Richard-Parpaillon, and D. Boujard. 1999. 'Expression pattern of insulin receptor mRNA during *Xenopus laevis* embryogenesis', *Mech Dev*, 86: 151-4.
- Gronborg, M., B. S. Wulff, J. S. Rasmussen, T. Kjeldsen, and S. Gammeltoft. 1993. 'Structure-function relationship of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase', *J Biol Chem*, 268: 23435-40.
- Guillemot, F., and A. L. Joyner. 1993. 'Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system', *Mech Dev*, 42: 171-85.
- Guinan, J. J., Jr. 2006. 'Olivocochlear efferents: anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans', *Ear Hear*, 27: 589-607.
- Gunewardene, N., M. Dottori, and B. A. Nayagam. 2012. 'The convergence of cochlear implantation with induced pluripotent stem cell therapy', *Stem Cell Rev*, 8: 741-54.
- Haluzik, M., S. Yakar, O. Gavrilova, J. Setser, Y. Boisclair, and D. LeRoith. 2003. 'Insulin resistance in the liver-specific IGF-1 gene-deleted mouse is abrogated by deletion of the acid-labile subunit of the IGF-binding protein-3 complex: relative roles of growth hormone and IGF-1 in insulin resistance', *Diabetes*, 52: 2483-9.
- Harding, S. D., C. Armit, J. Armstrong, J. Brennan, Y. Cheng, B. Haggarty, D. Houghton, S. Lloyd-MacGilp, X. Pi, Y. Roochun, M. Sharghi, C. Tindal, A. P. McMahon, B. Gottesman, M. H. Little, K. Georgas, B. J. Aronow, S. S. Potter, E. W. Brunskill, E. M. Southard-Smith, C. Mendelsohn, R. A. Baldock, J. A. Davies, and D. Davidson. 2011. 'The GUDMAP database--an online resource for genitourinary research', *Development*, 138: 2845-53.
- Hardisty-Hughes, R. E., A. Parker, and S. D. Brown. 2010. 'A hearing and vestibular phenotyping pipeline to identify mouse mutants with hearing impairment', *Nat Protoc*, 5: 177-90.
- Hawkes, C., and S. Kar. 2004. 'The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system', *Brain Res Brain Res Rev*, 44: 117-40.
- Hayashi, T., D. Cunningham, and O. Bermingham-McDonogh. 2007. 'Loss of *Fgfr3* leads to excess hair cell development in the mouse organ of Corti', *Dev Dyn*, 236: 525-33.
- Heidenreich, K. A., and D. A. Linseman. 2004. 'Myocyte enhancer factor-2 transcription factors in neuronal differentiation and survival', *Mol Neurobiol*, 29: 155-66.
- Hellstrom, A., B. Carlsson, A. Niklasson, K. Segnestam, M. Boguszewski, L. de Lacerda, M. Savage, E. Svensson, L. Smith, D. Weinberger, K. Albertsson Wikland, and Z. Laron. 2002. 'IGF-I is critical for normal vascularization of the human retina', *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 3413-6.
- Hemond, S. G., and D. K. Morest. 1991. 'Ganglion formation from the otic placode and the otic crest in the chick embryo: mitosis, migration, and the basal lamina', *Anat Embryol (Berl)*, 184: 1-13.
- Henderson, D., E. C. Bielefeld, K. C. Harris, and B. H. Hu. 2006. 'The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss', *Ear Hear*, 27: 1-19.

- Herrera, P. L., J. Huarte, F. Sanvito, P. Meda, L. Orci, and J. D. Vassalli. 1991. 'Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene', *Development*, 113: 1257-65.
- Hoffman, B. G., B. Zavaglia, J. Witzsche, T. Ruiz de Algara, M. Beach, P. A. Hoodless, S. J. Jones, M. A. Marra, and C. D. Helgason. 2008. 'Identification of transcripts with enriched expression in the developing and adult pancreas', *Genome Biol*, 9: R99.
- Holstein, Gay R. 2012. 'The vestibular system.' in Jürgen K. Mai and George Paxinos (eds.), *The human nervous system* (Elsevier Academic Press: Amsterdam ; Boston).
- Holley, S. J., S. B. Hall, and P. L. Mellon. 2002. 'Complementary expression of IGF-II and IGFBP-5 during anterior pituitary development', *Dev Biol*, 244: 319-28.
- Hooper, A. T., S. V. Shmelkov, S. Gupta, T. Milde, K. Bambino, K. Gillen, M. Goetz, S. Chavala, M. Baljevic, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, N. W. Gale, G. Thurston, G. D. Yancopoulos, L. Vahdat, T. Evans, and S. Rafii. 2009. 'Angiomodulin is a specific marker of vasculature and regulates vascular endothelial growth factor-A-dependent neoangiogenesis', *Circ Res*, 105: 201-8.
- Hua, Q. X., M. Liu, S. Q. Hu, W. Jia, P. Arvan, and M. A. Weiss. 2006. 'A conserved histidine in insulin is required for the foldability of human proinsulin: structure and function of an ALAB5 analog', *J Biol Chem*, 281: 24889-99.
- Hurtado-Chong, A., M. J. Yusta-Boyo, E. Vergano-Vera, A. Bulfone, F. de Pablo, and C. Vicario-Abejon. 2009. 'IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone', *Eur J Neurosci*, 30: 742-55.
- Iino, Y., K. Kakizaki, H. Katano, H. Saigusa, and S. Kanegasaki. 2005. 'Eosinophil chemoattractants in the middle ear of patients with eosinophilic otitis media', *Clin Exp Allergy*, 35: 1370-6.
- Inagaki, K., A. Tiulpakov, P. Rubtsov, P. Sverdlova, V. Peterkova, S. Yakar, S. Terekhov, and D. LeRoith. 2007. 'A familial insulin-like growth factor-I receptor mutant leads to short stature: clinical and biochemical characterization', *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 1542-8.
- Inanlou, M. R., and B. Kablar. 2005. 'Abnormal development of the intercostal muscles and the rib cage in Myf5^{-/-} embryos leads to pulmonary hypoplasia', *Dev Dyn*, 232: 43-54.
- Innes, A. M., and D. A. Dymant. 1993. Last update 2015. 'SHORT Syndrome.' in R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L. J. H. Bean, T. D. Bird, C. T. Fong, H. C. Mefford, R. J. H. Smith and K. Stephens (eds.), *GeneReviews(R)* (Seattle (WA)).
- Irizarry, R. A., B. M. Bolstad, F. Collin, L. M. Cope, B. Hobbs, and T. P. Speed. 2003. 'Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data', *Nucleic Acids Res*, 31: e15.
- Iwai, K., T. Nakagawa, T. Endo, Y. Matsuoka, T. Kita, T. S. Kim, Y. Tabata, and J. Ito. 2006. 'Cochlear protection by local insulin-like growth factor-1 application using biodegradable hydrogel', *Laryngoscope*, 116: 529-33.
- Jacques, B. E., M. E. Montcouquiol, E. M. Layman, M. Lewandoski, and M. W. Kelley. 2007. 'Fgf8 induces pillar cell fate and regulates cellular patterning in the mammalian cochlea', *Development*, 134: 3021-9.
- Jensen, P., S. Magdaleno, K. M. Lehman, D. S. Rice, E. R. Lavallie, L. Collins-Racie, J. M. McCoy, and T. Curran. 2004. 'A neurogenomics approach to gene expression analysis in the developing brain', *Brain Res Mol Brain Res*, 132: 116-27.
- Joglekar, M. V., V. S. Parekh, S. Mehta, R. R. Bhonde, and A. A. Hardikar. 2007. 'MicroRNA profiling of developing and regenerating pancreas reveal post-transcriptional regulation of neurogenin3', *Dev Biol*, 311: 603-12.
- Kanzaki, M. 2006. 'Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics', *Endocr J*, 53: 267-93.
- Karsten, S. L., L. C. Kudo, R. Jackson, C. Sabatti, H. I. Kornblum, and D. H. Geschwind. 2003. 'Global analysis of gene expression in neural progenitors reveals specific cell-cycle, signaling, and metabolic networks', *Dev Biol*, 261: 165-82.

- Kawaguchi, A., T. Ikawa, T. Kasukawa, H. R. Ueda, K. Kurimoto, M. Saitou, and F. Matsuzaki. 2008. 'Single-cell gene profiling defines differential progenitor subclasses in mammalian neurogenesis', *Development*, 135: 3113-24.
- Kawahira, H., N. H. Ma, E. S. Tzanakakis, A. P. McMahon, P. T. Chuang, and M. Hebrok. 2003. 'Combined activities of hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development', *Development*, 130: 4871-9.
- Kawashima, Y., S. Kanzaki, F. Yang, T. Kinoshita, K. Hanaki, J. Nagaishi, Y. Ohtsuka, I. Hisatome, H. Ninomoya, E. Nanba, T. Fukushima, and S. Takahashi. 2005. 'Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short-stature child born with intrauterine growth retardation', *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 4679-87.
- Kedees, M. H., Y. Guz, P. M. Vuguin, C. Vargas, L. Cui, D. F. Steiner, M. J. Charron, and G. Teitelman. 2007. 'Nestin expression in pancreatic endocrine and exocrine cells of mice lacking glucagon signaling', *Dev Dyn*, 236: 1126-33.
- Kelly, M. C., and P. Chen. 2009. 'Development of form and function in the mammalian cochlea', *Curr Opin Neurobiol*, 19: 395-401.
- Kitajiri, S. I., M. Furuse, K. Morita, Y. Saishin-Kiuchi, H. Kido, J. Ito, and S. Tsukita. 2004. 'Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear', *Hear Res*, 187: 25-34.
- Klionsky, D. J. 2005. 'The molecular machinery of autophagy: unanswered questions', *J Cell Sci*, 118: 7-18.
- Kloting, N., L. Koch, T. Wunderlich, M. Kern, K. Ruschke, W. Krone, J. C. Bruning, and M. Bluher. 2008. 'Autocrine IGF-1 action in adipocytes controls systemic IGF-1 concentrations and growth', *Diabetes*, 57: 2074-82.
- Knipper, M., C. Bandtlow, L. Gestwa, I. Kopschall, K. Rohbock, B. Wiechers, H. P. Zenner, and U. Zimmermann. 1998. 'Thyroid hormone affects Schwann cell and oligodendrocyte gene expression at the glial transition zone of the VIIIth nerve prior to cochlea function', *Development*, 125: 3709-18.
- Koffler, T., K. Ushakov, and K. B. Avraham. 2015. 'Genetics of Hearing Loss: Syndromic', *Otolaryngol Clin North Am*.
- König, Horst Erich, Hans-Georg Liebich, and H. Bragulla. 2007. 'Vestibulocochlear organ.' in, *Veterinary anatomy of domestic mammals : textbook and colour atlas* (Schattauer: Stuttgart ; New York).
- Korver, W., J. Roose, and H. Clevers. 1997. 'The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells', *Nucleic Acids Res*, 25: 1715-9.
- Koyama, M., S. S. Spicer, and B. A. Schulte. 1999. 'Immunohistochemical localization of Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase IV in outer hair cells', *J Histochem Cytochem*, 47: 7-12.
- Kraft, C., M. Peter, and K. Hofmann. 2010. 'Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond', *Nat Cell Biol*, 12: 836-41.
- Krapp, A., M. Knofler, S. Frutiger, G. J. Hughes, O. Hagenbuchle, and P. K. Wellauer. 1996. 'The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein', *Embo J*, 15: 4317-29.
- Kruis, T., J. Klammt, A. Galli-Tsinopoulou, T. Wallborn, M. Schlicke, E. Muller, J. Kratzsch, A. Korner, R. Odeh, W. Kiess, and R. Pfaffle. 2010. 'Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation', *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 1137-42.
- Kuhn, S., N. Ingham, S. Pearson, S. M. Gribble, S. Clayton, K. P. Steel, and W. Marcotti. 2012. 'Auditory function in the Tc1 mouse model of down syndrome suggests a limited region of human chromosome 21 involved in otitis media', *PLoS One*, 7: e31433.
- Kumar, S., J. Boehm, and J. C. Lee. 2003. 'p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases', *Nat Rev Drug Discov*, 2: 717-26.
- Kyosseva, S. V. 2004. 'Mitogen-activated protein kinase signaling', *Int Rev Neurobiol*, 59: 201-20.
- Kyriakis, J. M., and J. Avruch. 2001. 'Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation', *Physiol Rev*, 81: 807-69.

- Ladher, R. K., K. U. Anakwe, A. L. Gurney, G. C. Schoenwolf, and P. H. Francis-West. 2000. 'Identification of synergistic signals initiating inner ear development', *Science*, 290: 1965-7.
- Ladher, R. K., T. J. Wright, A. M. Moon, S. L. Mansour, and G. C. Schoenwolf. 2005. 'FGF8 initiates inner ear induction in chick and mouse', *Genes Dev*, 19: 603-13.
- Lammert, E., J. Brown, and D. A. Melton. 2000. 'Notch gene expression during pancreatic organogenesis', *Mech Dev*, 94: 199-203.
- Langer, P., S. Grunder, and A. Rusch. 2003. 'Expression of Ca²⁺-activated BK channel mRNA and its splice variants in the rat cochlea', *J Comp Neurol*, 455: 198-209.
- Laoukili, J., M. Stahl, and R. H. Medema. 2007. 'FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer', *Biochim Biophys Acta*, 1775: 92-102.
- Lee, J. E., J. Pintar, and A. Efstratiadis. 1990. 'Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis', *Development*, 110: 151-9.
- Lee, Y. S., F. Liu, and N. Segil. 2006. 'A morphogenetic wave of p27Kip1 transcription directs cell cycle exit during organ of Corti development', *Development*, 133: 2817-26.
- Lefloch, R., J. Pouyssegur, and P. Lenormand. 2009. 'Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation', *Cell Cycle*, 8: 705-11.
- Leibovici, M., S. Safieddine, and C. Petit. 2008. 'Mouse models for human hereditary deafness', *Curr Top Dev Biol*, 84: 385-429.
- Leifke, E., V. Gorennoi, C. Wichers, A. Von Zur Muhlen, E. Von Buren, and G. Brabant. 2000. 'Age-related changes of serum sex hormones, insulin-like growth factor-1 and sex-hormone binding globulin levels in men: cross-sectional data from a healthy male cohort', *Clin Endocrinol (Oxf)*, 53: 689-95.
- Lentz, J. J., W. C. Gordon, H. E. Farris, G. H. MacDonald, D. E. Cunningham, C. A. Robbins, B. L. Tempel, N. G. Bazan, E. W. Rubel, E. C. Oesterle, and B. J. Keats. 2010. 'Deafness and retinal degeneration in a novel USH1C knock-in mouse model', *Dev Neurobiol*, 70: 253-67.
- Leonova, E. V., D. A. Fairfield, M. I. Lomax, and R. A. Altschuler. 2002. 'Constitutive expression of Hsp27 in the rat cochlea', *Hear Res*, 163: 61-70.
- Lewis, M. A., and K. P. Steel. 2010. 'MicroRNAs in mouse development and disease', *Semin Cell Dev Biol*, 21: 774-80.
- Li, H., J. C. Radford, M. J. Ragusa, K. L. Shea, S. R. McKercher, J. D. Zaremba, W. Soussou, Z. Nie, Y. J. Kang, N. Nakanishi, S. Okamoto, A. J. Roberts, J. J. Schwarz, and S. A. Lipton. 2008. 'Transcription factor MEF2C influences neural stem/progenitor cell differentiation and maturation in vivo', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 9397-402.
- Liang, L., W. H. Guo, D. R. Esquiliano, M. Asai, S. Rodriguez, J. Giraud, J. A. Kushner, M. F. White, and M. F. Lopez. 2010. 'Insulin-like growth factor 2 and the insulin receptor, but not insulin, regulate fetal hepatic glycogen synthesis', *Endocrinology*, 151: 741-7.
- Lieberman, M. C., E. Tartaglioni, J. C. Fleming, and E. J. Neufeld. 2006. 'Deletion of SLC19A2, the high affinity thiamine transporter, causes selective inner hair cell loss and an auditory neuropathy phenotype', *J Assoc Res Otolaryngol*, 7: 211-7.
- Lioubinski, O., M. Muller, M. Wegner, and M. Sander. 2003. 'Expression of Sox transcription factors in the developing mouse pancreas', *Dev Dyn*, 227: 402-8.
- Lipinski, R. J., C. H. Cook, D. H. Barnett, J. J. Gipp, R. E. Peterson, and W. Bushman. 2005. 'Sonic hedgehog signaling regulates the expression of insulin-like growth factor binding protein-6 during fetal prostate development', *Dev Dyn*, 233: 829-36.
- Liu, J. P., J. Baker, A. S. Perkins, E. J. Robertson, and A. Efstratiadis. 1993. 'Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)', *Cell*, 75: 59-72.
- Liu, Q., A. Saveliev, and E. A. Pierce. 2009. 'The severity of retinal degeneration in Rp1h gene-targeted mice is dependent on genetic background', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50: 1566-74.
- Liu, X., M. Milo, N. D. Lawrence, and M. Rattray. 2005. 'A tractable probabilistic model for Affymetrix probe-level analysis across multiple chips', *Bioinformatics*, 21: 3637-44.

- . 2006. 'Probe-level measurement error improves accuracy in detecting differential gene expression', *Bioinformatics*, 22: 2107-13.
- Lopez-Garcia, C., A. J. Lopez-Contreras, A. Cremades, M. T. Castells, F. Marin, F. Schreiber, and R. Penafiel. 2008. 'Molecular and morphological changes in placenta and embryo development associated with the inhibition of polyamine synthesis during midpregnancy in mice', *Endocrinology*, 149: 5012-23.
- Lopez-Rios, J., M. E. Gallardo, S. Rodriguez de Cordoba, and P. Bovolenta. 1999. 'Six9 (Optx2), a new member of the six gene family of transcription factors, is expressed at early stages of vertebrate ocular and pituitary development', *Mech Dev*, 83: 155-9.
- Machold, R., C. Klein, and G. Fishell. 2011. 'Genes expressed in Atoh1 neuronal lineages arising from the r1/isthmus rhombic lip', *Gene Expr Patterns*, 11: 349-59.
- Magarinos, M., J. Contreras, M. R. Aburto, and I. Varela-Nieto. 2012. 'Early development of the vertebrate inner ear', *Anat Rec (Hoboken)*, 295: 1775-90.
- Magariños, M, J. Contreras, and I. Varela-Nieto. 2014. 'Early Development of the Vertebrate Inner Ear ' in R. Romand and Isabel Varela-Nieto (eds.), *Development of auditory and vestibular systems* (Academic Press: Oxford, UK Waltham, MA,).
- Magdaleno, S., P. Jensen, C. L. Brumwell, A. Seal, K. Lehman, A. Asbury, T. Cheung, T. Cornelius, D. M. Batten, C. Eden, S. M. Norland, D. S. Rice, N. Dosooye, S. Shakya, P. Mehta, and T. Curran. 2006. 'BGEM: an in situ hybridization database of gene expression in the embryonic and adult mouse nervous system', *PLoS Biol*, 4: e86.
- Malmierca, M. S. 2003. 'The structure and physiology of the rat auditory system: an overview', *Int Rev Neurobiol*, 56: 147-211.
- Mannstrom, P., B. Ulfhake, M. Kirkegaard, and M. Ulfendahl. 2013. 'Dietary restriction reduces age-related degeneration of stria vascularis in the inner ear of the rat', *Exp Gerontol*, 48: 1173-9.
- Mansergh, F., N. C. Orton, J. P. Vessey, M. R. Lalonde, W. K. Stell, F. Tremblay, S. Barnes, D. E. Rancourt, and N. T. Bech-Hansen. 2005. 'Mutation of the calcium channel gene *Cacna1f* disrupts calcium signaling, synaptic transmission and cellular organization in mouse retina', *Hum Mol Genet*, 14: 3035-46.
- Maricich, S. M., A. Xia, E. L. Mathes, V. Y. Wang, J. S. Oghalai, B. Fritzsche, and H. Y. Zoghbi. 2009. 'Atoh1-lineal neurons are required for hearing and for the survival of neurons in the spiral ganglion and brainstem accessory auditory nuclei', *J Neurosci*, 29: 11123-33.
- Marino, G., A. F. Fernandez, S. Cabrera, Y. W. Lundberg, R. Cabanillas, F. Rodriguez, N. Salvador-Montoliu, J. A. Vega, A. Germana, A. Fueyo, J. M. Freije, and C. Lopez-Otin. 2010. 'Autophagy is essential for mouse sense of balance', *J Clin Invest*, 120: 2331-44.
- McFadden, S. L., K. K. Ohlemiller, D. Ding, M. Shero, and R. J. Salvi. 2001. 'The Influence of Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Deficiencies on Noise-Induced Hearing Loss in Mice', *Noise Health*, 3: 49-64.
- McFadden, S. L., J. M. Woo, N. Michalak, and D. Ding. 2005. 'Dietary vitamin C supplementation reduces noise-induced hearing loss in guinea pigs', *Hear Res*, 202: 200-8.
- McGrath, K. E., and J. Palis. 1997. 'Expression of homeobox genes, including an insulin promoting factor, in the murine yolk sac at the time of hematopoietic initiation', *Mol Reprod Dev*, 48: 145-53.
- McWhirter, J. R., M. Goulding, J. A. Weiner, J. Chun, and C. Murre. 1997. 'A novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A-Pbx1', *Development*, 124: 3221-32.
- Mizushima, N. 2007. 'Autophagy: process and function', *Genes Dev*, 21: 2861-73.
- Montessuit, C., N. Rosenblatt-Velin, I. Papageorgiou, L. Campos, C. Pellieux, T. Palma, and R. Lerch. 2004. 'Regulation of glucose transporter expression in cardiac myocytes: p38 MAPK is a strong inducer of GLUT4', *Cardiovasc Res*, 64: 94-104.
- Moreno-Barriuso, N., A. V. Lopez-Malpartida, F. de Pablo, and J. G. Pichel. 2006. 'Alterations in alveolar epithelium differentiation and vasculogenesis in lungs of LIF/IGF-I double deficient embryos', *Dev Dyn*, 235: 2040-50.

- Morgan, D. O., J. C. Edman, D. N. Standring, V. A. Fried, M. C. Smith, R. A. Roth, and W. J. Rutter. 1987. 'Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein', *Nature*, 329: 301-7.
- Munoz, J. P., A. Collao, M. Chiong, C. Maldonado, T. Adasme, L. Carrasco, P. Ocaranza, R. Bravo, L. Gonzalez, G. Diaz-Araya, C. Hidalgo, and S. Lavandero. 2009. 'The transcription factor MEF2C mediates cardiomyocyte hypertrophy induced by IGF-1 signaling', *Biochem Biophys Res Commun*, 388: 155-60.
- Murillo-Cuesta, S., G. Camarero, A. Gonzalez-Rodriguez, L. Rodríguez-de la Rosa, D. J. Burks, C. Avendano, A. M. Valverde, and I. Varela-Nieto. 2012. 'Insulin receptor substrate 2 (IRS2)-deficient mice show sensorineural hearing loss that is delayed by concomitant protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) loss of function', *Mol Med*, 18: 260-9.
- Murillo-Cuesta, S., L. Rodríguez-de la Rosa, R. Cediél, L. Lassaletta, and I. Varela-Nieto. 2011. 'The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing', *Front Mol Neurosci*, 4: 11.
- Nagata, K., K. Masumoto, T. Uesugi, S. Yamamoto, K. Yoshizaki, S. Fukumoto, K. Nonaka, and T. Taguchi. 2007. 'Effect of insulin-like-growth factor and its receptors regarding lung development in fetal mice', *Pediatr Surg Int*, 23: 953-9.
- Nakada, Y., T. L. Hunsaker, R. M. Henke, and J. E. Johnson. 2004. 'Distinct domains within Mash1 and Math1 are required for function in neuronal differentiation versus neuronal cell-type specification', *Development*, 131: 1319-30.
- Nakagawa, T., K. Kumakawa, S. Usami, N. Hato, K. Tabuchi, M. Takahashi, K. Fujiwara, A. Sasaki, S. Komune, T. Sakamoto, H. Hiraumi, N. Yamamoto, S. Tanaka, H. Tada, M. Yamamoto, A. Yonezawa, T. Ito-Ihara, T. Ikeda, A. Shimizu, Y. Tabata, and J. Ito. 2014. 'A randomized controlled clinical trial of topical insulin-like growth factor-1 therapy for sudden deafness refractory to systemic corticosteroid treatment', *BMC Med*, 12: 219.
- Nakagawa, T., E. Ogino-Nishimura, H. Hiraumi, T. Sakamoto, N. Yamamoto, and J. Ito. 2012. 'Audiometric outcomes of topical IGF1 treatment for sudden deafness refractory to systemic steroids', *Otol Neurotol*, 33: 941-6.
- Nakagawa, T., T. Sakamoto, H. Hiraumi, Y. S. Kikkawa, N. Yamamoto, K. Hamaguchi, K. Ono, M. Yamamoto, Y. Tabata, S. Teramukai, S. Tanaka, H. Tada, R. Onodera, A. Yonezawa, K. Inui, and J. Ito. 2010. 'Topical insulin-like growth factor 1 treatment using gelatin hydrogels for glucocorticoid-resistant sudden sensorineural hearing loss: a prospective clinical trial', *BMC Med*, 8: 76.
- Nammo, T., K. Yamagata, T. Tanaka, T. Kodama, F. M. Sladek, K. Fukui, F. Katsube, Y. Sato, J. Miyagawa, and I. Shimomura. 2008. 'Expression of HNF-4alpha (MODY1), HNF-1beta (MODY5), and HNF-1alpha (MODY3) proteins in the developing mouse pancreas', *Gene Expr Patterns*, 8: 96-106.
- Narasimhan, S. D., K. Yen, and H. A. Tissenbaum. 2009. 'Converging pathways in lifespan regulation', *Curr Biol*, 19: R657-66.
- Nayagam, B. A., M. A. Muniak, and D. K. Ryugo. 2011. 'The spiral ganglion: connecting the peripheral and central auditory systems', *Hear Res*, 278: 2-20.
- Netchine, I., S. Azzi, M. Houang, D. Seurin, L. Perin, J. M. Ricort, C. Daubas, C. Legay, J. Mester, R. Herich, F. Godeau, and Y. Le Bouc. 2009. 'Partial primary deficiency of insulin-like growth factor (IGF)-I activity associated with IGF1 mutation demonstrates its critical role in growth and brain development', *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 3913-21.
- Netchine, I., S. Azzi, Y. Le Bouc, and M. O. Savage. 2011. 'IGF1 molecular anomalies demonstrate its critical role in fetal, postnatal growth and brain development', *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25: 181-90.
- Ng, L., E. Cordas, X. Wu, K. R. Vella, A. N. Hollenberg, and D. Forrest. 2015. 'Age-Related Hearing Loss and Degeneration of Cochlear Hair Cells in Mice Lacking Thyroid Hormone Receptor beta1', *Endocrinology*, 156: 3853-65.
- Ngo-Muller, V., and K. Muneoka. 2000. 'Influence of FGF4 on digit morphogenesis during limb development in the mouse', *Dev Biol*, 219: 224-36.

- Nishimura, K., R. M. Weichert, W. Liu, R. L. Davis, and A. Dabdoub. 2014. 'Generation of induced neurons by direct reprogramming in the mammalian cochlea', *Neuroscience*, 275: 125-35.
- O'Dell, S. D., and I. N. Day. 1998. 'Insulin-like growth factor II (IGF-II)', *Int J Biochem Cell Biol*, 30: 767-71.
- Ogata, N., D. Chikazu, N. Kubota, Y. Terauchi, K. Tobe, Y. Azuma, T. Ohta, T. Kadowaki, K. Nakamura, and H. Kawaguchi. 2000. 'Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover', *J Clin Invest*, 105: 935-43.
- Ohlemiller, K. K. 2008. 'Recent findings and emerging questions in cochlear noise injury', *Hear Res*, 245: 5-17.
- . 2009. 'Mechanisms and genes in human strial presbycusis from animal models', *Brain Res*, 1277: 70-83.
- Ohlemiller, K. K., and P. M. Gagnon. 2007. 'Genetic dependence of cochlear cells and structures injured by noise', *Hear Res*, 224: 34-50.
- Okano, T., and M. W. Kelley. 2013. 'Expression of insulin-like growth factor binding proteins during mouse cochlear development', *Dev Dyn*, 242: 1210-21.
- Okano, T., S. Xuan, and M. W. Kelley. 2011. 'Insulin-like growth factor signaling regulates the timing of sensory cell differentiation in the mouse cochlea', *J Neurosci*, 31: 18104-18.
- Pais, R. S., N. Moreno-Barriuso, I. Hernandez-Porrás, I. P. Lopez, J. De Las Rivas, and J. G. Pichel. 2013. 'Transcriptome analysis in prenatal IGF1-deficient mice identifies molecular pathways and target genes involved in distal lung differentiation', *PLoS One*, 8: e83028.
- Pandini, G., F. Frasca, R. Mineo, L. Sciacca, R. Vigneri, and A. Belfiore. 2002. 'Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved', *J Biol Chem*, 277: 39684-95.
- Park, E., J. D. Bell, and A. J. Baker. 2008. 'Traumatic brain injury: can the consequences be stopped?', *CMAJ*, 178: 1163-70.
- Park, J. Y., S. J. Jeong, H. D. Sa, J. Y. Lee, X. Liu, M. J. Cho, K. W. Lee, and J. H. Kim. 2015. 'Construction of a shuttle vector based on the small cryptic plasmid pJY33 from *Weissella cibaria* 33', *Plasmid*, 79: 30-6.
- Park, J. Y., Y. H. Park, D. H. Shin, and S. H. Oh. 2007. 'Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-mediated hair cell survival on the mouse utricle exposed to neomycin: the roles of IGFBP-4 and IGFBP-5', *Acta Otolaryngol Suppl*: 22-9.
- Park, Y. H. 2015. 'Stem Cell Therapy for Sensorineural Hearing Loss, Still Alive?', *J Audiol Otol*, 19: 63-7.
- Pauley, S., E. Lai, and B. Fritsch. 2006. 'Foxg1 is required for morphogenesis and histogenesis of the mammalian inner ear', *Dev Dyn*, 235: 2470-82.
- Petrovic, V., R. H. Costa, L. F. Lau, P. Raychaudhuri, and A. L. Tyner. 2008. 'FoxM1 regulates growth factor-induced expression of kinase-interacting stathmin (KIS) to promote cell cycle progression', *J Biol Chem*, 283: 453-60.
- Pollak, M. 2008. 'Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia', *Nat Rev Cancer*, 8: 915-28.
- Potthoff, M. J., and E. N. Olson. 2007. 'MEF2: a central regulator of diverse developmental programs', *Development*, 134: 4131-40.
- Powell-Braxton, L., P. Hollingshead, C. Warburton, M. Dowd, S. Pitts-Meek, D. Dalton, N. Gillett, and T. A. Stewart. 1993. 'IGF-I is required for normal embryonic growth in mice', *Genes Dev*, 7: 2609-17.
- Prada, P. O., P. G. Quaresma, A. M. Caricilli, A. C. Santos, D. Guadagnini, J. Morari, L. Weissmann, E. R. Ropelle, J. B. Carvalheira, L. A. Velloso, and M. J. Saad. 2013. 'Tub has a key role in insulin and leptin signaling and action in vivo in hypothalamic nuclei', *Diabetes*, 62: 137-48.
- Prasadan, K., M. Koizumi, S. Tulachan, C. Shiota, N. Lath, J. Paredes, P. Guo, Y. El-Gohary, M. Malek, S. Shah, and G. K. Gittes. 2011. 'The expression and function of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in the embryonic mouse pancreas', *Diabetes*, 60: 548-54.

- Previati, M., I. Lanzoni, E. Corbacella, S. Magosso, S. Giuffre, F. Francioso, D. Arcelli, S. Volinia, A. Barbieri, S. Hatzopoulos, S. Capitani, and A. Martini. 2004. 'RNA expression induced by cisplatin in an organ of Corti-derived immortalized cell line', *Hear Res*, 196: 8-18.
- Puligilla, C., F. Feng, K. Ishikawa, S. Bertuzzi, A. Dabdoub, A. J. Griffith, B. Fritzsche, and M. W. Kelley. 2007. 'Disruption of fibroblast growth factor receptor 3 signaling results in defects in cellular differentiation, neuronal patterning, and hearing impairment', *Dev Dyn*, 236: 1905-17.
- Pulkkinen, M. A., B. Spencer-Dene, C. Dickson, and T. Otonkoski. 2003. 'The IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 is required for proper growth and branching of pancreatic ductal epithelium but not for differentiation of exocrine or endocrine cells', *Mech Dev*, 120: 167-75.
- Puscheck, E. E., E. Pergament, Y. Patel, J. Dreschler, and D. A. Rappolee. 1998. 'Insulin receptor substrate-1 is expressed at high levels in all cells of the peri-implantation mouse embryo', *Mol Reprod Dev*, 49: 386-93.
- Raile, K., J. Klammt, A. Schneider, A. Keller, S. Laue, R. Smith, R. Pfaffle, J. Kratzsch, E. Keller, and W. Kiess. 2006. 'Clinical and functional characteristics of the human Arg59Ter insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) mutation: implications for a gene dosage effect of the human IGF1R', *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 2264-71.
- Rajapaksha, H., C. Alvino, P. McCarthy, and B. E. Forbes. 2012. 'The insulin-like growth factor mutation database (IGFmdb)', *Growth Horm IGF Res*, 22: 158-66.
- Ramekers, D., H. Versnel, W. Grolman, and S. F. Klis. 2012. 'Neurotrophins and their role in the cochlea', *Hear Res*, 288: 19-33.
- Rappolee, D. A., K. S. Sturm, O. Behrendtsen, G. A. Schultz, R. A. Pedersen, and Z. Werb. 1992. 'Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos', *Genes Dev*, 6: 939-52.
- Rashid, A. J., C. J. Cole, and S. A. Josselyn. 2014. 'Emerging roles for MEF2 transcription factors in memory', *Genes Brain Behav*, 13: 118-25.
- Reinhard, J., A. Horvat-Brocker, S. Illes, A. Zaremba, P. Knyazev, A. Ullrich, and A. Faissner. 2009. 'Protein tyrosine phosphatases expression during development of mouse superior colliculus', *Exp Brain Res*, 199: 279-97.
- Renna, M., C. F. Bento, A. Fleming, F. M. Menzies, F. H. Siddiqi, B. Ravikumar, C. Puri, M. Garcia-Arencibia, O. Sadiq, S. Corrochano, S. Carter, S. D. Brown, A. Acevedo-Arozena, and D. C. Rubinsztein. 2013. 'IGF-1 receptor antagonism inhibits autophagy', *Hum Mol Genet*, 22: 4528-44.
- Riva, C., E. Donadieu, J. Magnan, and J. P. Lavieille. 2007. 'Age-related hearing loss in CD/1 mice is associated to ROS formation and HIF target proteins up-regulation in the cochlea', *Exp Gerontol*, 42: 327-36.
- Rivolta, M. N. 2010. 'Stem cells and cell lines from the human auditory organ: applications, hurdles and bottlenecks in the development of regenerative therapies for deafness', *Drug Discov Today*, 15: 283-6.
- Roback, E. W., A. J. Barakat, V. G. Dev, M. Mbikay, M. Chretien, and M. G. Butler. 1991. 'An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1----qter) and loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene', *Am J Med Genet*, 38: 74-9.
- Rodriguez-de la Rosa, L., L. Fernandez-Sanchez, F. Germain, S. Murillo-Cuesta, I. Varela-Nieto, P. de la Villa, and N. Cuenca. 2012. 'Age-related functional and structural retinal modifications in the Igf1-/- null mouse', *Neurobiol Dis*, 46: 476-85.
- Roth, T. N. 2015. 'Aging of the auditory system', *Handb Clin Neurol*, 129: 357-73.
- Rowan, S., C. M. Chen, T. L. Young, D. E. Fisher, and C. L. Cepko. 2004. 'Transdifferentiation of the retina into pigmented cells in ocular retardation mice defines a new function of the homeodomain gene Chx10', *Development*, 131: 5139-52.
- Rubel, E. W., and B. Fritzsche. 2002. 'Auditory system development: primary auditory neurons and their targets', *Annu Rev Neurosci*, 25: 51-101.
- Ruberte, J., E. Ayuso, M. Navarro, A. Carretero, V. Nacher, V. Haurigot, M. George, C. Llombart, A. Casellas, C. Costa, A. Bosch, and F. Bosch. 2004. 'Increased ocular levels

- of IGF-1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease', *J Clin Invest*, 113: 1149-57.
- Rubinstein, A. D., and A. Kimchi. 2012. 'Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis', *J Cell Sci*, 125: 5259-68.
- Ruchaud, S., M. Carmena, and W. C. Earnshaw. 2007. 'Chromosomal passengers: conducting cell division', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 798-812.
- Ruffle, R. A., A. C. Mapley, M. K. Malik, S. V. Labruzzo, J. M. Chabla, R. Jose, B. H. Hallas, H. G. Yu, J. M. Horowitz, and G. Torres. 2006. 'Distribution of constitutively expressed MEF-2A in adult rat and human nervous systems', *Synapse*, 59: 513-20.
- Ruttiger, L., M. Sausbier, U. Zimmermann, H. Winter, C. Braig, J. Engel, M. Knirsch, C. Arntz, P. Langer, B. Hirt, M. Muller, I. Kopschall, M. Pfister, S. Munkner, K. Rohbock, I. Pfaff, A. Rusch, P. Ruth, and M. Knipper. 2004. 'Deletion of the Ca²⁺-activated potassium (BK) alpha-subunit but not the BKbeta1-subunit leads to progressive hearing loss', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 12922-7.
- Ryugo, D. K., and F. H. Willard. 1985. 'The dorsal cochlear nucleus of the mouse: a light microscopic analysis of neurons that project to the inferior colliculus', *J Comp Neurol*, 242: 381-96.
- Sachdev, D., and D. Yee. 2007. 'Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy', *Mol Cancer Ther*, 6: 1-12.
- Safieddine, S., C. D. Ly, Y. X. Wang, C. Y. Wang, B. Kachar, R. S. Petralia, and R. J. Wenthold. 2002. 'Ocsyn, a novel syntaxin-interacting protein enriched in the subapical region of inner hair cells', *Mol Cell Neurosci*, 20: 343-53.
- Safieddine, S., and R. J. Wenthold. 1999. 'SNARE complex at the ribbon synapses of cochlear hair cells: analysis of synaptic vesicle- and synaptic membrane-associated proteins', *Eur J Neurosci*, 11: 803-12.
- Sakmann, Bert, and Erwin Neher. 1983. *Single-channel recording* (Plenum Press: New York).
- Salehi, Z., F. Mashayekhi, M. Najji, and S. Pandamooz. 2009. 'Insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid during the development of mouse embryos', *J Clin Neurosci*, 16: 950-3.
- Salih, D. A., S. Mohan, Y. Kasukawa, G. Tripathi, F. A. Lovett, N. F. Anderson, E. J. Carter, J. E. Wergedal, D. J. Baylink, and J. M. Pell. 2005. 'Insulin-like growth factor-binding protein-5 induces a gender-related decrease in bone mineral density in transgenic mice', *Endocrinology*, 146: 931-40.
- Salminen, A., and K. Kaarniranta. 2010. 'Insulin/IGF-1 paradox of aging: regulation via AKT/IKK/NF-kappaB signaling', *Cell Signal*, 22: 573-7.
- Sanchez-Calderon, H., J. Francisco-Morcillo, G. Martin-Partido, and M. Hidalgo-Sanchez. 2007. 'Fgf19 expression patterns in the developing chick inner ear', *Gene Expr Patterns*, 7: 30-8.
- Sanchez-Calderon, H., M. Milo, Y. Leon, and I. Varela-Nieto. 2007. 'A network of growth and transcription factors controls neuronal differentiation and survival in the developing ear', *Int J Dev Biol*, 51: 557-70.
- Schacht, J., A. E. Talaska, and L. P. Rybak. 2012. 'Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention', *Anat Rec (Hoboken)*, 295: 1837-50.
- Schwitzgebel, V. M., D. W. Scheel, J. R. Conners, J. Kalamaras, J. E. Lee, D. J. Anderson, L. Sussel, J. D. Johnson, and M. S. German. 2000. 'Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas', *Development*, 127: 3533-42.
- Seger, R., and E. G. Krebs. 1995. 'The MAPK signaling cascade', *FASEB J*, 9: 726-35.
- Sensi, A., S. Ceruti, P. Trevisi, F. Gualandi, M. Busi, I. Donati, M. Neri, A. Ferlini, and A. Martini. 2011. 'LAMM syndrome with middle ear dysplasia associated with compound heterozygosity for FGF3 mutations', *Am J Med Genet A*, 155A: 1096-101.
- Sferruzzi-Perri, A. N., A. M. Macpherson, C. T. Roberts, and S. A. Robertson. 2009. 'Csf2 null mutation alters placental gene expression and trophoblast glycogen cell and giant cell abundance in mice', *Biol Reprod*, 81: 207-21.
- Shepherd, P. R., D. J. Withers, and K. Siddle. 1998. 'Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling', *Biochem J*, 333 (Pt 3): 471-90.

- Sherwood, R. I., C. Jitianu, O. Cleaver, D. A. Shaywitz, J. O. Lamenzo, A. E. Chen, T. R. Golub, and D. A. Melton. 2007. 'Prospective isolation and global gene expression analysis of definitive and visceral endoderm', *Dev Biol*, 304: 541-55.
- Shi, C. S., and J. H. Kehrl. 2008. 'MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages', *J Biol Chem*, 283: 33175-82.
- Shimogori, T., D. A. Lee, A. Miranda-Angulo, Y. Yang, H. Wang, L. Jiang, A. C. Yoshida, A. Kataoka, H. Mashiko, M. Avetisyan, L. Qi, J. Qian, and S. Blackshaw. 2010. 'A genomic atlas of mouse hypothalamic development', *Nat Neurosci*, 13: 767-75.
- Siddle, K. 2011. 'Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players', *J Mol Endocrinol*, 47: R1-10.
- Silha, J. V., S. Mishra, C. J. Rosen, W. G. Beamer, R. T. Turner, D. R. Powell, and L. J. Murphy. 2003. 'Perturbations in bone formation and resorption in insulin-like growth factor binding protein-3 transgenic mice', *J Bone Miner Res*, 18: 1834-41.
- Smith, J., C. Goldsmith, A. Ward, and R. LeDieu. 2000. 'IGF-II ameliorates the dystrophic phenotype and coordinately down-regulates programmed cell death', *Cell Death Differ*, 7: 1109-18.
- Sobolewska, A., M. Gajewska, J. Zarzynska, B. Gajkowska, and T. Motyl. 2009. 'IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway', *Eur J Cell Biol*, 88: 117-30.
- Sokolowski, B. H., Y. Sakai, M. C. Harvey, and D. E. Duzhy. 2004. 'Identification and localization of an arachidonic acid-sensitive potassium channel in the cochlea', *J Neurosci*, 24: 6265-76.
- Soyer, J., L. Flasse, W. Raffelsberger, A. Beucher, C. Orvain, B. Peers, P. Ravassard, J. Vermot, M. L. Voz, G. Mellitzer, and G. Gradwohl. 2010. 'Rfx6 is an Ngn3-dependent winged helix transcription factor required for pancreatic islet cell development', *Development*, 137: 203-12.
- Stelzer, C., A. Brimmer, P. Hermanns, B. Zabel, and U. H. Dietz. 2007. 'Expression profile of Papss2 (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2) during cartilage formation and skeletal development in the mouse embryo', *Dev Dyn*, 236: 1313-8.
- Sugawara, M., J. C. Murtie, K. M. Stankovic, M. C. Liberman, and G. Corfas. 2007. 'Dynamic patterns of neurotrophin 3 expression in the postnatal mouse inner ear', *J Comp Neurol*, 501: 30-7.
- Sultana, D. A., S. Tomita, M. Hamada, Y. Iwanaga, Y. Kitahama, N. V. Khang, S. Hirai, I. Ohigashi, S. Nitta, T. Amagai, S. Takahashi, and Y. Takahama. 2009. 'Gene expression profile of the third pharyngeal pouch reveals role of mesenchymal MafB in embryonic thymus development', *Blood*, 113: 2976-87.
- Sumazaki, R., N. Shiojiri, S. Isoyama, M. Masu, K. Keino-Masu, M. Osawa, H. Nakauchi, R. Kageyama, and A. Matsui. 2004. 'Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice', *Nat Genet*, 36: 83-7.
- Tagawa, M., T. Shirasawa, S. Fujimura, and S. Sakiyama. 1994. 'Expression of protein tyrosine phosphatase genes in the developing brain of mouse and rat', *Biochem Mol Biol Int*, 33: 1221-7.
- Takemoto, M., L. He, J. Norlin, J. Patrakka, Z. Xiao, T. Petrova, C. Bondjers, J. Asp, E. Wallgard, Y. Sun, T. Samuelsson, P. Mostad, S. Lundin, N. Miura, Y. Sado, K. Alitalo, S. E. Quaggin, K. Tryggvason, and C. Betsholtz. 2006. 'Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function', *Embo J*, 25: 1160-74.
- Tamplin, O. J., B. J. Cox, and J. Rossant. 2011. 'Integrated microarray and ChIP analysis identifies multiple Foxa2 dependent target genes in the notochord', *Dev Biol*, 360: 415-25.
- Tamplin, O. J., D. Kinzel, B. J. Cox, C. E. Bell, J. Rossant, and H. Lickert. 2008. 'Microarray analysis of Foxa2 mutant mouse embryos reveals novel gene expression and inductive roles for the gastrula organizer and its derivatives', *BMC Genomics*, 9: 511.

- Tan, Y., P. Raychaudhuri, and R. H. Costa. 2007. 'Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes', *Mol Cell Biol*, 27: 1007-16.
- Taniguchi, C. M., B. Emanuelli, and C. R. Kahn. 2006. 'Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 85-96.
- Tejjido, O., R. Casaroli-Marano, T. Kharkovets, F. Aguado, A. Zorzano, M. Palacin, E. Soriano, A. Martinez, and R. Estevez. 2007. 'Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems', *Neurobiol Dis*, 26: 532-45.
- Tekin, M., K. S. Arnos, and A. Pandya. 2001. 'Advances in hereditary deafness', *Lancet*, 358: 1082-90.
- Telford, N. A., A. Hogan, C. R. Franz, and G. A. Schultz. 1990. 'Expression of genes for insulin and insulin-like growth factors and receptors in early postimplantation mouse embryos and embryonal carcinoma cells', *Mol Reprod Dev*, 27: 81-92.
- Thorens, B., D. Tarussio, M. A. Maestro, M. Rovira, E. Heikkila, and J. Ferrer. 2015. 'Ins1(Cre) knock-in mice for beta cell-specific gene recombination', *Diabetologia*, 58: 558-65.
- Thurston, T. L., G. Ryzhakov, S. Bloor, N. von Muhlinen, and F. Randow. 2009. 'The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria', *Nat Immunol*, 10: 1215-21.
- Thut, C. J., R. B. Rountree, M. Hwa, and D. M. Kingsley. 2001. 'A large-scale in situ screen provides molecular evidence for the induction of eye anterior segment structures by the developing lens', *Dev Biol*, 231: 63-76.
- Tian, C., X. Z. Liu, F. Han, H. Yu, C. Longo-Guess, B. Yang, C. Lu, D. Yan, and Q. Y. Zheng. 2010. 'Ush1c gene expression levels in the ear and eye suggest different roles for Ush1c in neurosensory organs in a new Ush1c knockout mouse', *Brain Res*, 1328: 57-70.
- Trimarchi, J. M., S. H. Cho, and C. L. Cepko. 2009. 'Identification of genes expressed preferentially in the developing peripheral margin of the optic cup', *Dev Dyn*, 238: 2327-9.
- Trune, D. R., and B. Canlon. 2012. 'Corticosteroid therapy for hearing and balance disorders', *Anat Rec (Hoboken)*, 295: 1928-43.
- Tsuprun, V., and P. Santi. 2001. 'Proteoglycan arrays in the cochlear basement membrane', *Hear Res*, 157: 65-76.
- Twigg, S. M., and R. C. Baxter. 1998. 'Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit', *J Biol Chem*, 273: 6074-9.
- van Duyvenvoorde, H. A., P. A. van Setten, M. J. Walenkamp, J. van Doorn, J. Koenig, L. Gauguin, W. Oostdijk, C. A. Ruivenkamp, M. Losekoot, J. D. Wade, P. De Meyts, M. Karperien, C. Noordam, and J. M. Wit. 2010. 'Short stature associated with a novel heterozygous mutation in the insulin-like growth factor 1 gene', *J Clin Endocrinol Metab*, 95: E363-7.
- Varela-Nieto, I., S. Murillo-Cuesta, L. Rodriguez-de la Rosa, L. Lassatetta, and J. Contreras. 2013. 'IGF-I deficiency and hearing loss: molecular clues and clinical implications', *Pediatr Endocrinol Rev*, 10: 460-72.
- Vats, K. R., C. Ishwad, I. Singla, A. Vats, R. Ferrell, D. Ellis, M. Moritz, U. Surti, P. Jayakar, D. R. Frederick, and A. N. Vats. 2006. 'A locus for renal malformations including vesico-ureteric reflux on chromosome 13q33-34', *J Am Soc Nephrol*, 17: 1158-67.
- Villalpando, I., and V. Lopez-Olmos. 2003. 'Insulin-like growth factor I (IGF-I) regulates endocrine activity of the embryonic testis in the mouse', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 86: 151-8.
- Visel, A., C. Thaller, and G. Eichele. 2004. 'GenePaint.org: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo', *Nucleic Acids Res*, 32: D552-6.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 2003. 'Tumor necrosis factor signaling', *Cell Death Differ*, 10: 45-65.
- Walenkamp, M. J., S. M. de Muinck Keizer-Schrama, M. de Mos, M. E. Kalf, H. A. van Duyvenvoorde, A. M. Boot, S. G. Kant, S. J. White, M. Losekoot, J. T. Den Dunnen, M. Karperien, and J. M. Wit. 2008. 'Successful long-term growth hormone therapy in a

- girl with haploinsufficiency of the insulin-like growth factor-I receptor due to a terminal 15q26.2->qter deletion detected by multiplex ligation probe amplification', *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 2421-5.
- Walenkamp, M. J., M. Karperien, A. M. Pereira, Y. Hilhorst-Hofstee, J. van Doorn, J. W. Chen, S. Mohan, A. Denley, B. Forbes, H. A. van Duyvenvoorde, S. W. van Thiel, C. A. Sluimers, J. J. Bax, J. A. de Laat, M. B. Breuning, J. A. Romijn, and J. M. Wit. 2005. 'Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation', *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 2855-64.
- Walenkamp, M. J., H. J. van der Kamp, A. M. Pereira, S. G. Kant, H. A. van Duyvenvoorde, M. F. Kruithof, M. H. Breuning, J. A. Romijn, M. Karperien, and J. M. Wit. 2006. 'A variable degree of intrauterine and postnatal growth retardation in a family with a missense mutation in the insulin-like growth factor I receptor', *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 3062-70.
- Walenkamp, M. J., and J. M. Wit. 2007. 'Genetic disorders in the GH IGF-I axis in mouse and man', *Eur J Endocrinol*, 157 Suppl 1: S15-26.
- Walters, B. J., and J. Zuo. 2013. 'Postnatal development, maturation and aging in the mouse cochlea and their effects on hair cell regeneration', *Hear Res*, 297: 68-83.
- Wallborn, T., S. Wuller, J. Klammt, T. Kruis, J. Kratzsch, G. Schmidt, M. Schlicke, E. Muller, H. S. van de Leur, W. Kiess, and R. Pfaffle. 2010. 'A heterozygous mutation of the insulin-like growth factor-I receptor causes retention of the nascent protein in the endoplasmic reticulum and results in intrauterine and postnatal growth retardation', *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 2316-24.
- Wan, G., M. E. Gomez-Casati, A. R. Gigliello, M. C. Liberman, and G. Corfas. 2014. 'Neurotrophin-3 regulates ribbon synapse density in the cochlea and induces synapse regeneration after acoustic trauma', *Elife*, 3.
- Wang, I. C., Y. J. Chen, D. Hughes, V. Petrovic, M. L. Major, H. J. Park, Y. Tan, T. Ackerson, and R. H. Costa. 2005. 'Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase', *Mol Cell Biol*, 25: 10875-94.
- Watanabe, K., and T. Yagi. 2000. 'Expression of myeloperoxidase in the inner ear of cisplatin-treated guinea pigs', *Anticancer Drugs*, 11: 727-30.
- Welch, D., and P. J. Dawes. 2007. 'Childhood hearing is associated with growth rates in infancy and adolescence', *Pediatr Res*, 62: 495-8.
- Wertz, K., and B. G. Herrmann. 2000. 'Large-scale screen for genes involved in gonad development', *Mech Dev*, 98: 51-70.
- Wiechers, B., G. Gestwa, A. Mack, P. Carroll, H. P. Zenner, and M. Knipper. 1999. 'A changing pattern of brain-derived neurotrophic factor expression correlates with the rearrangement of fibers during cochlear development of rats and mice', *J Neurosci*, 19: 3033-42.
- Williams, T. M., M. E. Williams, R. Kuick, D. Misek, K. McDonagh, S. Hanash, and J. W. Innis. 2005. 'Candidate downstream regulated genes of HOX group 13 transcription factors with and without monomeric DNA binding capability', *Dev Biol*, 279: 462-80.
- Willott, J. F. 2006. 'Overview of methods for assessing the mouse auditory system', *Curr Protoc Neurosci*, Chapter 8: Unit8 21A.
- Wong-Riley, M. T., and J. C. Besharse. 2012. 'The kinesin superfamily protein KIF17: one protein with many functions', *Biomol Concepts*, 3: 267-82.
- Woods, K. A., C. Camacho-Hubner, M. O. Savage, and A. J. Clark. 1996. 'Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene', *N Engl J Med*, 335: 1363-7.
- Wright, T. J., R. Ladher, J. McWhirter, C. Murre, G. C. Schoenwolf, and S. L. Mansour. 2004. 'Mouse FGF15 is the ortholog of human and chick FGF19, but is not uniquely required for otic induction', *Dev Biol*, 269: 264-75.
- Yamamoto, K., T. A. Matsuoka, S. Kawashima, S. Takebe, F. Kubo, T. Miyatsuka, H. Kaneto, and I. Shimomura. 2013. 'A novel function of Onecut1 protein as a negative regulator of MafA gene expression', *J Biol Chem*, 288: 21648-58.

- Yamamoto, N., T. Nakagawa, and J. Ito. 2014. 'Application of insulin-like growth factor-1 in the treatment of inner ear disorders', *Front Pharmacol*, 5: 208.
- Yates, T., M. J. Davies, J. Henson, C. Edwardson, D. Webb, D. H. Bodicoat, M. Webb, P. Howard, J. A. Cooper, S. E. Humphries, K. Khunti, and P. Talmud. 2015. 'Effect of the PPAR γ 2 Pro12Ala Polymorphism on Associations of Physical Activity and Sedentary Time with Markers of Insulin Sensitivity in Those with an Elevated Risk of Type 2 Diabetes', *PLoS One*, 10: e0124062.
- Ye, H., A. X. Holterman, K. W. Yoo, R. R. Franks, and R. H. Costa. 1999. 'Premature expression of the winged helix transcription factor HFH-11B in regenerating mouse liver accelerates hepatocyte entry into S phase', *Mol Cell Biol*, 19: 8570-80.
- Yordy, B., M. C. Tal, K. Hayashi, O. Arojo, and A. Iwasaki. 2013. 'Autophagy and selective deployment of Atg proteins in antiviral defense', *Int Immunol*, 25: 1-10.
- Zhang, H., A. M. Ackermann, G. A. Gusarova, D. Lowe, X. Feng, U. G. Kopsombut, R. H. Costa, and M. Gannon. 2006. 'The FoxM1 transcription factor is required to maintain pancreatic beta-cell mass', *Mol Endocrinol*, 20: 1853-66.
- Zhang, Q., M. Rosenberg, G. Kugel, R. K. Agarwal, J. Phillips, and M. S. Kumar. 2003. 'Effect of nitrous oxide on intracellular events of GT1-7 GnRH-secreting neurons', *Anesth Prog*, 50: 53-61.
- Zheng, W., L. Huang, Z. B. Wei, D. Silvius, B. Tang, and P. X. Xu. 2003. 'The role of Six1 in mammalian auditory system development', *Development*, 130: 3989-4000.
- Zhu, W., I. Shiojima, Y. Ito, Z. Li, H. Ikeda, M. Yoshida, A. T. Naito, J. Nishi, H. Ueno, A. Umezawa, T. Minamino, T. Nagai, A. Kikuchi, M. Asashima, and I. Komuro. 2008. 'IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis', *Nature*, 454: 345-9.
- Zilberstein, Y., M. C. Liberman, and G. Corfas. 2012. 'Inner hair cells are not required for survival of spiral ganglion neurons in the adult cochlea', *J Neurosci*, 32: 405-10.

Anexo

	FC Array ¹	FC qRT-PCR ²	Función	Expresión en el oído interno
Proteínas de unión a calcio				
<i>S100g</i> (S100 calcium binding protein G)	-4,1	-1,4	Proteína de unión a calcio. La familia S100 participa en el ensamblaje de microtúbulos, extensión de neuritas, progresión del ciclo celular y proliferación celular.	Las proteínas S100 se expresan en estructuras del oído interno de muchas especies, incluyendo hombre, mono, rata y ratón (Coppens et al., 2001).
Adhesión celular				
<i>Cldn18</i> (Claudin 18)	-6,0	nd	Proteína integral de membrana que forma filamentos de unión en las células epiteliales.	En ratones adultos, la proteína se encuentra en el órgano de Corti, las células marginales de la estría vascular, membrana Reissner, limbo espiral y epitelio sensorial vestibular (Kitajiri et al., 2004).
Migración celular				
<i>Mash1</i> (Mammalian achaete-scute homolog 1) [<i>Ascl1</i> , <i>Hash1</i>]	2,9	2,4	Factor de transcripción bHLH. Participa en el desarrollo y diferenciación neural en la mayoría de las regiones del SNC y algunas del SNP. Familia altamente conservada en la evolución que está implicada en la diferenciación de las células ciliadas (<i>Atoh1</i>) y en la diferenciación de las neuronas sensoriales (<i>Neurog1</i> y <i>Neurod1</i>) (Fritsch et al., 2006).	nf
Resistencia a insulina				
<i>Remla</i> (Resistin like alpha) [<i>Fizz1</i>]	-4,7	-2,3	Citoquina con efectos mitogénicos, angiogénicos y vasoconstrictores.	nf
Transporte y canales de iones				
<i>Cacna1f</i> (calcium channel, voltage-dependent, alpha 1F subunit)	-2,1	-1,5	Canales de calcio sensibles a voltaje. El gen <i>Cacna1f</i> codifica la proteína Ca _v 1.4. El ratón mutante de <i>Cacna1f</i> presenta alteraciones en la función visual y en la retina con una gran pérdida de sinapsis de fotorreceptores (Mansergh et al., 2005).	nf
<i>Kcnd2</i> (potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2) [<i>Kv4.2</i>]	-1,3	-1,0	Es transportado por <i>Kif17</i> (Chu et al., 2006).	El gen <i>Kv4.2</i> y su proteína se expresan en las células ciliadas de pollo a P15 (Sokolowski et al., 2004). En el ratón, las neuronas del apex expresan mas canales Kv4.2, mientras que las de la base tienen mayores niveles de canales K(Ca), Kv1.1 y Kv3.1 (Adamson et al., 2002).

Gene	FC Array ¹	FC qRT-PCR ²	Función	Expresión en el oído interno
<i>Kcnmb1</i> (potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1) [<i>BKb1</i>]	-1,1	nd	Canales voltaje-activados por K ⁺ (BK). Son importantes en los potenciales de receptor de las células ciliadas de la cóclea.	Los BK, constituidos por una subunidad α y una β , son importantes en el proceso de transducción de señales de las CCI. Los ratones <i>BKbeta1</i> ^{-/-} no presentan alteraciones en la función auditiva ni en la estructura coclear, mientras que los <i>BKalfa</i> ^{-/-} sí (Langer et al., 2003; Ruttiger et al., 2004).
<i>Mlc1</i> (megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1 homolog - human)	1,3	nd	Proteína de membrana de función desconocida y con baja homología a los canales de potasio. <i>Mlc1</i> es el primer gen responsable de la leucoencefalopatía megalencefalia con quistes subcorticales. Esta enfermedad pediátrica es un trastorno neurológico autosómico recesivo caracterizado por macrocefalia, deterioro de las funciones motoras, ataxia cerebelosa y deterioro mental.	En el ratón, MLC1 tiene una localización postsináptica en las CCI y sus fibras aferentes (co-localización con calretinina). MLC1 se expresa en el GA, aunque pocas células son positivas al marcaje (Tejido et al., 2007). También se localiza en otros epitelios sensoriales como la retina.
Metabolismo lipídico				
<i>Alox12</i> (arachidonate 12-lipoxygenase)	-1,8	nd	Pertenece a la familia de la lipoxigenasas.	Su expresión está aumentada en las células del órgano de Corti de ratones tratados con cisplatino (Previati et al., 2000).
Transporte de neurotransmisores y metabolismo				
<i>Slc5a7</i> (solute carrier family 5, member 7) [<i>ChT1</i>]	-2,2	nd	Transportador de colina de alta afinidad implicado en la síntesis de la acetilcolina.	<i>Slc5a7</i> se expresa en terminales eferentes de las células ciliadas de roedores durante el desarrollo (Bergeron et al., 2005).
<i>Slc18a3</i> (solute carrier family 18, member 3) [<i>VAT</i> ; <i>VACHT</i>]	-1,7	nd	Participa en el transporte de acetilcolina en las vesículas sinápticas.	En rata y ratón, se expresa en los terminales eferentes de las células ciliadas durante el desarrollo (Bergeron et al., 2005).
Desarrollo de órganos				
<i>Fgf15</i> (Fibroblast growth factor 15)	3,6	1,0	Factor de crecimiento. Ortólogo en ratón del gen <i>FGF19</i> en el hombre. Durante el periodo embrionario regula la división celular y sus patrones en regiones específicas del cerebro, médula espinal y órganos sensoriales. Es un inductor de la placoda ótica (Ladher et al., 2000).	En el pollo se expresa durante desarrollo en el epitelio sensorial y las neuronas del ganglio coclear y vestibular (Sánchez-Calderón et al., 2007).

Gene	FC Array ¹	FC qRT-PCR ²	Función	Expresión en el oído interno
Percepción de sonido y luz				
<i>Six6</i> (sine oculis-related homeobox 6 homolog)	2,9	5,8	Factor de transcripción. Participa en el desarrollo del ojo. <i>Six6</i> regula la proliferación actuando sobre inhibidores de quinasa dependientes de ciclina, incluyendo el promotor de p27Kip1.	El ratón <i>Six1</i> ^{-/-} presenta alteraciones en el desarrollo temprano del oído interno y malformaciones en el oído externo, medio e interno (Zheng et al., 2003). La sobre-expresión de este gen se ha utilizado para reprogramar células epiteliales no sensoriales de la cóclea a neuronas funcionales (Nishimura et al., 2014)
<i>Tub</i> (tubby candidate gene)	-2,3	nv	Regulador de la transcripción unido a la membrana que se transporta al núcleo en respuesta a la activación de la proteína G dependiente de la hidrólisis del fosfoinositol.	El ratón mutante homocigoto de <i>Tubby</i> (tub/tub) presenta pérdida auditiva progresiva de inicio precoz y degeneración de los fotorreceptores (Carroll et al., 2004). Tub es un regulador de la señalización de leptina e insulina a nivel hipotalámico con importantes efectos en el metabolismo (Prada et al., 2013).
<i>Rplh</i> (retinitis pigmentosa 1 homolog-human)	2,1	3,0	Proteína específica del fotorreceptor. Las mutaciones de <i>RPI</i> en humanos son una causa común de retinitis pigmentosa. El síndrome de Usher en el hombre es una condición hereditaria caracterizada por el deterioro auditivo y pérdida progresiva de la visión.	nf
<i>Ush1c</i> (Usher syndrome 1C homolog-human) [<i>Harmonin</i>]	1,4	0,7	Proteína de los estereocilios. Junto con la cadherina 23 y la miosina VIIA, es importante para que se formen estereocilios plenamente funcionales. Las mutaciones en el gen de la <i>harmonina</i> causan Síndrome de Usher tipo I y subtipo C, caracterizado por el deterioro auditivo y retinitis (Boeda et al., 2002).	Los estereocilios de las células ciliadas expresan <i>harmonina</i> en el hombre y en el ratón (Boeda et al., 2002). El modelo de ratón <i>knock-in</i> para <i>Ush1c</i> reproduce el síndrome de enfermedad humana con sordera y degeneración retiniana (Lentz et al., 2010).
<i>Rorb</i> (RAR-related orphan receptor beta)	1,66	nd	Factor de transcripción. ROR-beta es un receptor nuclear huérfano, que forma una subfamilia con los receptores nucleares ROR-alfa. Los ratones <i>Rorb</i> ^{-/-} son ciegos, aunque su ritmo circadiano de actividad sigue influido por ciclos de luz-oscuridad (Andre et al., 1998).	nf
Transducción de señales ligada al receptor				
<i>Fibp</i> (Fibroblast growth factor intracellular binding protein)	-3,5	-0,7	Proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos.	nf

Gene	FC Array ¹	FC qRT-PCR ²	Función	Expresión en el oído interno
Transporte de vesículas				
<i>Kif17</i> (Kinesin family member 17)	-2,9	-0,9	Proteína motora. Transporta vesículas que contienen receptores NR2B y los canales Kv4.2 a lo largo de los microtúbulos desde la célula a las dendritas de las neuronas (Chu et al., 2006, Wong-Riley y Besharse, 2012)	nf
<i>Vamp1</i> (vesicle-associated membrane protein 1)	-2,0	nd	Proteína de membrana. Involucrada en la fusión de las vesículas de transporte a su membrana.	<i>Vamp1</i> se encuentra en las células ciliadas del órgano de Corti de algunos roedores concentradas principalmente en los dos polos celulares (base-sinapsis aferente y apex-estereocilios) (Safieddine y Wenthold, 1999; Safieddine et al., 2002).
Transporte de vitaminas				
<i>Slc19a2</i> (solute carrier family 19, member 2)	-1,4	-0,7	Transportador de alta afinidad de tiamina. Las mutaciones <i>Slc19a2</i> conducen a un síndrome clínico conocido como anemia megaloblástica sensible a tiamina y caracterizado por anemia, diabetes e hipoacusia neurosensorial.	Expresión selectiva en las células ciliadas internas, que desaparece en el ratón <i>Slc19a2</i> ^{-/-} (Fleming et al., 2001; Liberman et al., 2006).
Metabolismo de xenobióticos				
<i>Akr1c13</i> (Aldo-keto reductase family 1, member C13)	3,1	1,3	Reductasa. Cataliza la reducción de los derivados del ácido glucónico.	<i>Akr1c1</i> se relaciona con pérdida auditiva progresiva asociada a la edad en la cóclea de ratones nulos <i>sh2/sh2</i> (Gong et al., 2006).
Regulación de la transcripción				
<i>Esrrb</i> (estrogen related receptor, betav)	-1,9	nd	Receptores nucleares huérfanos. Estrechamente relacionados con los receptores de estrógeno. Estos receptores huérfanos se unen a ligandos habituales de la respuesta a estrógeno interfiriendo así en la ruta de señalización de los receptores de estrógeno.	Se expresa y controla el desarrollo de las células productoras de la endolinfa del oído interno. Las mutaciones del <i>Esrrb</i> conducen a una hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva -DFNB35- (Chen y Nathans, 2007; Collin et al., 2008).
Metabolismo del sulfato				
<i>Papss2</i> (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2)	-1	nd	Enzima con actividad doble ATP sulfurilasa y APS quinasa. En los mamíferos, el PAP es la única fuente de sulfato; APS parece ser sólo un intermediario en la vía de activación del sulfato. Puede tener un papel importante en la formación del esqueleto durante el crecimiento postnatal.	It is expressed in the otic vesicle at E12.5 in the mouse. Se expresa en la vesícula ótica del ratón a E12,5 (Stelzer et al., 2007).

Gene	FC Array ¹	FC qRT-PCR ²	Función	Expresión en el oído interno
Respuesta a estrés				
<i>Hspb1</i> (heat shock protein 1) [<i>Hsp27</i>]	-1,1	nd	Chaperona molecular inducible por estrés y reguladora de la polimerización de la actina.	En la rata, <i>Hsp27</i> se localiza en las células ciliadas externas, algunos tipos de fibroblastos, limbo espiral y membrana de Reissner. La presencia de <i>Hsp27</i> en fibroblastos ricos en actina y en las células ciliadas externas sugiere un papel crucial en la regulación y el mantenimiento del citoesqueleto de actina en esas células. Niveles constitutivos elevados de <i>Hsp27</i> pueden proporcionar un mecanismo para la protección de estas células contra el estrés ambientales (Leonova et al., 2002).
Ruta de señalización del receptor de insulina				
<i>Insr</i> (insulin receptor)	-1,1	nd	El receptor de la insulina es un tetrámero constituido por dos subunidades α y otras dos 2β . Las subunidades α y β son codificadas por un único gen y se unen por enlaces disulfuro.	En xenopus la expresión de <i>Insr</i> está restringida a las regiones de origen ectodérmico y mesodérmico, en particular al encéfalo, vesículas óticas, vesículas óticas, somitas y pronefros (Groigno et al., 1999).
Transducción de señales				
<i>Camk4</i> (calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV)	-1,3	nd	La vía de señalización de CaMKIV-CREB es crucial para la función y diferenciación de los osteoclastos.	En el jerbo adulto, se ha visto expresión de <i>Camk4</i> en los bordes laterales de las CCE (Koyama et al., 1995) y en el ganglio espiral (Bok et al., 2007).
Respuesta inmune / respuesta inflamatoria				
<i>Ccl11</i> (small chemokine (C-C motif) ligand 11) [<i>Scya11</i> ; <i>eotaxin</i>]	-1,5	nd	Quimioquina. En respuesta a la presencia de alérgenos, esta proteína promueve directamente la acumulación de eosinófilos (una característica prominente de las reacciones inflamatorias alérgicas), pero no de linfocitos, macrófagos o neutrófilos.	En la otitis media eosinofílica algunas quimioquinas, como eotaxina, se producen en el oído medio (Iino et al., 2005).
<i>Il13ral</i> (interleukin 13 receptor, alpha 1)	1,9	nd	Actividad del receptor de citoquina. Junto con IL4R- α forman un receptor funcional para IL13 y IL4 y puede que esta sea la ruta principal por la cual las células no hematopoyéticas responden a estas citoquinas.	nf

Gene	FC Array ¹	FC qRT-PCR ²	Función	Expresión en el oído interno
Respuesta a estrés oxidativo				
<i>Mpo</i> (myeloperoxidase)	1,2	nd	Hemoproteína lisosomal localizada en los gránulos azurófilos de los leucocitos polimorfonucleares y monocitos. En respuesta a la estimulación, MPO se activa en forma de un intermediario transitorio con potentes propiedades oxidantes antimicrobianas (Goedken et al., 2007).	Tras tres días de aplicación de cisplatino, se pudo detectar MPO en la pared lateral, el órgano de Corti y células del epitelio sensorial. Estos resultados sugieren que MPO y las especies reactivas de oxígeno están implicadas en la disfunción del oído interno después de la aplicación de cisplatino (Watanabe y Yabi, 2000).
Progresión del ciclo celular				
<i>FoxM1</i> (Forkhead box M1)	1.5	1,2	Factor de transcripción. FoxM1 es importante en la regulación del ciclo celular y en la reparación del daño del ADN (Wang et al., 2005; Zhang et al., 2006; Tan et al., 2007).	nf
<i>FoxG1</i> (Forkhead box G1)	$-8.9 \cdot 10^{-5}$	0.15	Factor de transcripción. La función específica de este gen aún no ha sido determinada, aunque se expresa durante el desarrollo del telencéfalo promoviendo la proliferación de progenitores y suprimiendo la neurogénesis prematura.	<i>Foxg1</i> se expresa en la mayoría de los tipos celulares del oído interno del ratón adulto. Los mutantes de <i>Foxg1</i> en el ratón presentan defectos morfológicos e histológicos en el oído interno, entre ellos acortamiento de la cóclea y defectos en la inervación en inervación coclear y vestibular (Pauley et al., 2006).
<i>Incenp</i> (Inner centromere protein)	-2.2	nd	INCENP es una proteína del centrómero y forma parte de un complejo proteico regulador importante de la segregación cromosómica y la citocinesis. INCENP interactúa con los otros tres miembros del complejo, Aurora B, Survivina y Borealina (Ruchaud et al., 2007; Carmena et al., 2012).	nf

Tabla 1. Genes expresados de forma diferencial en la cóclea del ratón deficiente en *Igfl* clasificados en función a sus procesos biológicos asociados determinados por *Gene Ontology* (GO).

Los genes se seleccionaron siguiendo distintos criterios: i) su expresión en oído interno; ii) relación con sordera; iii) función biológica asociada determinada mediante los programas PHANTER y FatiGO y iv) nivel de expresión comparado en los arrays de cóclea de los ratones *Igfl^{+/+}* e *Igfl^{-/-}* calculado mediante el software *multi-mgMOS*. Abreviaturas: nd, no determinado mediante RT-qPCR; nf, no descrito previamente en la literatura.

¹ *Fold change*, dato procedente de los arrays de cóclea.

² *Fold change*, dato procedente de la RT-qPCR. nd, no determinado; nv, no verificado.

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
<i>Igf1</i>					
E10,5	Sistema genitourinario, mesonefros	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Harding et al. 2011)
E11,5	Cerebro, cerebelo y futura médula espinal	Detectado	Disperso	<i>In situ</i>	(Magdaleno et al. 2006)
E13,5	Sistema reproductor masculino, vejiga primaria, testículos, sistema urinario,	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Harding et al. 2011)
	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano, Xuan, and Kelley 2011)
E14,5	Cerebro, cerebelo y futura médula espinal	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Jensen et al. 2004)
	Pulmón	Detectado	No especificado	IHQ	(Inanlou and Kablar 2005)
	Glándula adrenal, vejiga, Sistema cardiovascular, vasos sanguíneos, pulmón metanefros, esófago, estómago, retina, oído medio, cerebelo, bulbo raquídeo y médula espinal	Fuerte	Restringido	<i>In situ</i>	(Visel, Thaller, and Eichele 2004)
	Diencéfalo, corazón, páncreas, lengua, laringe, uretra, oído interno, diencéfalo e hipotálamo	Débil	Restringido	<i>In situ</i>	
E15,5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	Memoria de tesis de L. Rodríguez de la Rosa
E15,5	Retina, cerebelo, hipotálamo, neocórtex y médula espinal	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Magdaleno et al. 2006)
	Uretra	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Harding et al. 2011)
E16,5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano, Xuan, and Kelley 2011)
	Cerebro	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Jensen et al. 2004)
	Pulmón	Detectado	No especificado	IHQ	(Inanlou and Kablar 2005)
E18,5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	Memoria de tesis de L. Rodríguez de la Rosa
E18,5	Pulmón y epitelio pulmonar	Débil	No especificado	IHQ	(Baguma-Nibasheka and Kablar 2008; Inanlou and Kablar 2005)

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
E12,5-E17,5	Testículos	Detectado		<i>Western blotting</i>	(Villalpando and Lopez-Olmos 2003)
E12,5-E21,5	Plexo coroideo	Detectado		<i>Western blotting</i>	(Salehi et al. 2009)
P0	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano, Xuan, and Kelley 2011)
P5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	Memoria de tesis de L. Rodríguez de la Rosa
P7	Retina, córtex cerebral, plexo coroideo, hipotálamo, hipocampo, meninges, tálamo y médula espinal	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Magdaleno et al. 2006)
	Tronco cerebral, cerebelo y bulbo olfatorio	Fuerte	Restringido		
P42	Retina, tronco cerebral, cortex cerebral, cerebelo, plexo coroidal, meninges, tálamo y bulbo olfatorio	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	
<i>Igf2</i>					
E5,5	Ectodermo extraembrionario y cono ectoplacentario	Fuerte	No especificado	<i>In situ</i>	
E6,5-E7	Ectodermo y exodermo extraembrionario, endodermo parietal, cono ectoplacentario, trofoectodermo mural y células gigantes del trofoblasto	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	
E7,5	Membrana alantoides, mesénquima del saco vitelino y de la cabeza, endodermo, mesodermo y corazón	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Lee, Pintar, and Efstratiadis 1990)
E8	Membrana alantoides, cono ectoplacentario, mesénquima de la cabeza y corazón	Fuerte	No especificado	<i>In situ</i>	
	Membrana alantoides, mesénquima del saco vitelino y de la cabeza, corazón	Detectado	No especificado	IHQ	
	Somatopleura, esplacnopleura y mesénquima de la cabeza	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
E10,5- E11,5	Bolsa de Rathke	Fuerte	Restringido	<i>In situ</i>	(Holley, Hall, and Mellon 2002)
E11,5	Diencefalo	Muy fuerte	No restringido	<i>In situ</i>	(Shimogori et al. 2010)
	Telencefalo	Fuerte	Disperso	<i>In situ</i>	
E12,5	Hipotálamo	Muy fuerte	No restringido	<i>In situ</i>	
	Cortex cerebral, diencefalo, eminencia ganglionar e hipotálamo	Fuerte	Disperso	<i>In situ</i>	
E12,5	Ojo, mesénquima de la cabeza, extremidades, bolsa de Rathke y mesénquima	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Conover et al. 2004; Holley, Hall, and Mellon 2002; Ngo-Muller and Muneoka 2000; Trimarchi, Cho, and Cepko 2009)
E13,5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano, Xuan, and Kelley 2011)
	Pulmón, bulbo raquídeo, metencefalo, faja pectoral y lengua, gónadas	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Davies et al. 2002)
E14	Corazón y musculatura vertebral	Detectado	No especificado	IHQ	(Lee, Pintar, and Efstratiadis 1990)
E14,5	Gonadas y retina	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Rowan et al. 2004; Thut et al. 2001; Wertz and Herrmann 2000)
	Hipotálamo	Muy fuerte	No restringido	<i>In situ</i>	(Shimogori et al. 2010)
	Sistema reproductor, sistema urinario, lengua, mesénquima, médula espinal, plexo coroideo, diencefalo y glándula pituitaria	Fuerte	Restringido	<i>In situ</i>	(Diez-Roux et al. 2011; Holley, Hall, and Mellon 2002; Visel, Thaller, and Eichele 2004)
E14,5	Meninges	Fuerte	Ubicuo	<i>In situ</i>	(Visel, Thaller, and Eichele 2004)
	Cerebro, neocortex, colículo superior, telencefalo y tálamo	Fuerte	Disperso	<i>In situ</i>	
E14,5	Cerebro	Fuerte	Células específicas	<i>In situ</i>	(Diez-Roux et al. 2011)
	Vejiga, uretra, ureter, metanefros, sistema cardiovascular, esófago, estómago, corazón, primordio de hueso facial, intestino, hígado, pulmón, laringe, faringe, nariz, ojo, hipocampo, hipotálamo, colículo inferior, bulbo raquídeo y médula espinal	Moderado	Restringido	<i>In situ</i>	(Visel, Thaller, and Eichele 2004)

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
E16,5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano, Xuan, and Kelley 2011)
	Hipotálamo	Muy fuerte	Poco uniforme	<i>In situ</i>	(Shimogori et al. 2010)
	Diencefalo, córtex cerebral y tálamo	Fuerte	Disperso	<i>In situ</i>	
	Ojo, nervio óptico y esclerótica	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Thut et al. 2001; Trimarchi, Cho, and Cepko 2009)
E17,5	Retina	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Rowan et al. 2004)
E18,5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano, Xuan, and Kelley 2011)
	Hígado, paladar, músculo esquelético, esqueleto y esclerótica	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Smith et al. 2000; Thut et al. 2001)
P2	Esclerótica	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Thut et al. 2001)
P6	Tronco cerebral / meninges	Detectado	Restringido / no especificado	<i>In situ</i>	(Blackshaw et al. 2004)
P0	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano, Xuan, and Kelley 2011)
P0-P10	Retina	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Blackshaw et al. 2004)
<i>Ins1</i>					
E9,5	Primordio del páncreas	Detectado	No especificado / células específicas	IHQ	(Chiang and Flanagan 1996; Deltour et al. 1993)
E10,5-E11	Primordio del páncreas	Detectado	Células específicas	IHQ	(Ahlgren, Jonsson, and Edlund 1996; Kedeas et al. 2007)
E11,5	Primordio del páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Deltour et al. 1993; Prasad et al. 2011)
E12,5	Páncreas	Detectado	Restringido	IHQ	
E13,5	Páncreas	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Arima et al. 2001)
E13,5-E14,5	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Prasad et al. 2011)
E14,5	Páncreas	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Hoffman et al. 2008)
E15	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Dichmann, Yassin, and Serup 2006; Kedeas et al. 2007)

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
E15,5	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Asayesh et al. 2005; Prasadán et al. 2011; Pulkkinen et al. 2003; Schwitzgebel et al. 2000; Soyer et al. 2010)
E16	Conducto biliar común	Detectado	Células específicas	IHQ	(Sumazaki et al. 2004)
E16,5	Páncreas	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Krapp et al. 1996)
	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Joglekar et al. 2007)
E17,5	Páncreas	Detectado	Restringido	IHQ	(Asayesh et al. 2005; Bhushan et al. 2001; Joglekar et al. 2007; Nammo et al. 2008)
E18,5	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Dichmann, Yassin, and Serup 2006; Lioubinski et al. 2003; Prasadán et al. 2011; Pulkkinen et al. 2003; Schwitzgebel et al. 2000)
	Islotes de Langerhans	Detectado	Restringido	IHQ	(Goto et al. 2007; Kawahira et al. 2003)
E19	Islotes de Langerhans / páncreas	Detectado	Restringido / no especificado	IHQ	(Dichmann, Yassin, and Serup 2006)
P1	Islotes de Langerhans	Detectado	Restringido / no especificado	IHQ	(Joglekar et al. 2007; Thorens et al. 2015)
	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Asayesh et al. 2005; Kedeas et al. 2007)
P10	Islotes de Langerhans	Detectado	No especificado	IHQ	(Nammo et al. 2008)
Postnatal	Islotes de Langerhans	Detectado	Restringido	IHQ	(Thorens et al. 2015)
Postnatal adulto	Islotes de Langerhans	Detectado	No especificado	IHQ	(Soyer et al. 2010)
	Pancreas e islotes de Langerhans	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Krapp et al. 1996)
Postnatal 2 meses	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Asayesh et al. 2005)

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
Postnatal 3-4 meses	Islotes de Langerhans	Detectado	No especificado	IHQ	(Kedees et al. 2007; Yamamoto et al. 2013)
Postnatal 6 meses	Islote pancreático	Detectado	No especificado	IHQ	(Collin et al. 2005)
<i>Ins2</i>					
E9,5	Primordio del páncreas	Detectado	Células específicas	<i>In situ</i>	(Lammert, Brown, and Melton 2000)
	Primordio del páncreas	Detectado	No especificado / células específicas	IHQ	(Chiang and Flanagan 1996; Deltour et al. 1993)
E10,5	Primordio del páncreas	Detectado	Células específicas	IHQ	(Ahlgren, Jonsson, and Edlund 1996; Kedees et al. 2007)
E11	Primordio del páncreas	Detectado	Células específicas	IHQ	(Kedees et al. 2007)
E11,5	Primordio del páncreas	Detectado	No especificado / células específicas	IHQ	(Deltour et al. 1993; Prasad et al. 2011)
E12,5	Saco vitelino	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(McGrath and Palis 1997)
	Páncreas	Detectado	Restringido	IHQ	(Asayesh et al. 2005; Deltour et al. 1993)
E13,5- E14,5	Páncreas	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Arima et al. 2001)
E13,5- E14,5	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Prasad et al. 2011)
E14,5	Páncreas	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Hoffman et al. 2008)
E15	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Dichmann, Yassin, and Serup 2006; Kedees et al. 2007)
E14,5	Páncreas	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Lammert, Brown, and Melton 2000)

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
E15,5-E16	Conducto biliar	Detectado	No especificado	IHQ	(Sumazaki et al. 2004)
	Conducto pancreático	Detectado	Células específicas	IHQ	(Herrera et al. 1991)
E15,5	Páncreas	Detectado	No especificado / restringido	IHQ	(Asayesh et al. 2005; Joglekar et al. 2007; Prasad et al. 2011; Pulkkinen et al. 2003; Schwitzgebel et al. 2000; Soyer et al. 2010)
E16,5	Páncreas	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Krapp et al. 1996)
	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Joglekar et al. 2007)
E17,5	Páncreas	Detectado	Restringido	IHQ	(Asayesh et al. 2005; Bhushan et al. 2001; Nammo et al. 2008)
E18,5	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Dichmann, Yassin, and Serup 2006; Lioubinski et al. 2003; Prasad et al. 2011; Pulkkinen et al. 2003; Schwitzgebel et al. 2000)
	Islotes de Langerhans	Detectado	Restringido	IHQ	(Goto et al. 2007; Kawahira et al. 2003)
	Islotes de Langerhans	Detectado	Restringido	IHQ	(Dichmann, Yassin, and Serup 2006)
P1	Islotes de Langerhans	Detectado	Restringido / no especificado	IHQ	(Joglekar et al. 2007; Thorens et al. 2015)
	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Asayesh et al. 2005; Kedeas et al. 2007)
Postnatal	Islotes de Langerhans	Detectado	Restringido	IHQ	(Thorens et al. 2015)
P10	Islotes de Langerhans	Detectado	No especificado	IHQ	(Nammo et al. 2008)

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
Postnatal adulto	Islotes de Langerhans	Detectado	No especificado	IHQ	(Chiang and Flanagan 1996; Soyer et al. 2010)
	Páncreas e islotes de Langerhans	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Krapp et al. 1996)
	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Asayesh et al. 2005; Lioubinski et al. 2003)
Postnatal 2 meses	Páncreas	Detectado	No especificado	IHQ	(Asayesh et al. 2005)
Postnatal 3-4 meses	Islotes de Langerhans	Detectado	No especificado	IHQ	(Kedees et al. 2007; Yamamoto et al. 2013)
Postnatal 6 meses	Islote pancreático	Detectado	No especificado	IHQ	(Collin et al. 2005)
<i>Igflr</i>					
E3-E3,5	Estadio de mórula y blastocisto	Detectado		RT-qPCR	(Rappolee et al. 1992)
E4,5	Estadio de blastocisto	Detectado		RT-qPCR	(Telford et al. 1990)
E7,5	Decidua	Detectado		RT-qPCR	
E7,5-E9,5	Embrión	Detectado		RT-qPCR	(Lopez-Garcia et al. 2008; Rappolee et al. 1992; Telford et al. 1990)
E11,5	Tercera bolsa branquial	Detectado		RT-qPCR	(Sultana et al. 2009)
	Pulmón	Detectado		RT-qPCR	(Nagata et al. 2007)
E12,5-E14,5	Primordio mandibular (E12,5) y mandíbula (E13,5-E14,5)	Detectado		RT-qPCR	(Caton, Bringas, and Zeichner-David 2005)
E13,5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> RT-qPCR	(Okano, Xuan, and Kelley 2011)
E15,5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> RT-qPCR	Memoria de tesis de L. Rodríguez de la Rosa
E15,5-E18,5	Molar del maxilar inferior	Detectado		RT-qPCR	(Caton, Bringas, and Zeichner-David 2005)
E16,5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> RT-qPCR	(Okano, Xuan, and Kelley 2011)
E18,5	Pulmón	Detectado		RT-qPCR	(Moreno-Barriuso et al. 2006)
P0	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> RT-qPCR	(Okano, Xuan, and Kelley 2011)

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
E18,5; P5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> RT-qPCR	Memoria de tesis de L. Rodríguez de la Rosa
Postnatal temprano	Molar	Detectado		RT-qPCR	(Caton, Bringas, and Zeichner-David 2005)
Postnatal 6-8 semanas	Colon ascendente y descendente, vejiga, metanefros, cervix uterino, testículos, epidídimo, esófago, ileon, duodeno, yeyuno, fémur, glándula mamaria, pulmón, ojo, hipófisis, bulbo olfatorio, cerebro, cerebelo, córtex e hipocampo	Detectado		RT-qPCR	(Telford et al. 1990)
<i>Insr</i>					
E3,5- E4,5	Estadio de blastocisto	Detectado		RT-qPCR	(Rappolee et al. 1992; Telford et al. 1990)
E7,5- E9,5	Embrión; decidua (E7,5)	Detectado		RT-qPCR	(Telford et al. 1990)
E14,5	Glándula adrenal	Débil	Restringido	<i>In situ</i>	(Diez-Roux et al. 2011)
E13,5; E15,5; E18,5; postnatal adulto	Hígado	Detectado		RT-qPCR	(Liang et al. 2010)
<i>Igfbp1</i>					
E14,5	Lóbulo hepático derecho Lóbulo hepático izquierdo	Moderada Fuerte	Restringido	<i>In situ</i>	(Diez-Roux et al. 2011)
<i>Igfbp2</i>					
E11,5	Mesencéfalo Diencefalo, telencefalo, cerebro, futura médula espinal	Fuerte Detectado	Restringido No especificado	<i>In situ</i> <i>In situ</i>	(Magdaleno et al. 2006)
E11,5- E12,5	Capa ventricular del diencefalo	Fuerte	Poco uniforme	<i>In situ</i>	(Shimogori et al. 2010)
E12,5	Capa ventricular del córtex, tálamo y diencefalo Capa ventricular del córtex Capa ventricular del hipotálamo	Muy fuerte Muy fuerte Fuerte	No especificado No especificado Poco uniforme	<i>In situ</i> <i>In situ</i> <i>In situ</i>	(Shimogori et al. 2010)
E13,5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano and Kelley 2013)
E13,5	Aparato urinario, aparato reproductor Mesonefros, metanefros, aparato reproductor y urinario	Detectado Detectado	No especificado Restringido / no especificado	<i>In situ</i> <i>In situ</i>	(Harding et al. 2011) (Combes et al. 2009; Harding et al. 2011)

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
E14,5	Capa ventricular del córtex, tálamo e hipotálamo	Fuerte	No especificado	<i>In situ</i>	(Shimogori et al. 2010)
E15,5	Retina, cerebelo, eminencia ganglionar, cerebro, neocórtex, hipotálamo, bulbo olfatorio y médula espinal	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Magdaleno et al. 2006)
E16,5	Capa ventricular del hipotálamo	Fuerte	No restringido	<i>In situ</i>	(Shimogori et al. 2010)
E16,5; P0	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano and Kelley 2013)
E14,5; E16,5; E18,5 y P2	Cornea	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Thut et al. 2001)
P7	Meninges, plexo coroideo y bulbo olfatorio	Fuerte	Restringido	<i>In situ</i>	(Magdaleno et al. 2006)
	Amígdala, cortex cerebral, hipocampo e hipotálamo	Detectado	Generalizado	<i>In situ</i>	
	Retina, tronco del encéfalo, cerebelo, mesencéfalo, tálamo y médula espinal	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	
P42	Meninges y plexo coroideo	Fuerte	Restringido	<i>In situ</i>	
	Amígdala, tronco del encéfalo, córtex cerebral, hipocampo, bulbo olfatorio, tálamo, hipotálamo y médula espinal	Detectado	Generalizado	<i>In situ</i>	
	Retina y cerebelo	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	
<i>Igfbp3</i>					
E7,5- E8,5	Endodermo embrionario	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Tamplin et al. 2008)
E13	Cerebro, plexo coroideo y telencéfalo	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Easterday et al. 2003)
E13,5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano and Kelley 2013)
E14,5	Gónadas	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Wertz and Herrmann 2000)
E16,5; P0	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano and Kelley 2013)
E17; P1	Cerebro y plexo coroideo	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Easterday et al. 2003)
	Telencéfalo		Restringido		
P1	Córtex cerebral	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
<i>Igfbp4</i>					
E9,5	Arco branquial y primordio hepático	Fuerte	No especificado	<i>In situ</i>	(Zhu et al. 2008)
E12,5	Regiones interdigitales Mano	Detectado	No especificado Restringido	<i>In situ</i>	(Williams et al. 2005)
E12,5	Mesénquima	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Conover et al. 2004)
E13,5; E16,5; P0	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano and Kelley 2013)
<i>Igfbp5</i>					
E8	Embrión, notocorda y somitas	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Tamplin, Cox, and Rossant 2011)
E8,5-E9	Embrión, notocorda y somitas	Detectado	Generalizado (embrión) / No especificado	<i>In situ</i>	(Tamplin, Cox, and Rossant 2011; Tamplin et al. 2008)
E8,25; E9,5	Embrión y endodermo embrionario	Fuerte	Restringido (embrión) / No especificado	<i>In situ</i>	(Sherwood et al. 2007)
E11,5	Diencéfalo y futura médula espinal	Fuerte	Restringido	<i>In situ</i>	(Magdaleno et al. 2006)
	Diencéfalo, mesencéfalo, telencéfalo y cerebelo	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Magdaleno et al. 2006; Shimogori et al. 2010)
	Capa ventricular del telencéfalo	Moderado	No restringido	<i>In situ</i>	(Shimogori et al. 2010)
E12,5	Hipotálamo y epitelio de la retina	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Shimogori et al. 2010; Trimarchi, Cho, and Cepko 2009)
E13,5;	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano and Kelley 2013)
E12,5; E14,5	Capa ventricular de hipotálamo y tálamo	Fuerte	No restringido	<i>In situ</i>	(Shimogori et al. 2010)
	Eminencia ganglionar	Moderado	No restringido	<i>In situ</i>	
E14,5	Mesénquima pancreático y glándula pituitaria	Fuerte	Restringido	<i>In situ</i>	(Hoffman et al. 2008)
	Hipotálamo	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Shimogori et al. 2010)
	Cerebro, cerebelo y capa ventricular del córtex	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Jensen et al. 2004; Kawaguchi et al. 2008; Machold, Klein, and Fishell 2011)
E15,5	Bulbo olfatorio y médula espinal	Fuerte	Restringido	<i>In situ</i>	(Magdaleno et al. 2006)
	Retina, cerebelo, hipocampo, hipotálamo, mesencéfalo y neocórtex	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
	Capa nuclear de la retina e hipotálamo	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Shimogori et al. 2010; Trimarchi, Cho, and Cepko 2009)
E16,5	Cerebro	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Jensen et al. 2004; Shimogori et al. 2010; Trimarchi, Cho, and Cepko 2009)
	Capa ventricular de hipotálamo y tálamo, eminencia ganglionar	Moderado	No restringido	<i>In situ</i>	(Shimogori et al. 2010)
E16,5	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano and Kelley 2013)
E18,5	Adenohipófisis, corteza renal y arteriolas del corpúsculo renal	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Holley, Hall, and Mellon 2002; Takemoto et al. 2006)
P0	Oído interno	Detectado	Restringido	<i>In situ</i> ; RT-qPCR	(Okano and Kelley 2013)
P0	Epitelio de la retina	Detectado	No especificado	<i>In situ</i>	(Trimarchi, Cho, and Cepko 2009)
	Tronco del encéfalo, cerebelo, córtex cerebral, meninges y bulbo olfatorio	Fuerte	Restringido	<i>In situ</i>	
	Meninges, plexo coroideo y bulbo olfatorio	Fuerte	Restringido	<i>In situ</i>	
P7	Retina y amígdala, plexo coroideo, córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo, tálamo, mesencéfalo y médula espinal	Detectado	Generalizado	<i>In situ</i>	
	Retina, tronco del encéfalo, cerebelo, mesencéfalo, tálamo y médula espinal	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	(Magdaleno et al. 2006)
	Tronco del encéfalo, cerebelo, hipocampo, meninges y bulbo olfatorio	Fuerte	Restringido	<i>In situ</i>	
P42	Amígdala, córtex cerebral, hipotálamo, tálamo, mesencéfalo y médula espinal	Detectado	Generalizado	<i>In situ</i>	
	Retina y plexo coroideo	Detectado	Restringido	<i>In situ</i>	

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
<i>Igfbp6</i>					
E16	Epitelio del seno urogenital	Fuerte	No especificado	IHQ	(Lipinski et al. 2005)
	Mesénquima del seno urogenital	Detectado	Difuso	IHQ	
P1	Epitelio de la glándula prostática	Fuerte	No especificado	IHQ	
	Glándula prostática	Detectado	Restringido	IHQ	
	Mesénquima de la glándula prostática	Detectado	Difuso	IHQ	
P5	Glándula prostática	Fuerte	Restringido	IHQ	
	Epitelio de la uretra prostática	Fuerte	No especificado	IHQ	
	Estroma de la glándula prostática	Detectado	Difuso	IHQ	
Postnatal (adulto)	Glándula prostática	Detectado	No especificado	IHQ	
<i>Irs1</i>					
E3,5	Blastocisto	Detectado		RT-qPCR	(Puscheck et al. 1998)
E12,5	Placenta	Detectado		RT-qPCR	(Sferruzzi-Perri et al. 2009)
E15-E16	Embrión	Detectado		RT-qPCR	
Postnatal 6-8 semanas	Tejido adiposo, glándula adrenal, colon ascendente y descendente, vejiga, metanefros, epidídimo, cérvix uterino, ovario, glándula mamaria, placenta, vesícula biliar, hígado, bazo, estómago, duodeno, ileon, yeyuno, esófago, lengua, corazón, pulmón, fémur, ojo, timo, cerebro, cerebelo, córtex cerebral, hipocampo, bulbo raquídeo y médula espinal	Detectado		RT-qPCR	(Freeman et al. 1998. MGI Direct Data Submission)
<i>Irs2</i>					
E14,5	Ganglios de la raíz dorsal	Moderado	Células específicas	<i>In situ</i>	(Diez-Roux et al. 2011)
	Dígitos del miembro posterior, incisivo de la mandíbula inferior y superior, molar de la mandíbula superior, labio inferior y superior, corteza renal y primordio del timo	Moderado	Restringido	<i>In situ</i>	
	Incisivo de la mandíbula superior, molar de la mandíbula inferior, corteza renal, primordio del timo, capa ventricular de diencéfalo, mesencéfalo y telencéfalo	Débil	Restringido	<i>In situ</i>	

Edad	Órgano	Nivel de expresión	Patrón de expresión	Técnica de detección	Referencia
E18; P1; P21	Metanefros	Detectado		RT-qPCR	(Vats et al. 2006)
<i>Ptpn1</i>					
E13	Sistema nervioso central	Detectado		RT-qPCR	(Tagawa et al. 1994)
E13	Mesencéfalo	Detectado		<i>Western Blotting</i>	
E15; E18; P0; P1; P4; P8; P12; P16; p20	Colículo superior	Detectado		<i>Western Blotting</i>	(Reinhard et al. 2009)

Tabla 2. Tabla de expresión de elementos del sistema IGF en diferentes tejidos de ratón y edades.

En la tabla se ha listado la expresión de los siguientes genes: *Igf1*, *Igf2*, *Ins1*, *Ins2*, *Igf1r*, *Insr*, *Igfbp1*, *Igfbp2*, *Igfbp3*, *Igfbp4*, *Igfbp5*, *Igfbp6*, *Igfbp7*, *Irs1*, *Irs2* y *Ptpn1*. Como técnicas de detección se han priorizado la hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica (IHQ), aunque en aquellos casos en los que no había datos de expresión de estas técnicas también se han utilizado datos provenientes de experimentos de RT-qPCR y *Western blotting*. La información se ha obtenido principalmente de la base de datos MouseMine (<http://www.mousemine.org/mousemine/begin.do>) y la librería del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).