

UCH-FC
Biotecnología
C.348
C-1



FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE PREGRADO

**“VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE GENES DEL OÍDO
INTERNO EN RATÓN POSTNATAL”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al título de **Ingeniera en Biotecnología Molecular**.

Silvia Constanza Cantellano Calderón

Santiago - Chile

Director del Seminario de Título: Dr. Juan Cristóbal Maass Oñate
Facultad de Medicina - Universidad de Chile

Profesor Patrocinante: Dr. Miguel Allente Connely
Facultad de Ciencias - Universidad de Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

SILVIA CONSTANZA CANTELLANO CALDERÓN

“VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE GENES DEL OÍDO INTERNO EN RATÓN POSTNATAL”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Juan Cristóbal Maass Oñate

Director Seminario de Título

Dr. Miguel Allende Connelly

Prof. Patrocinante del Seminario

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Alexander Vargas Milne

Presidente

Dr. Francisco Chávez Espinosa

Evaluador

Santiago de Chile, Mayo de 2016

"No te dejes llevar por la corriente,
porque solo los peces muertos se
dejan llevar por ella"

-Atrapa tu sueño-

Biografía

Nací el 16 de diciembre de 1990 en la ciudad de Los Andes, una de las ciudades más calurosas de Chile, lugar donde crecí, me malcrié y eduqué.

Mis primeros estudios fueron realizados en el Jardín Infantil Naranjín, del cual tengo recuerdos muy alegres y otros muy tristes debido a mi alergia al huevo que aún persiste y que en ese entonces nadie



sabía. Luego ingresé a la Escuela España n°122 en la cual estuve desde kínder a 8vo básico. Siempre destacué por mis notas, coleccionando un sin número de diplomas que están guardados en el esquinero de mi casa y que nadie ve. En 8vo básico fue cuándo conocí la biotecnología gracias a un folleto de Explora Conicyt y desde ese entonces no pensé en estudiar nada más que eso. La enseñanza media la realicé en el Liceo Max Salas Marchan donde desarrollé múltiples facetas como: bailarina del taller folclórico, organizadora de las elecciones del centro de alumnos como parte del TRICEL, entre otros. Además, participé en el coro municipal y aprendí a tocar violín en la orquesta de niños de Los Andes, lo cual me permitió formar parte de un grupo de cueca donde también cantaba y bailaba. Como verán, siempre metida en todo.

Cuando postulé a la universidad, mi puntaje no me permitió quedar en Ingeniería en Biotecnología Molecular por lo que me matriculé en Qca. y Farmacia de la misma casa de estudios. A los días siguientes, y gracias a que un curioso posterior compañero de carrera me avisara que habían otorgado dos cupos BEA para la carrera y que yo era uno de ellos, pude ingresar a Biotecnología. Una vez dentro la cosa no fue fácil, vivir sola y estudiar cosas tan difíciles de las cuales nunca me pasaron en el colegio, fue difícil. Recién en tercer año de carrera comprendí cómo estudiar y por fin

logre subir mis notas. En la universidad no sólo aprendí lo concerniente a mi carrera, sino que maduré, crecí como persona, me volví más tolerante y descubrí una nueva pasión: la danza irlandesa llegando a formar parte del grupo Gaoithe.

Ahora, a un paso de la titulación siento que el camino no fue sencillo pero estoy agradecida de ser una "hija de la educación pública" y estoy consciente de que el cierre de este proceso no es más que la puerta de entrada a un mundo de posibilidades por explorar.

Agradecimientos

Son muchas las personas a las cuales agradecer por haber logrado este último requisito para obtener mi título. Sin duda alguna, nada de lo que he logrado hasta hoy hubiese sido posible sin el apoyo, amor y constancia en mi desarrollo y educación entregada por mis padres, Manuel y Silvia. Gracias por su perseverancia en mis estudios y deberes escolares. También agradezco enormemente a mi weli María. Gracias por sus rezos, su preocupación, sus galletas y alimentos que hasta el día de hoy me envía a Stgo. Así mismo agradezco a mi abuelito Manuel, que ya no se encuentra con nosotros pero que siempre me dio lo mejor que sabía hacer, mote trigo y mote mey calentito recién preparado. Agradezco a mi hermana Cheli por esperarme cada fin de semana con ganas de hacer cosas entretenidas (aunque no lo logremos mucho).

Agradezco a mi amiga del colegio Kathy, por ser mi amiga más cercana de hace tantos años, por aguantarnos mutuamente y seguir en contacto a pesar de la distancia. Gracias a los biotec (Nía, Luisfe, Aranza, Carlos, Floro, Papi, Zama, Ceci, Mística, Vale, Salomé, Tente, Camilo, entre otros) por tantos buenos momentos vividos principalmente en los pastos y en la tan bulliciosa biblioteca de Ciencias. Además, agradezco a mis dos grandes grupos de amigos, los "Amor y paz", Benja, Cami y Kiki, y a "Los cazuela" Pancho, Seba, Viole, Su, Gisse y Timmy. Agradezco especialmente a mi amiga Consuelo por infinidad de risas, conversaciones, trabajos y copetes compartidos, ¡te extraño mucho amiga linda!, y a Mauro y Gac por esas conversaciones sacadas de contexto, ¡se les quiere mucho cabros!

En la universidad, además de estudiar y aprender un sinfín de cosas nuevas conocí una pasión, la danza irlandesa. Por ello agradezco a la Facultad de Ciencias por entregarme la oportunidad de ser una profesional y de destacar en áreas

impensadas hasta hace unos años. Gracias a Rodrigo y a Nadine, fundadores de Gaoithe Danza Irlandesa por enseñarme los primeros pasos en la danza. Gracias Evelyn, Mafe, Daniela y Lorena por su amor infinito y por la excelente buena onda vivida en los ensayos y presentaciones, ¡las quiero mucho haditas! También agradezco a mi partner y pareja de baile en la danza irlandesa y el reggaetón, Javier ¡qué gran viaje nos dimos el 2012!

La U también me presentó el amor, ahí conocí a Pablo (Blops), mi pololo de ya 7 años. A él agradezco su compañía en momentos buenos y malos, en enfermedades y recuperaciones largas donde volver a clases no fue sencillo y él siempre estuvo dispuesto a ayudar y enseñarme la materia perdida. Gracias por estar conmigo hasta altas horas de la noche estudiando química orgánica, leyendo papers que se me hacían complicados y por leer y corregir mi tesis. Gracias por lo vivido, por lo que vendrá y por enseñarme a ser más tolerante, aprender a establecer prioridades y a ser menos enojona. También agradezco a la familia de Pablo, los Rozas Rojas quienes me acogieron y alimentaron en varias ocasiones que no podía hacer nada más que estudiar. Gracias por los buenos consejos y la preocupación por mi bienestar.

Agradezco a Cristóbal Maass por darme la oportunidad de desarrollar mi tesis en su naciente laboratorio, gracias por confiar en mí y ser un excelente tutor. Medias gracias a Sebastián Silva (el bulling te quita puntos) por ser mi partner en el lab y ayudarme cuando tenía dudas con los protocolos o por continuar mis experimentos cuando no podía ir. Gracias a los cabros del lab (los Couve y Sierralta) por el buen ambiente vivido en el laboratorio. Cariños especiales a Carito, Grace, Nía, Carlos, Javi, Maca, Aquiles, Panchi y Angélica; y a los que ya no forman parte del lab pero que se recuerdan con mucho cariño: José, Ceci y Mabri. Agradecimientos especiales a Daniela Peña por ayudarme con los animales, a Ben por acompañarme y adiestrarme

en el desarrollo de técnicas moleculares y en general a todo el laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina que me ha recibido todo este tiempo. También agradezco a quienes guiaron mis primeros pasos por un laboratorio de investigación y que me enseñaron la rigurosidad que este requiere: Diego Catalán, Alex y Perry.

Agradezco de corazón a aquellas personas que sin tener una relación directa conmigo o con el laboratorio se comprometieron a entregarme su conocimiento y ayuda con el uso de equipos o en el desarrollo de técnicas. Gracias a Ríchy por enseñarme a hacer ISH, gracias a Yoya, Karina y Margarita por enseñarme a usar el microscopio DIC y solucionar el problema que tanto dolor de cabeza nos trajo, gracias a Pato Ahumada por prestarme el criostato. En general, agradezco al laboratorio de Miguel Concha que me permitió realizar parte de mi tesis en sus instalaciones. De igual manera, agradezco a Patricio Araos y al laboratorio de Luis Michea por permitirme el uso del criostato y el equipo Step One. En la misma línea, agradezco a Lele y Blops que me enseñaron a usar el criostato.

Finalmente quiero agradecer, con tristeza, a quienes hicieron posible mi tesis, los ratones. Gracias ratoncitos todos por dar su vida por la ciencia.

Financiamiento

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurobiología Celular y molecular, parte del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El trabajo contó con el financiamiento del proyecto FONDECYT 11130247.

Índice de contenido

Índice de contenido.....	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Tablas	xii
Índice de Abreviaturas	xiii
1 Resumen.....	1
2 Abstract	3
3 Introducción.....	5
3.1 Sordera y pérdida de audición	5
3.2 El oído, anatomía y fisiología.....	7
3.3 Desarrollo de la cóclea	9
3.4 Potencial regenerativo	10
3.5 Daño en el órgano de Corti.....	12
3.6 Restitución de la audición, terapias e investigación	13
4 Objetivos	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
5 Materiales y métodos.....	16
5.1 Selección de genes candidatos para el estudio	16
5.1.1 Parámetros utilizados en la selección.....	16
5.2 Ratones y disección de cócleas.....	16
5.2.1 Ratones.....	16
5.2.2 Disección de cócleas en los estadios prenatales E13.5, E16.5, E18.5 y postnatales P0, P3 y P6.....	17
5.3 Validación de la expresión mediante hibridación <i>in situ</i> , inmunofluorescencia y RT-PCR.....	18
5.3.1 Diseño de partidores para la generación de una sonda de ARN.....	18
5.3.2 Obtención de ADN.....	20
5.3.3 PCR y purificación de templado de PCR	20
5.3.4 Elaboración de ribosonda <i>in vitro</i> a partir de templado de PCR.....	21
5.3.5 Hibridación <i>in situ</i> en explantes cocleares completos	22

5.3.6	Secciones de cóclea.....	24
5.3.7	Inmunofluorescencia	25
5.3.8	Visualización y procesamiento de imágenes	25
5.4	PCR en tiempo real	26
5.4.1	Diseño de partidores para RT-PCR	26
5.4.2	Extracción de ARN y síntesis de cADN	27
5.4.3	RT-PCR.....	27
5.4.4	Análisis estadístico	28
6	Resultados.....	29
6.1	Selección de genes candidatos para su posterior validación.	29
6.2	Validación de la expresión de Nr5a1, Tal1 y Nr4a3 en órgano de Corti.	31
6.3	Validación de la expresión de Nr5a1, Tal1y Nr4a3 en células de sostén.	38
6.4	Evaluación de la expresión temporal de Tal1 y Nr4a3 en células de sostén y órgano de Corti.	42
7	Discusión.....	47
8	Conclusión.....	54
9	Referencias.	55

Índice de Figuras

Figura 1	Esquema representativo de la anatomía del oído, cóclea y órgano de Corti	8
Figura 2	Síntesis de ribosondas mediante transcripción <i>in vitro</i>	32
Figura 3	Validación de la expresión diferencial de Nr5a, Tal1 y Nr4a3 en Órgano de Corti de ratón en estadios P0 y P6	35
Figura 4	Confirmación de la expresión de Nr5a, Tal1 y Nr4a3 en células de sostén en estadio P0	39
Figura 5	Perfil de expresión temporal de Tal1 y Nr4a3	43

Índice de Tablas

Tabla I	Secuencia de partidores para generar un sonda de ARN	19
Tabla II	Secuencia de partidores usados para RT-PCR.	26
Tabla III	Genes seleccionados en base a una lista de genes potenciales expresados en células de sostén.	30

Índice de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Fosfatasa alcalina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARN-Seq	Secuenciación de ARN
BBR	Reactivo de bloqueo Boehringer
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
CC	Células ciliadas
CCE	Células ciliadas externas
CCI	Celulas ciliadas internas
cDNA	ADN complementario
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CREB	Elemento de unión en respuesta a cAMP
CS	Células de sostén
Ct	Ciclo umbral
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIC	Contraste Diferencial Interferencial
DMEM-F12	Medio Eagle Modificado Dulbecco
dNTPs	Deoxinucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	Etanol
EV	Estría vascular
h	Hora

HBSS	Solución salina de Hank equilibrada
Hes5	Homólogo 5 de hairy and enhancer of split
HIS	Hibridación in situ
HyB	Buffer de Hibridación
MABT	Tapón de ácido maleico
MeOH	Metanol
min	Minutos
mM	Milimolar
MyoVI	Miosina VI
NBT	Nitro blue tetrazolium
nm	Nanómetro
Nr4a3	Receptor nuclear subfamilia 4, grupo A, miembro 3
Nr5a1	Receptor nuclear subfamilia 5, grupo A, miembro 1
OC	Órgano de Corti
P27Kip1	Inhibidor de kinasas dependiente de ciclina 1B
pb	Par de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
pRB	Gen de retinoblastoma
Ptw	Tapón fosfato salino con Tween 20
Rbp	Proteína 4 de unión a retinol
RT-pcr	Reacción de cadena de la polimerasa en tiempo real
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato sódico

SEM	Error estándar
Ssc	Citrato de sodio salino
TAE	Tris acetato EDTA
Tal1	Gen de leucemia aguda linfoblástica de células T 1
TE	Tampón de Tris y EDTA
Tm	Temperatura de fusión ("temperatura de melting")
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
V	Volts

1 Resumen

La hipoacusia es un problema de salud pública que afecta uno a tres de mil recién nacidos y a uno de tres adultos mayores de 65 años en el mundo. Entre los tratamientos existentes se encuentran los audífonos, los implantes de oído medio y cocleares, todos tratamientos de alto costo y difícil implementación, por lo que es necesario obtener nuevas herramientas para tratarla.

El órgano de Corti (OC), es el órgano encargado de la transducción del sonido. Está compuesto por células ciliadas (CC), que son las encargadas de la transducción del estímulo sonoro, y las células de sostén (CS) que cumplen importantes y variados roles en el oído interno. Cuando las CC se dañan o mueren, son eliminadas del epitelio auditivo, causando pérdida de la audición, mientras que las CS son más resistentes y mantienen su morfología en el epitelio. Los mamíferos, a diferencia de otros vertebrados, no poseen la capacidad de regenerar las CC, sin embargo, estudios señalan que existe un potencial regenerativo. Intentos por lograr la reentrada al ciclo celular y transdiferenciación de las células remanentes han resultado exitosos, sin embargo, sólo se han detectado en tejidos jóvenes y la respuesta se pierde a lo largo del tiempo.

Este Seminario de Título tuvo por objetivo seleccionar y validar la expresión de genes de interés que presentaban expresión diferencial entre los estadios postnatal 1 y 6 en las CS en un análisis previo de datos obtenidos de ARN-Seq. Para esta validación, inicialmente se seleccionaron los genes a estudiar mediante el uso de criterios como el nivel de expresión, función en otros sistemas, y existencia de publicaciones relacionadas en su rol en sistema auditivo, entre otros. Los genes seleccionados fueron Nr5a1, Tal1y Nr4a3, que son factores de transcripción y tienen

funciones importantes en la regulación de la proliferación o diferenciación celular durante el desarrollo de otros sistemas. Posterior a ello, se validó la expresión de estos genes (a excepción de Nr5a1) en OC mediante hibridación *in situ* (HSI) en explantes de cóclea completa, RT-PCR e inmunofluorescencia. Importantemente, se validó la expresión temporal de Tal1 y Nr4a3 entre E13.5 y P6. Nr4a3 presentó una baja expresión en los estadios prenatales y tuvo un máximo de expresión en P6. Tal1, presentó un máximo de expresión en P0, el cual disminuye hacia P6. En tanto, el perfil de expresión de Nr5a1 se contradice con lo observado en la ARN-Seq. Finalmente, se confirmó la expresión de Tal1 y Nr4a3 en las CS en P0 por medio HSI en cortes cocleares. La expresión de estos genes durante el desarrollo del oído interno podría significar la participación de ellos en la regulación del potencial regenerativo. De ser así, la modificación de la expresión de estos genes o de las vías en que ellos participan podría ser considerada una estrategia interesante a utilizar en futuras terapias contra la sordera. Sin embargo esta hipótesis debe ser confirmada con futuros estudios.

2 Abstract

Hearing loss is a public health problem that affect one to three per thousands of newborns and one-third of people over 65 years in the world. Treatments include hearing aids, middle ear and cochlear implants, etc. All treatments are expensive and have difficult implementation, so it is necessary to obtain new tools to treat it.

The organ of Corti (OC) is the organ responsible for sound transduction. It is made up of hair cells (HC), which are the responsible for the transduction of sound stimuli, and of supporting cells (SC) that meet important and varied roles in the inner ear. When HC are damaged or killed, they are removed from the auditory epithelium, causing hearing loss, while the SC are more resistant and they maintain their morphology in the epithelium. Mammals, unlike other vertebrates, do not have the ability to regenerate HC, nevertheless, studies indicate that there is a regenerative potential. Efforts to achieve cell cycle re-entry and transdiferentiation of the remaining cells have been successful, however, they have only worked in young tissues and the response is lost over time.

The aim of this Degree Seminar was to select and validate the expression of genes of interest that had differential expression between postnatal day 1 and 6 (P1 and P6 respectively) in the CS in a previous analysis of RNA-Seq data. For this validation, genes were first selected based on the expression levels, function in other systems, the current state of the art regarding their role in auditory system, etc. The selected genes were Nr5a1, Tal1 y Nr4a3, which are transcription factors and have important functions in proliferation regulation and cellular differentiation in development of other systems. After this, the expression of these genes was validated (except Nr5a1) in OC through *in situ* hybridization (ISH) in whole explant cochlea, RT-PCR and

immunofluorescence. Importantly, *Tal1* and *Nr4a3* temporal expression profile was validated between E13.5 and P6. *Nr4a3* had a low expression at prenatal stages, which had the highest expression at P6. *Tal1* had its highest expression at P0, which decrease towards P6. In other hand, *Nr5a1* gene expression profile was contradictory with the data obtained with RNA-Seq. Finally, *Tal1* and *Nr4a3* expression was confirmed in SC at P0 by ISH in cochlear sections. The expression of these genes during inner ear development could mean their involvement in regenerative potential regulation. It so, modulating their expression or the pathways in which they engage could be an interesting strategy to apply in future therapies against hearing loss. Nevertheless, this hypothesis must be tested in future studies.

3 Introducción

3.1 Sordera y pérdida de audición

La audición es la capacidad de oír un sonido que es recibido y transducido por el órgano del oído para luego ser percibido por nuestro cerebro; sin embargo, no todos poseen la capacidad de oír, siendo la sordera y pérdida de audición un problema de salud de alta frecuencia en seres humanos. A nivel mundial, se estima que un 5% de la población posee discapacidad auditiva entre los cuales el 10% corresponde a niños (tres de cada mil recién nacidos) y aproximadamente una de cada tres personas mayor de 65 años (Village, 1999; World Health Organization, 2015). En nuestro país, el 2,93% de la población posee sordera o dificultad auditiva incluso usando audífonos, lo que a su vez corresponde al 23% dentro de las discapacidades que fueron evaluadas en el censo realizado el año 2012 por el INE (INE, 2012).

La pérdida de audición tiene distintos grados, puede ser leve, moderada, severa o profunda en uno o ambos oídos (World Health Organization, 2015). En general, en los casos leves y moderados las personas se comunican a través del lenguaje hablado y pueden apoyarse de audífonos, implantes cocleares y otros dispositivos de asistencia como los subtítulos. Los individuos sordos, en su mayoría, tienen una pérdida auditiva profunda lo que significa que tienen muy poca o nula audición y su forma de comunicación es mediante el lenguaje de señas. Ambas situaciones generan un gran impacto a nivel social, económico y emocional en el individuo puesto que muy pocos servicios están adaptados para recibir a personas con esta discapacidad provocando exclusión, limitación de acceso a servicios y empleabilidad. Junto con esto, existe un alto gasto en salud, educación y pérdida de productividad que deben enfrentar los gobiernos.

Las causas que dan origen a la pérdida de audición o sordera se clasifican en congénitas y adquiridas (World Health Organization, 2015). Las causas congénitas pueden estar presentes o ser gatilladas poco después del nacimiento. Esto puede ser causado por factores genéticos hereditarios o por ciertas complicaciones en el embarazo (por rubeola, sífilis) o durante parto (asfixia, ictericia grave, bajo peso al nacer). Las causas que pueden conducir a la pérdida de audición adquirida y que pueden ocurrir a cualquier edad son las enfermedades infecciosas (meningitis, sarampión, paperas), infecciones crónicas del oído, otitis media (cuando es crónica, es la principal causa de pérdida de audición en niños); ruido excesivo y envejecimiento (debido a la degeneración de las células sensoriales) entre otras.

La pérdida de audición o sordera se puede clasificar según afecten la llegada del estímulo mecánico al oído interno (de conducción) y los producidos por el daño de éste (sensorineurales) (Smith y col. 2014). Dentro de la primera clasificación encontramos los audífonos (conducción aérea) e implantes de oído medio (amplificación mecánica), mientras que en la segunda se encuentra el implante coclear (estimulación eléctrica). Estos tratamientos son de alto costo y difícil implementación por lo cual se hace necesario encontrar nuevas herramientas para dar solución a esta discapacidad, las cuales pueden ir dirigidas a solucionar el problema de fondo y no de manera paliativa como se ha hecho hasta ahora. Dentro del tipo sensorineural destaca la destrucción de los distintos tipos celulares de la cóclea, especialmente las CC cuya muerte es irreversible y carecen de regeneración (Hawking, 1973; Merchant & Nadol, 1993). Los tratamientos existentes se enfocan principalmente en modificar las características del estímulo sonoro o bien estimular de manera directa y tonotópicamente el nervio auditivo.

3.2 El oído, anatomía y fisiología

El oído de mamíferos se encuentra dividido histoanatómicamente en tres partes, oído externo, medio e interno. En su región externa y media se encuentran estructuras que conducen y amplifican el estímulo mecánico el cual desemboca en el oído interno, parte en la que se encuentra el órgano transductor llamado cóclea. Ésta consiste en una estructura con forma de caparazón de caracol formada por tres cámaras longitudinales que contienen fluidos y que generan compartimentos y gradientes electroquímicos. Dos de éstas, llamadas escala vestibular y escala timpánica contienen perilinfa, mientras que la escala media o coclear contiene endolinfa. Dentro de la escala media se encuentra el órgano de Corti que contiene el epitelio sensorial mecanotransductor y que consiste, en términos generales, en dos tipos celulares: las células ciliadas (CC) y células de sostén (CS) (Figura1).

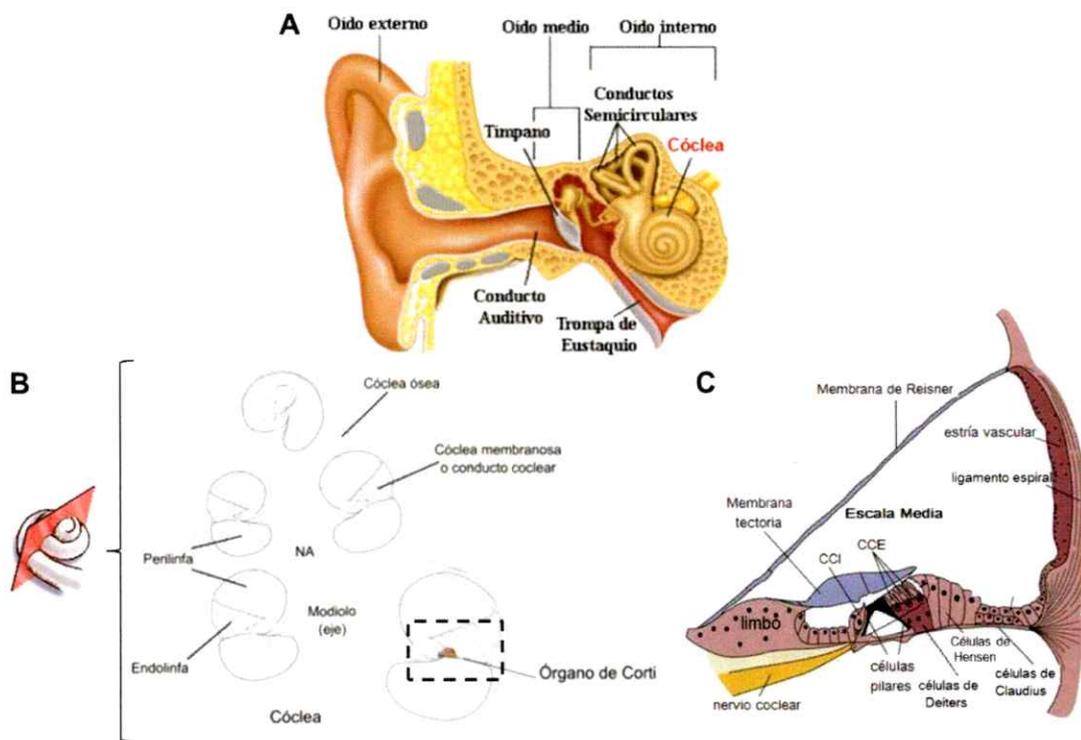


Figura 1: Esquema representativo de la anatomía del oído, cóclea y órgano de Corti. A. anatomía del oído humano el cual ha sido dividido para su estudio en tres partes: oído interno (pabellón auricular y conducto auditivo), oído medio (tímpano, martillo, yunque y estribo) y oído interno (sistema vestibular, cóclea (en rojo) y nervio auditivo). B. Corte transversal por el centro de la cóclea o hemi-modiolar. C. Esquema de la escala media, lugar donde se encuentra órgano de Corti. A, modificada del recurso online <http://www.scientificpsychic.com/workbook/sentidos-humanos.html>. B, modificado de (Maass, 2010). C, modificado del recurso online <http://clinicalgate.com/anatomy-of-the-auditory-system/>.

Las células ciliadas (CC) son las encargadas de transducir el estímulo sonoro y transformarlo en señales electroquímicas induciendo un estímulo nervioso que viaja al cerebro por el nervio auditivo que las inerva (Fujioka y col., 2015). La transducción ocurre gracias a que las CC poseen cilios en su zona apical los cuales son deformados por movimiento de los líquidos existentes en la cóclea (endolinfa y perilinfa). Existen

dos tipos de CC, aquellas que tienen la capacidad de transformar las ondas mecánicas en estímulos electroquímicos, llamadas células ciliadas internas (CCI), y aquellas que amplifican y sintonizan los estímulos, llamadas células ciliadas externas (CCE) (Merchant & Nadol, 1993). Por su parte, las CS juegan importantes y variados roles en el oído interno, entre los cuales destacan la mantención del gradiente electroquímico que hace posible la transducción y la eliminación de CC muertas, mantención de la cito-arquitectura del órgano de Corti (OC), entre otros (Monzack & Cunningham, 2013). Existen cinco tipos de CS las cuales están organizadas en filas a lo largo de la longitud del OC y van desde el borde interior al borde exterior en el siguiente orden: células del surco interno, células falángicas, células de pilar, células de Deiters y células de Hensen (Wang y col., 2013). Las CS tienen morfologías muy distintas entre sí, las células falángicas y las del surco interno son columnares, las células de Hensen son cuboidales u oblongas, y las células de Deiters y pilares tienen un citoesqueleto rígido, procesos alargados y una gran demanda estructural, ya que por ejemplo, las células pilares internas y externas deben mantener la estructura del túnel de Corti durante la estimulación acústica a pesar de la presión ejercida sobre las células localizadas a sus costados.

3.3 Desarrollo de la cóclea

La proliferación, morfogénesis y diferenciación celular a partir de una célula progenitora dan origen a organismos complejos lo cual tiene lugar durante el desarrollo embrionario. En el oído, el desarrollo de un epitelio sensorial altamente estructurado y especializado ocurre a partir de un número reducido de progenitores regidos por la

expresión de genes en gradiente, temporalidad y localización específica (Fekete & Wu, 2002).

Durante el desarrollo, aparece un área engrosada de células proliferativas en el piso del conducto coclear (E12 en ratón) que llegará a ser el dominio prosensorial, el que luego dará lugar al epitelio sensorial coclear (Fujioka y col., 2015). Las células destinadas a formar este epitelio salen del ciclo celular de manera permanente en una región marcada por la expresión del inhibidor del ciclo celular p27Kip1 lo cual ocurre entre los estadios E12 y E14 en ratón (Chen y col., 2002). El cese de la proliferación de las células del órgano de Corti (OC) ocurre en un gradiente que va desde la zona apical a la basal. En mamíferos, cuando la proliferación se detiene comienza la diferenciación celular que ocurre de manera basal a apical y que está dada por la expresión de *Atoh-1*, (*Math-1*) que es un gen maestro para la diferenciación de CC (Fujioka y col., 2015). Posterior a ello, mediante la expresión de ligandos de Notch y por un proceso definido como "inhibición lateral" se define el patrón de CC y CS, donde las células adyacentes a CC se diferencian al linaje de CS resultando en un tejido altamente organizado. Una vez que las células llegan a un estado de diferenciación terminal, no ocurre regeneración ni recambio celular.

3.4 Potencial regenerativo

A través de la evolución, los seres vivos han desarrollado estructuras especializadas para explorar el medio externo como el flujo o la vibración, lo cual va acompañado del desarrollo de una red neuronal que permite transducir este estímulo e interpretarlo por medio del sistema nervioso central. Las células involucradas en esta

tarea son las CC las cuales han sido encontradas en una amplia gama de vertebrados como los peces, aves, reptiles y mamíferos. Antecedentes señalan que en el desarrollo postnatal temprano en ratón es posible observar una disminución progresiva en la respuesta regenerativa. Por tanto, en mamíferos, el número de células no aumenta, sino que se mantiene o disminuye a medida que transcurre la vida del individuo puesto que no existe regeneración ni recambio celular (Fekete & Wu, 2002; Hawkins & Lovett, 2004; Kelley, 2006). En tanto, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, vertebrados como aves, reptiles y peces sí poseen la capacidad de recambio y regeneración funcional de las CC una vez ya finalizado su desarrollo e incluso en su adultez (Cotanche, 1987; Harris, 2003; Ryals B., 1988).

Los mecanismos por los cuales existe esta diferencia aún no son conocidos por completo. Se presume, que los mamíferos perdieron la capacidad de regeneración debido a una adaptación a la complejidad estructural de la cóclea, lo cual se vería afectado con una respuesta regenerativa frente al daño por la desorganización de su estructura (Shi y col., 2012). No obstante, al estudiar los resultados de pérdida o ganancia de función de algunos genes, así como la manipulación de genes involucrados en la salida del ciclo celular y procesos de diferenciación durante el desarrollo del oído interno, se observa que existe un potencial regenerativo latente en el OC de mamíferos incluso terminado su desarrollo (Löwenheim y col., 1999; Sage y col., 2005). Ejemplos de esto es la reincorporación de CC diferenciadas al ciclo celular, pudiendo dividirse y establecer nuevas conexiones con el nervio auditivo, lo cual se llevó a cabo mediante la delección condicional del gen retinoblastoma (pRB) en ratón (Sage y col., 2005). Así también, el cambio del destino celular *in vitro* de células no sensoriales (CS y células que rodean el OC) con origen embrionario común a las CC

mediante la reprogramación del patrón de expresión de genes que se expresan durante el desarrollo del oído interno (disminución de la expresión de p27Kip1) provocando la proliferación, cambio de destino celular y transformación a CC (White y col., 2006). Además, se ha logrado manipular de manera exitosa la inducción de la proliferación y transdiferenciación *in vivo* de las CS en estadio postnatal (Izumikawa y col., 2005; Oesterle y col., 2011).

3.5 Daño en el órgano de Corti

El grado del daño producido en personas con pérdida de audición o sordera varía según la susceptibilidad y edad del individuo, el tipo, temporalidad y dosis de la noxa y de la porción de cóclea que ha sido afectada.

La mayoría de las patologías auditivas están relacionadas con el daño causado en las CC, el que conlleva la muerte y una disminución del número de estas células (McFadden y col., 2004). En roedores, se ha demostrado que incluso un daño leve y reversible (Schneider y col., 2002), termina en la destrucción y eliminación de estas células del epitelio (McFadden y col., 2004; McFadden y col., 2002). En tanto las CS son más resistentes al daño y mantienen su morfología en el epitelio dañado. Sin embargo, cuando ocurre un daño severo y de larga duración, las CS pueden ser eliminadas lo cual deja un epitelio plano mono-estratificado. Cuando el epitelio se encuentra de esta manera, los experimentos destinados a regenerar las CC en ratón mediante modificaciones genéticas han tenido escasa respuesta (Raphael, 2007).

Recientemente, se demostró la conservación del epitelio de sostén en regiones de huesos temporales en humanos que sufrían de sordera severa a profunda de causa

conocida (Hoa M, 2010). Estos antecedentes, demuestran que las CS sobreviven en humanos con sordera, lo cual da cuenta de las características del daño producido en el oído interno. Además, este antecedente da una noción sobre el potencial regenerativo del tejido y potenciales intervenciones para lograr la regeneración de las CC.

3.6 Restitución de la audición, terapias e investigación

Entre los esfuerzos que se realizan para dar con una terapia que resuelva el problema de la sordera se encuentran: la búsqueda de una respuesta regenerativa que sea significativa, estable y funcional, y la reentrada al ciclo celular de las CS. Como se señaló anteriormente, el correcto posicionamiento de las CC es esencial para una regeneración funcional efectiva. Con esto en mente, se han desarrollado estudios que apuntan a probar la transdiferenciación de las CS a CC. Experimentos con este enfoque han resultado en una recuperación parcial de las CC después de una sordera inducida por trauma acústico, lo cual se aproxima como una posible terapia (Yang y col., 2012). No obstante, son muy pocos los estudios que han mostrado ser exitosos, estables y que han tenido un efecto funcional significativo. Entre los resultados exitosos de inducción a la reentrada al ciclo celular y transdiferenciación en roedores, sólo han sido detectados en tejidos de jóvenes ya que en individuos viejos la respuesta se pierde y no es mantenida en el tiempo (Izumikawa y col., 2005; Mizutari y col., 2013; Tona y col., 2014). Estos estudios demuestran que la transdiferenciación *in vivo* de las CS a CC es un enfoque terapéutico posible cuando existe la pérdida auditiva neurosensorial. No obstante, a pesar de que las respuestas favorables no son mantenidas en el tiempo y que la estructura no ha logrado ser reproducida, existe evidencia de una regeneración funcional (Gubbels y col., 2010; Izumikawa y col.,

2005). Esta aproximación disminuye necesariamente el número de CS lo cual es perjudicial para la mantención del epitelio sensorial debido a las funciones que cumplen las CS tanto estructurales como fisiológicas. En vista de ello, otras estrategias deben ser consideradas para la restitución de la audición, teniendo en clara consideración la mantención del número y funcionalidad de las CS. Es por esto que es necesario saber más sobre las CS, ya que hasta ahora no han sido suficientemente estudiadas como para comprender cómo ocurre la pérdida de regeneración y a la vez saber cómo poder manejar el potencial regenerativo latente.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente y con el objetivo de obtener información y las herramientas apropiadas que permitan una regeneración funcional y estable para así contribuir al diseño de futuras terapias médicas, previamente en el laboratorio se realizó y analizó un ARN-Seq de las CS y las células del resto de la cóclea en los estadios postnatal temprano 1 y 6 (P1 y P6, respectivamente) en colaboración con el laboratorio de Andrew Groves de Baylor College of Medicine (Texas), pudiendo comparar así los niveles de expresión entre las CS y el resto del tejido de la cóclea. A partir de estos estudios se desprende este Seminario de Título en el cuál se validó la expresión de tres genes (Nr5a1, Tal1 y Nr4a3) seleccionados bajo diversos criterios a partir de los datos de ARN-Seq en CS durante el desarrollo postnatal temprano de ratón (estadios P0 y P6). Además, se estudió la expresión de Tal1 y Nr4a3 durante el desarrollo pre y postnatal (E13.5, E16, E18, P0, P3, P6) debido a su alta expresión en el estadio P0 y P6, respectivamente. Estos resultados proporcionan nueva información respecto a los genes expresados en los estadios claves en la pérdida de regeneración en mamíferos, e invitan a seguir investigando su posible rol en este ámbito.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Validar la expresión de algunos genes obtenidos por ARN-Seq de células de sostén de la cóclea que presentan una expresión diferencial entre los estadios P1 y P6 durante el desarrollo postnatal temprano de ratón y que pueden estar involucrados en la ausencia de regeneración en la cóclea. Además, estudiar la expresión de al menos uno de estos genes durante el desarrollo pre y postnatal.

4.2 Objetivos específicos

- 1 Seleccionar los genes candidatos mediante criterios de expresión diferencial tanto espacial (expresión en células de sostén y resto de la cóclea) como temporal (estadio postnatal P1 y P6), el estado del arte del gen (si está descrito o no en oído), si corresponde a un factor de transcripción, y por los procesos celulares y sistémicos en los cuales se encuentran involucrados.
- 2 Validar la expresión espacial de los genes anteriormente seleccionados en estadio postnatal 0 (P0) mediante hibridación *in situ*, en OC y posteriormente en células de sostén
- 3 Estudiar la expresión de al menos uno de los genes que previamente se haya validado su expresión en células de sostén, durante el desarrollo pre y postnatal de ratón (estadios prenatales E13.5, E16, E18 y postnatales P0, P3, P6) mediante hibridación *in situ* y PCR en tiempo real

5 Materiales y métodos

5.1 Selección de genes candidatos para el estudio

Para dar inicio a este seminario de título, se utilizaron los datos y antecedentes provenientes del ARN-Seq de las CS y el resto de las células de la cóclea de ratón en los estadios postnatal temprano P1 y P6 realizado previamente en el laboratorio en colaboración con el laboratorio de Andrew Groves del Baylor College of Medicine (Maass y cols. no publicados). Posterior a ello, se creó una lista con aquellos genes que eran expresados diferencialmente tanto en P1, como P6 y la relación P1/P6.

5.1.1 Parámetros utilizados en la selección

A partir de una lista con datos depurados de un ARN-Seq de células de sostén de ratón en estadio postnatal 1 y 6 (P1 y P6), se evaluaron diferentes parámetros. Los parámetros considerados para esta elección fueron: la expresión diferencial tanto espacial (expresión en CS y resto de la cóclea) como temporal (estadio postnatal P1 y P6), la presencia o ausencia de publicaciones que describan al gen en cuestión en oído, el hecho de que este gen corresponda o no a un factor de transcripción, los procesos celulares y sistémicos en los cuales se encuentra involucrado; y por último, el nivel de conocimiento y estudios en relación al gen en cuestión (cuán descrito se encuentra).

5.2 Ratones y disección de cócleas

5.2.1 Ratones

Los ratones de cepa CF-1 de ambos sexos fueron utilizados en los estadios prenatales E13.5, E16.5, E18.5 y postnatales P0, P3 y P6. Los procedimientos en animales descritos en el protocolo de bioética n°585 fueron aprobados por el Comité de

Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Cada procedimiento fue realizado bajo la supervisión del veterinario a cargo del bioterio.

5.2.2 Disecación de cócleas en los estadios prenatales E13.5, E16.5, E18.5 y postnatales P0, P3 y P6

Los animales en estadio prenatal fueron sacados del útero de la madre, previa eutanasia con isoflurano (Abbvie, UK), y mantenidos en hielo sobre una placa Petri con solución HBSS (Gibco, Life Technologies) estéril hasta la disecación. En tanto los ratones en estadio postnatal fueron puestos sobre un trozo de papel absorbente en una cubeta de hielo para ser anestesiados y luego decapitados.

Las cócleas de ambos oídos fueron disecados bajo lupa en solución HBSS estéril utilizando para ello material de disección. Una vez obtenidas las cócleas estas fueron cultivadas en placas de cuatro pocillos (Nunc™ 4-Well Dishes for IV F, Thermo Fisher Scientific) sobre membranas de policarbonato de diámetro 13 mm y poro de 1 μm (Nucleopore Track-Etched membranes, Whatman) en medio DMEM F12 (Gibco, Life Technologies) suplementado con penicilina y N2 (Gibco, Life Technologies) 1X cada uno, durante 45 min en incubador de células a 37°C con CO₂ al 5%. Posteriormente, estas fueron fijadas en una solución de PFA al 4% en PBS a 4°C durante 24 h. Al día siguiente, esta solución fue reemplazada por metanol 100% (MeOH) (Merck, Millipore) y almacenadas a -20°C hasta su requerimiento.

5.3 Validación de la expresión mediante hibridación *in situ*, inmunofluorescencia y RT-PCR.

5.3.1 Diseño de partidores para la generación de una sonda de ARN

Mediante el uso de las herramientas online gene-NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y Ensemble (<http://www.ensembl.org/>) se obtuvieron las secuencias génicas de los genes previamente seleccionados. Dado que cada uno de estos tres genes posee variaciones transcripcionales con empalme alternativo, se optó por una o varias regiones codificantes (exones) adyacentes conservados dentro de las variantes del gen. Posteriormente, se procedió al diseño de los partidores mediante el uso de las herramientas primerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y AmplifX (Nicolas Jullien; CNRS, Aix-Marseille Université). Puesto que se requería generar una sonda de ARN *in vitro*, se incorporó al extremo 5' del partidor antisentido la secuencia del promotor al cual se une la polimerasa del fago T7 (5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAG-3'). Los amplicones obtenidos como resultado de los partidores específicos diseñados para cada gen cuentan con un tamaño de entre 500 y 700 pb. Finalmente, para verificar que el amplicón resultante para cada gen no tuviera similitud con otras secuencias en el transcriptoma de ratón, se realizó un análisis de comparación de secuencias mediante la herramienta Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabla I: Secuencia de partidores para generar un sonda de ARN.

Gen	Nº	Tamaño del amplicón (pb)	Secuencia de los partidores	Tm (°C)	Número de acceso GeneBank
Nr5a1	1	627	F: 5'-ATTCTGCCCTAACCCCTGCCCATCAC-3' R: 5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAG GGAGACAGCCTTGCCAGTT-3'	64,5	NM_139051. 3
	2	559	F: 5'-ATTCTGCCCTAACCCCTGCCCATCAC-3' R: 5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAG AGTGGATGTCCAGTCTGGAA-3'	64,5	
Tal1	3	433	F: 5'-GGC ACGCAGTGACCCGCAACTAGA-3' R: 5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAG AGCGGCTGGCTAAGGCTAT-3'		NM_011527. 3
	4	426	F: 5'-GGC ACGCAGTGACCCGCAACTAGA-3' R: 5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAG GGCTAAGGCTATAGAGCAGCG-3'		
Nr4a3	5	580	F: 5'-GGTCCACTTACGCCACGCAGACTTATGGCT-3' R: 5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGGT GAGGGCTTGAAGAAGA-3'	65,3	NM_015743. 3
	6	570	F: 5'-ACGCCACGCAGACTTATGGCTCGGAA-3' R: 5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGGT GAGGGCTTGAAGAAGA-3'	67,4	
Hes5	7	571	F: 5'-GAGGATGAGCTCGTTCCTCTGGATGTGGG-3' R: 5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAG TAAGGATCATCGTGGAGA-3'	64,7	NM_010419. 4
	8	565	F: 5'-GAGCTCGTTCCTCTGGATGTGGGAAGAC-3' R: 5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAG TAAGGATCATCGTGGAGA-3'	63,8	

F: partidore sentido, R: partidore antisentido. En negritas secuencia T7.

5.3.2 Obtención de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de biopsias de la cola de ratones CF-1 silvestres (aproximadamente 3 mm), las cuales fueron digeridas enzimáticamente en 600 µl de tampón de digestión de colas (Tris 50 mM pH 8.3, NaCl 100 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5%(v/v)) y 6 µl de proteinasa K durante la noche a 55°C. Al día siguiente se agregó 500 µl de fenolcloroformo pH 6,6/7,9 y se centrifugó a 16.000 g por 5 min para separar las fases, luego se transfirió la fase superior a un nuevo tubo al cual se le agregó 420 µl de isopropanol, se mezcló en vortex y se centrifugó a 16.000 g por 10 min. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el pellet restante fue lavado con etanol 70% (diluido en agua DEPC) y se centrifugó a 16.000 g por 10 min. Finalmente, se eliminó el etanol y el pellet fue resuspendido en 150 µl de tampón TE (Qiagen) y se dejó a 55°C por 2 h para luego ser almacenado a 20°C hasta su utilización.

5.3.3 PCR y purificación de templado de PCR

Para verificar el correcto funcionamiento de los partidores diseñados, se realizó un PCR de prueba a partir de ADN genómico obtenido previamente. La mezcla de reacción utilizada en base al kit GoTaq (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega) fue de 5 µl de tampón 5X Green, 2 µl de MgCl₂ 25 µM, 0,5 µl de mix de dNTPs, 1,25 µl de cada partidor, 2 µl de templado y se completó con agua destilada hasta los 25 µl. El programa utilizado fue de: 1 ciclo de denaturación inicial a 95°C por 2 min; 40 ciclos de denaturación a 95°C por 30 s, hibridación a la temperatura de fusión (T_m) del partidor (Tabla I) por 30 s y extensión 72°C por 45 s, terminando con un ciclo de extensión final a 72°C 5 min.

Para confirmar la obtención de la banda esperada, se homogenizaron 5 µl de producto de PCR con tampón de carga de ADN 6X y sometidos a electroforesis en

geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X a 96 V por 1 h aproximadamente, en presencia de bromuro de etidio 0,5 mg/ml.

Para asegurar que el producto de PCR fuera realmente el esperado, se procedió a realizar digestión enzimática de los productos de PCR. Para ello el producto de reacción de Nr5a1 fue digerido con la enzima Hind III (Fermentas), Nr4a3 fue digerido con Bcl I (Fermentas) y Tal1 y Hes5 fueron digeridos con la enzima Pst I (Invitrogen). Todas las reacciones fueron incubadas a 37°C durante la noche (ON). Al día siguiente, se realizó una electroforesis como se señaló anteriormente. Por otra parte, para confirmar que efectivamente los productos amplificados tuvieran la secuencia deseada, se enviaron muestras de producto de reacción de PCR a secuenciar (Macrogen, Korea).

Una vez confirmado que los productos de reacción eran los esperados, se realizó un nuevo PCR el cual mantenía las proporciones del PCR mencionado anteriormente, pero con un volumen final de 150 µl. Posterior a ello, se realizó una electroforesis para luego purificar las bandas obtenidas para cada gen. Esta purificación se realizó según el protocolo detallado para el kit Wizard SV Gel and PCR Clean up System (Promega) según indica el fabricante.

5.3.4 Elaboración de ribosonda *in vitro* a partir de templado de PCR

Basado en el protocolo de Urness (L. Urness 5/09) para la obtención de las ribosondas, se procedió a realizar una transcripción *in vitro* con polimerasa T7 a partir de templado de PCR purificado. La mezcla de reacción utilizada fue de 5 µl de Dig RNA labeling mix (Roche), 5 µl de tampón de transcripción (Roche), 2,5 µl de inhibidor de RNasa 2000 U (Roche), 5 µl de ARN polimeraza T7 (Promega), 10 µl de templado de ADN y 17,5 µl de agua DEPC; y se incubó a 37°C durante 2-3 horas. A continuación

se agregó DNasa I y se precipitó el ARN con LiCl para luego diluirlo en agua libre de nucleasa. Posteriormente se cuantificó la concentración de ARN por absorbancia a 260 nm. Además, se controló la integridad de la sonda mediante una electroforesis de agarosa 1% a voltaje alto. Finalmente, las sondas fueron almacenadas en tampón de hibridación y mantenidas a -20°C hasta su utilización.

Con el propósito de obtener la mejor HIS posible, se hidrolizó parte del pellet de ribosonda sintetizada. Para ello, se resuspendió el pellet en 50 µl de una solución de 40 mM NaHCO₃/ 60mM Na₂CO₃ libres de RNasa y se incubó durante 20 min (para obtener fragmentos entre 200 y 300 pb). Posteriormente, los tubos fueron puestos en hielo y se le agregó 100 µl de agua libre de nucleasa.

Tanto la sonda hidrolizada como la no hidrolizada, fueron resuspendidas en 30 µl de acetato de amonio 10 M y 400 µl de etanol e incubadas a -20°C durante 30 min. Luego fueron centrifugadas a máxima velocidad durante 10 min., lavadas con etanol al 70% y secadas al aire. Finalmente, fueron resuspendidas en tampón de hibridación (HyB) dejándolas a una concentración de 50 ng/µl, luego fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

5.3.5 Hibridación *in situ* en explantes cocleares completos

Las hibridaciones *in situ* (HIS) de Nr5a1, Tal1, Nr4a3 y Hes5 en cóclea completa fueron realizadas en base al protocolo de HIS para embriones del laboratorio de Andrew Groves (Groves lab *in situ* hybridization protocols, 2008) el cual fue modificado en base a los requerimientos necesarios para montar esta técnica en cócleas. Los pasos de los dos primeros días de protocolo fueron realizados en un ambiente lo más libre de RNasa posible. Para ello, el mesón y las pipetas fueron

limpiados con RNase Away (Ambion), siempre se utilizó puntas con filtro las cuales fueron renovadas en cada procedimiento, se cambió de guantes constantemente y se utilizó mascarilla.

El primer día de protocolo consistió en rehidratar las cócleas mantenidas en MeOH 100% mediante lavados con 500 µl de MeOH-PTwn al 100, 75, 50, 25 y 0%, luego fueron blanqueadas con una solución de agua oxigenada 0,1%. Posteriormente, las cócleas fueron prehibridizadas con tampón de hibridación (50% de formamida, 1.3X de SSC (pH 4.5 con ácido cítrico), 50 µg/ml de ARN de levadura, 100 µg/ml de heparina, 0,2% de Tween 20, 0,5% de CHAPS, 5mM EDTA y agua DEPC para completar) durante 2 a 3 h a 64°C. A continuación, se realizó la hibridación para lo cual se agregó la sonda específica para cada ensayo (concentración medida experimentalmente) diluidas en HyB e incubadas a 64°C ON (el control negativo (blanco) corresponde al mismo ensayo pero en vez de agregar la sonda solo se agrega HyB). Al día siguiente, las muestras fueron lavadas 3 veces durante 30 min a 64°C con HyB precalentado, luego se lavó con una mezcla 1:1 de HyB:MABT durante 20 min a 64°C y posteriormente se lavaron tres veces durante 1 h en MABT a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se procedió con el bloqueo de éstas con MABT, 20% suero de oveja (Gibco) y 2% de BBR (Roche) al menos 1 h, y luego se procedió a incubarlas con anticuerpo antidigoxigenina (Roche) diluido 1:2000 en PTw ON a 4°C. Al tercer día, las cócleas fueron lavadas tres veces con MABT 1 h a temperatura ambiente y agitación. Posteriormente, éstas fueron lavadas dos veces con tampón AP (TrisCl 1M pH 9,5, NaCl, MgCl 2M, Tween20 y agua) durante 20 min, para luego ser incubadas en la solución de color (tampón AP más 0,45 µl de NBT y 3,5 µl de BCIP por ml) por un tiempo determinado por el experimentador y siempre mantenidas

en oscuridad. Con esto, se logró obtener el precipitado de color azul cuya reacción una vez alcanza la coloración adecuada es detenida con 2 lavados con tampón AP y luego fijadas con PFA 4%. Posteriormente, las muestras fueron montadas en portaobjetos a los cuales se les agregaron unas gotas de glicerol, se posó el cubreobjeto y se selló con esmalte de uña por los costados. Finalmente, las muestras fueron observadas al microscopio de campo claro Nikon Eclipse 80i con los objetivos 4x, 10x.

5.3.6 Secciones de cóclea

Una vez realizadas las HIS, las cócleas fueron rescatadas de los portaobjetos, para luego proceder con el corte histológico.

En un comienzo, se procedió fijando las cócleas en PFA 4% durante 1 a 2 h a temperatura ambiente. Luego, los tejidos fueron posados en los pocillos de una placa con una solución de PBS con 15% de sacarosa y mantenidos a 4°C hasta que se hundieran. Luego, las cócleas fueron incubadas en una solución de gelatina 7,5% con sacarosa al 15% en PBS durante 1 a 2 h a 37°C. Posteriormente, los tejidos fueron posados en gelatina sobre un molde de sección en frío y mantenidos a 4°C por no más de tres días. Finalmente, el molde de gelatina-cóclea fue cortado en forma de cubo para adherido al soporte del criostato (Leica CM1510 S). Este bloque fue embebido en O.C.T Tissue-Tek (Sakura, USA) y una vez que este se congeló se procedió a cortar la muestra. Los cortes fueron recibidos en portaobjetos que posteriormente fueron incubados en PBS a 50°C durante 10 min para eliminar la gelatina y el O.C.T de la muestra.

5.3.7 Inmunofluorescencia

Se realizaron inmunofluorescencias de miosina VI (MyoVI, marcador de células ciliadas) sobre los portaobjetos que contenían los cortes de cóclea a los cuales previamente se les había realizado HIS.

Para dar inicio a esta técnica, se fijaron las muestras en PFA al 4% ON a 4°C. Al día siguiente se lavó con 500 µl de PBS durante 5 min en agitación (se repitió 3 veces). Luego, las muestras fueron permeabilizadas/bloqueadas en 500 µl de una solución con 2,5% de suero de burro, 3% de Tritón X100 al 10% y PBS (la misma utilizada para la dilución del anticuerpo primario y secundario) durante 1,5 h. Posteriormente, se incubó con 200-250 µl de anticuerpo primario MyoVI 1:500 (25-6791, Proteus BioScience) y se mantuvo a 4°C durante la noche. Al día siguiente, se lavó con PBS durante 5 min con agitación 3 veces. Luego se incubó con 200 µl de anticuerpo secundario anti-conejo rhodamine red X (Jackson Immuno Research Inc.) durante 1,5 a 2 h. Finalmente, se agregaron unas gotas de vecta shield (Vector labs) sobre los portaobjetos con las muestras para luego ser cubierto con un cubreobjeto y sellado con esmalte de uñas por los costados.

5.3.8 Visualización y procesamiento de imágenes

Una vez realizados los experimentos de HIS e inmunofluorescencia sobre los cortes de cóclea, fue posible observar los resultados mediante el uso del microscopio DIC Nikon Eclipse 80i. Para ello se utilizó la fase de campo claro con DIC para observar los resultados de la HIS. Mientras que para observar los resultados de la inmunofluorescencia se utilizó el modo de fluorescencia. Ambas observaciones realizaron con el máximo zoom proporcionado por el equipo, 40x.

Una vez obtenidas las imágenes, estas fueron procesadas en el programa ImageJ (NHI, USA) en el cual se le dio color y se modificaron los niveles de brillo y contraste. Posteriormente, se utilizó el programa Photoshop (Adobe) para generar las uniones de las imágenes.

5.4 PCR en tiempo real

5.4.1 Diseño de partidores para RT-PCR

Para el diseño de los partidores para RT-PCR, se identificaron las zonas comunes entre las diferentes variantes de los transcritos de Nr5a1, Nr4a3 y Tal1. Mediante la herramienta Amplifix (Nicolas Jullien; CNRS, Aix-Marseille Université), se diseñaron los partidores para los transcritos en cuestión. Para ello, se restringió el número de bases del producto de amplificación de 70 a 120 pb, una Tm cercana a los 60 °C, largo de los partidores entre 19-21 pb y el % GC cercano al 50%. Los partidores obtenidos se señalan en la Tabla II.

Tabla II: Secuencia de partidores usados para RT-PCR.

Gen	Tamaño del amplión (pb)	Secuencia de los partidores	Tm (°C)	Número de acceso GeneBank
Nr5a1	95	F: 5'-GTTACTGGACAGGAGGTGGAG-3' R: 5'-TGGAGCACTAACTCTTGGGC-3'	60	NM_139051.3
Tal1	94	F: 5'-TCTGATGGTCCTCACACAAA-3' R: 5'-GCTCAGCAAATGCCCCATTC-3'	60	NM_139051.3
Nr4a3	115	F: 5'-AATGCCCTTGTCGAGCTTT-3' R: 5'-AGAACTGTTGCACGTGCTCA-3'	60	NM_015743.3

F: partidador sentido, R: partidador antisentido.

5.4.2 Extracción de ARN y síntesis de cADN

Para obtener 1 muestra (n=1) de cADN de EV u OC, fue necesario realizar la extracción de ARN de 4 cócleas puesto que estas son muy pequeñas y está bajo el límite de extracción para el kit utilizado. Para este procedimiento se utilizó el kit de extracción PureLink™ RNA Micro Kit (Invitrogen) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Posterior a ello, se midió la concentración de ARN mediante espectrofotómetro (260 nm) diluyendo las muestras en TriHCl 10 mM pH 7.5 (dilución 1:40). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Para la síntesis de cADN, se utilizó el kit SuperScrip III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y se siguieron las instrucciones detalladas por el fabricante.

5.4.3 RT-PCR

A partir del cADN sintetizado como se mencionó anteriormente, se procedió a realizar la mezcla de reacción para el RT-PCR de Nr5a1, Tal1 y Nr4a3. La mezcla de reacción considerada para 16 reacciones estaba compuesta por: 141,6 µl de master mix 2X (SYBR Green PCR master mix, Applied Biosystems), 110,4 µl de agua, 1,4 µl de partidor sentido y 1,4 µl de partidor antisentido, ambos a una concentración de 10 pmol/µl. A continuación, se mezclaron los componentes mediante "up and down" y se centrifugó por unos segundos. Se agregó 31,1 µl de mix de reacción junto con 3,5 µl de muestra (cADN) a unos tubos de 1,5 ml y se mezcló. Luego, se agregaron 15 µl de esta mezcla a los pocillos de una placa de 48 pocillos para RT-PCR. Posteriormente, se selló la placa con las tapas correspondientes y se corrió el ensayo para RT-PCR en el equipo Step One (ThermoFisher). El programa de amplificación utilizado fue en total de 2 h. Los pasos individuales corresponden a 1 ciclo de denaturación a 95°C por 10 min; 40 ciclos de denaturación a 95°C por 15 s seguido por hibridación a 60°C (T_m) por

1 min, una etapa de curva de fusión de 95°C por 15 min y luego a 60°C por 1 min, para finalizar a 95°C por 15 s.

5.4.4 Análisis estadístico

Los resultados de RT-PCR fueron presentados como los promedios \pm SEM de las réplicas en cada estadio (para cada estadio se utilizaron 4 réplicas, cada una correspondiente a 4 cócleas (sea EV u OC)). Se utilizó el programa GraphPad Prism 6 para el análisis de los datos y el diseño de gráficos. Para evaluar la normalidad de los datos obtenidos se utilizó el test Shapiro Wilk. En el caso de los datos normales se realizó un Anova de una vía en conjunto con el test de Tukey (valores significativos $^* : p > 0,05$), en el caso contrario se utilizó el test estadístico Krustal Wallis.

6 Resultados

6.1 Selección de genes candidatos para su posterior validación.

A partir de una lista de genes con expresión diferencial proveniente de un ARN-Seq realizado en base a ARNm total de CS aisladas en etapa postnatal 1 y 6 (P1 y P6), se evaluaron diferentes parámetros con los cuales se logró seleccionar tres genes para su posterior validación. Si bien la técnica de ARN-Seq es más precisa que su antecesor, los microarreglos, todavía presenta una alta tasa de error. Los errores pueden ser ocasionados por sesgos en la abundancia de las secuencias leídas producto de una preferencia de los partidores por el ARN, la selección del tamaño de los fragmentos y contenido de GC; así como errores de secuenciación por cambio, inserción o deleción de una base. Estos errores pueden tener un gran impacto en el análisis bioinformático conduciendo a conclusiones erróneas con respecto al conjunto de transcritos de ARNm por lo cual se hace necesario validar estos resultados mediante técnicas como RT-PCR y HIS.

Con el objetivo de validar los resultados arrojados por ARN-Seq, se evaluó una lista de genes en base a una serie de criterios con los cuales se logró seleccionar tres genes para su posterior validación. El primer criterio a considerar fue su valor de lecturas por kilobase de un millón de lecturas mapeadas (RPKM) a P1, P6 y la relación entre estos dos (Tabla III). Esto consiste en una medida cuantitativa de la expresión génica de los datos obtenidos por ARN-Seq. Se prestó principal atención a aquellos genes que tenían una alta expresión en P1 y/o un valor significativo en la relación P1/P6, puesto que es en esta etapa donde existe un potencial regenerativo. Además, se eligieron sólo aquellos genes que fueran factor de transcripción, ya que las

Investigaciones enfocadas a comprender el fenómeno de la pérdida de regeneración y la búsqueda de una transdiferenciación funcional y estable están directamente relacionadas con la regulación de la transcripción del ADN. Junto con ello, se tuvo en cuenta la cantidad de información (publicaciones) respecto a los genes, puesto que con esta investigación también se pretende aportar al conocimiento de los genes seleccionados.

Tabla III. Genes seleccionados en base a una lista de genes potenciales expresados en células de sostén.

Símbolo	Nombre	P1 RPKM	P6 RPKM	P1/P6 (tasa de cambio)
Nr5a1	Receptor nuclear , subfamilia 5, grupo A, miembro 1	62,9	3,65	17,2*
Tal1	Gen de leucemia linfoide aguda de células T 1	2795,17	71,13	39,3*
Nr4a3	Receptor nuclear , familia 4, grupo A, miembro 3	4013	2591,13	1,5 (ns)

ns: no significativo. *:p<0,01.y q<0,001.

En consecuencia, se eligió el receptor nuclear de la subfamilia 5, grupo A, miembro 1 (Nr5a1), el receptor nuclear, subfamilia 4, grupo A, miembro 3 (Nr4a3) y el gen de leucemia aguda linfoide de células T 1 (Tal1). Todos ellos descritos como factores de transcripción. Si bien, Nr5a1 tiene una baja expresión génica en comparación con los otros dos genes seleccionados tanto en P1 como en P6, la tasa de cambio P1/P6 resulta significativa por una mayor expresión de este en el estadio P1. Tal1 es el que presenta una mayor tasa de cambio P0/P6 debido a su alta expresión en P1. Nr4a3 es

el gen con mayor expresión en el estadio P1, pero como también posee una alta expresión en P6 su tasa de cambio resulta no significativa (Tabla III).

Tanto la expresión de Nr5a1 como Tal1 nunca habían sido descritas en el oído interno, a diferencia de Nr4a3 que ha sido descrito en el desarrollo del canal semicircular (parte del órgano del equilibrio), expresándose en las células epiteliales no sensoriales localizadas en el borde interior de los canales semicirculares y en las paredes ampulares y utriculares (Ponnio y col., 2002), sin embargo, su expresión en OC nunca ha sido evidenciada.

6.2 Validación de la expresión de Nr5a1, Tal1 y Nr4a3 en órgano de Corti.

Para validar la expresión de los genes seleccionados, se llevó a cabo la técnica HIS en cócleas de ratones recién nacidos y ratones con 6 días de nacidos (P0 y P6).

Para ello, se diseñaron dos pares de partidores para cada gen seleccionado como para el control positivo (todos los partidores antisentido contenían en su extremo 5' la secuencia del promotor del fago T7 para su posterior transcripción). Luego, se llevó a cabo un PCR y se corroboró la obtención de los productos de reacción esperados mediante digestión enzimática y secuenciación. Posteriormente, se procedió a sintetizar la ribosonda (completa e hidrolizada) mediante transcripción *in vitro*. En paralelo, se disecaron cócleas de ratón CF-1 en estadio postnatal 0 y 6, sobre los cuales se realizó la hibridación *in situ* de explantes cocleares completos.

Como control positivo de expresión en CS se utilizó Hes5, cuya expresión es importante en el OC, comenzando en los estadios embrionarios tardíos de ratón, persistiendo durante la primera semana de nacido y luego decayendo; hasta desaparecer en el adulto (Hartman y col., 2009).

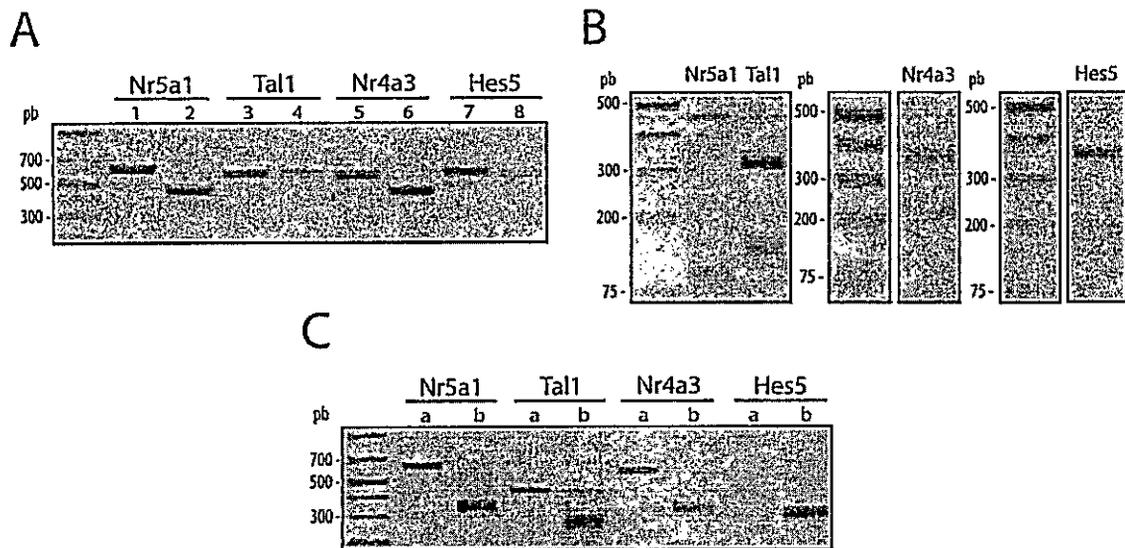


Figura 2: Síntesis de ribosondas mediante transcripción *in vitro*. A. Electroforesis de los productos de PCR amplificados con dos pares de partidores por cada gen. B. Digestión de los productos de PCR amplificados con los partidores seleccionados. Los fragmentos obtenidos de cada digestión correspondieron a los tamaños esperados para Nr5a1 (455 y 172 pb), Tal1 (304 y 129 pb), Nr4a3 (350 y 220 pb) y Hes5 (343, 173 y 49 pb). C. Gel representativo del producto de PCR (a) con el cuál se realizó la transcripción *in vitro* para la obtención de la sonda (b). En los carriles b destacan dos bandas de las cuales la de mayor tamaño corresponde a ADN sin transcribir (previo a la degradación del ADN), mientras que las bandas de menor tamaño corresponden a la sonda de ARN.

De los dos pares de partidores diseñados para cada gen, ambos resultaron amplificar los fragmentos del tamaño esperado, sin embargo se eligió sólo un par para cada gen. Los seleccionados corresponden a aquellos con mejor rendimiento al realizar el PCR, lo cual estuvo determinado por la intensidad de la banda en el gel de agarosa, la presencia de una sola banda y la concordancia con el tamaño esperado. Los partidores seleccionados corresponden al partidor 1 para Nr5a1 (627 pb), partidor 3 para Tal1 (433 pb), partidor 6 para Nr4a3 (570 pb) y partidor 8 para Hes5 (565 pb) (Figura 2.A).

...
Luego de las respectivas digestiones enzimáticas a los productos de reacción amplificados con los partidores seleccionados (enzimas señaladas en la sección de Materiales y métodos 5.3.3), se observó que las bandas obtenidas en el gel de agarosa correspondieron a los fragmentos de ADN de tamaño esperado para cada digestión (Figura 2.B). A su vez, los resultados de la secuenciación arrojaron concordancia entre el producto de reacción esperado *in silico* y el obtenido por PCR (datos no mostrados).

Durante la síntesis de las ribosondas se realizó una electroforesis previa a la degradación del ADN confirmando la existencia de una banda más intensa que el templado utilizado en la reacción de síntesis de la sonda (Figura 2.C). Esto confirma que la transcripción ha sido exitosa. Una vez terminada la síntesis (posterior a la degradación del ADN templado mediante el uso de la enzima DNasa I) se realizó una electroforesis a alto voltaje con lo cual se comprobó la presencia de una sola banda íntegra, lo que da cuenta de la obtención de una sonda de ARN no degradada.

Una vez obtenidas las sondas se llevó a cabo las HIS en explantes cocleares completos en estadio P0 y P6. En un comienzo, las HIS fueron realizadas con sondas

hidrolizadas las cuales tuvieron un tamaño de entre 200-300 pb lo que les permite penetrar de mejor manera el tejido pero a la vez esto las hace más inespecíficas (detallado en Materiales y Métodos 5.3.4) y sondas no hidrolizadas (la de mayor tamaño fue Nr5a1 con 627pb) en diferentes concentraciones para establecer la mejor combinación para cada sonda y así obtener una marca adecuada. En consecuencia, los mejores resultados fueron obtenidos con la sonda intacta en las concentraciones de 0,01667 ng/ μ l para Nr5a1, Nr4a3 y Hes5, y para Tal1 fue de 0,05 ng/ μ l. Los tiempos de incubación luego de comenzada la reacción de color en tampón fosfato (AP) con NBT/BCIP fueron de 5,5 h para Nr5a1, 18 h para Nr4a3, 21-22 h para Tal1 y 7 h para Hes5.

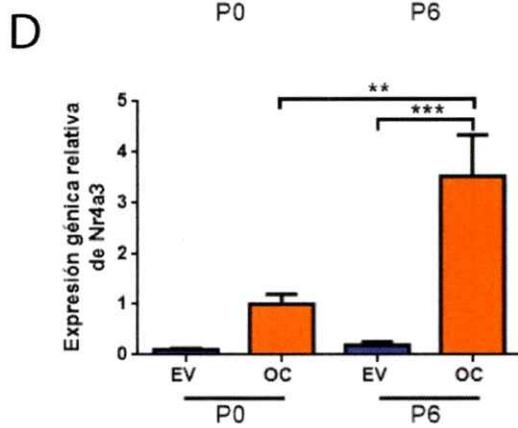
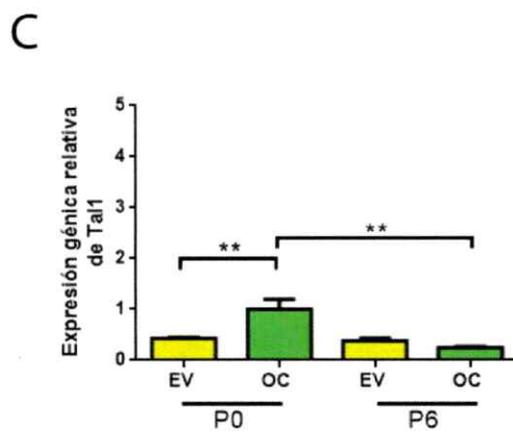
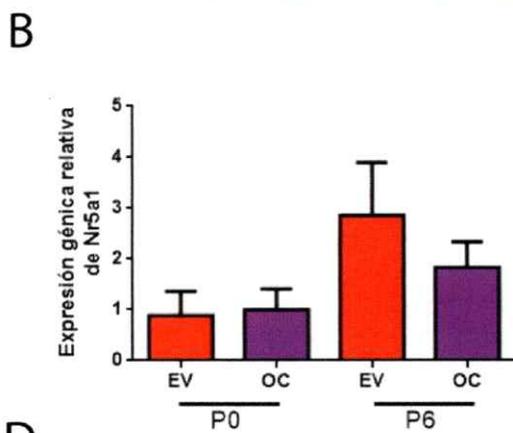
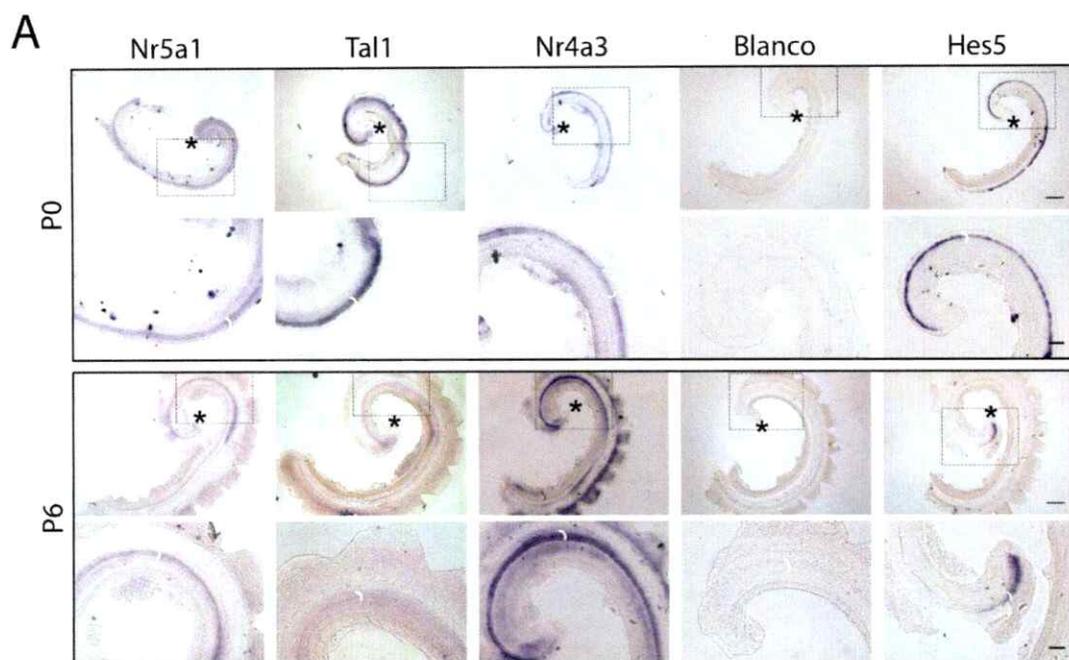


Figura 3: Validación de la expresión diferencial de Nr5a, Tal1 y Nr4a3 en Órgano de Corti de ratón en estadios P0 y P6. A. Hibridación *in situ* (HIS) de los mensajeros de Nr5a1, Tal1, Nr4a3 y Hes5 (control positivo) en explantes de cócleas de ratones de 0 y 6 días de nacidos. Columna Blanco corresponde al control negativo (sin sonda). Filas inferiores en cada estadio corresponden a un zoom de la imagen superior. Asterisco señala el ápice de la cóclea. Cuadrado con líneas discontinuas señala la zona ampliada. Corchete blanco señala OC. Escala: 300 μm filas superiores y 50 μm filas inferiores. B, C y D. Gráficos representativos de los resultados de RT-PCR obtenidos al amplificar específicamente cADN de Nr5a1, Tal1 y Nr4a3 respectivamente, en estría vascular (EV) y órgano de Corti (OC) en los estadios P0 y P6. Los datos fueron normalizados en base a la expresión del gen en OC en el estadio P0. Sólo los datos de Tal1 y Nr4a3 fueron normales (test Shapiro Wilk), los cuales fueron evaluados mediante Anova y test de Tukey. En tanto Nr5a1 fue evaluado mediante krustal-Walis. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=4). Prueba de Tukey, *:p<0,05, **:p<0,001. Solo se muestran asteriscos en las pruebas significativas.

Mediante la visualización de los explantes a campo claro en microscopio DIC fue posible apreciar una clara expresión de estos genes en el OC en cócleas en estadio P0 y P6. Sin embargo, la marca obtenida en P6 no fue tan intensa como en P0 para las sondas de Nr5a1, Tal1 y el control positivo Hes5, donde la marca en Nr5a1 y Hes5 es referentemente apical. Tal1 destaca por una marcada expresión en P0 al igual que Nr4a3 pero este en estadio P6.

Para confirmar los datos entregados por ARN-Seq y validar de manera cuantitativa la expresión de estos genes observados mediante HIS, se realizó RT-PCR en EV y OC. La EV consiste en un epitelio estratificado que forma el borde endolinfático del conducto coclear y que está ubicado hacia lateral en la escala media, lugar donde también se encuentra el OC pero este se encuentra en la pared basal en su región más medial. La EV fue utilizada como control de la expresión específica en OC empleando otro tejido coclear. Los resultados de RT-PCR muestran una expresión no significativa entre EV/OC en P0/P6 para Nr5a1. Estos resultados no concuerdan con lo observado en las HIS ni con los datos obtenidos por ARN-Seq, puesto que por RT-PCR se observa una mayor expresión en P6 e incluso, más alta en EV que OC. Además, presenta una expresión similar entre EV y OC en P0 siendo que por HIS se observa una mayor expresión en el OC. Cabe destacar, que en OC P6 sólo se obtuvieron dos resultados de los cuatro cADN utilizados siendo la detección en este estadio más difícil de obtener. Por otra parte, Tal1 se expresa más en OC de P0 que P6 y en P0 esta expresión es mayor en OC que EV. Estos resultados se relacionan directamente con lo observado en las HIS. En tanto, Nr4a3 se expresa específicamente en OC en estadio P6 y siendo ésta muy baja en EV. Además, su expresión aumenta significativamente de P0 a P6 lo cual es respaldado por lo observado en las HIS.

6.3 Validación de la expresión de Nr5a1, Tal1 y Nr4a3 en células de sostén.

Para lograr identificar si efectivamente estos genes se estaban expresando en las CS, se realizaron cortes de las cócleas P0 a las cuales previamente se les había realizado HIS (primera fila Figura 3.A), por lo tanto los cortes no incluyen el resto del conducto coclear ni la región de la EV. Estos cortes fueron de 14 μm para lo cual se utilizó un criostato. Una vez obtenidos los cortes, se procedió a realizar una inmunofluorescencia anti miosina VI (MyoVI) con el objetivo de tefir las CC y así poder distinguir y discriminar de mejor manera la arquitectura celular.

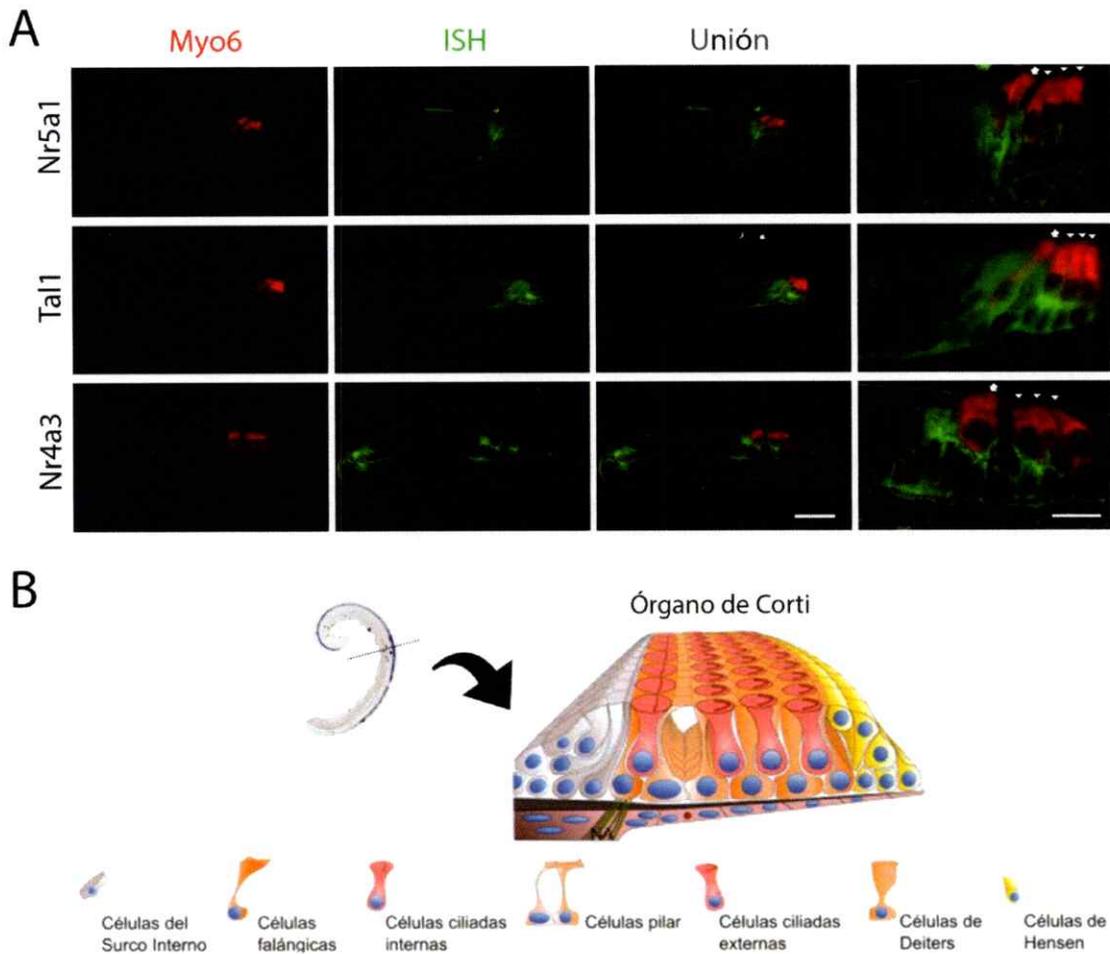


Figura 4: Confirmación de la expresión de Nr5a, Tal1 y Nr4a3 en células de sostén en estadio P0. A. Cortes apical-medial de las cócleas en estadio postnatal 0 a las cuales se les había realizado hibridación *in situ* (primera fila Figura 3.A) e inmunofluorescencia anti Myo 6 (rojo); grosor: 14 μ m. Columna de la izquierda señala la inmunofluorescencia anti MyoVI donde se observan las CC. Segunda columna corresponde a una imagen pseudo-coloreada verde del precipitado azul obtenido con HIS. Tercera columna corresponde a la unión de las imágenes precedentes. Columna de la derecha corresponde a un zoom de la unión. Escala primeras tres columnas: 50 μ m, zoom de la unión: 25 μ m. Flecha indica célula ciliada interna (CCI), cabeza de flecha indica CC externas (CCE). B. Esquema representativo del OC luego de cortar

transversalmente una cóclea. En él se pueden apreciar los diferentes tipos celulares con lo cual se logra obtener un mejor reconocimiento de A (imagen modificada de (Maass, 2010).

En la columna izquierda de la Figura 4.A se aprecia con claridad las CC (rojo) en cada corte. A continuación, se observa el precipitado azul obtenido con la HIS el cual fue pseudo-coloreado verde. Cada HIS tiene un patrón de marca diferente, sin embargo es posible apreciar con claridad que esta expresión ocurre en las CS. En la columna siguiente, se observa la unión de las imágenes en color rojo y verde con lo cual se pudo distinguir más fácilmente la marca obtenida con HIS.

Gracias a la Figura 4.B y al zoom digital señalado en la columna de la derecha de la Figura 4.B, fue posible distinguir el tipo celular marcado con HIS en cada corte. En el caso de Nr5a1 en el OC, se observa una marca intensa en las células pilar, una marca más débil en las células de Deiters y una marca difusa medial y fuera del OC en las células del limbo espiral (Figura 4.A), representado en el esquema Figura 1.C. En Tal1, en el OC se observa una marca muy intensa en la base de las CC externas, así como una marca intensa en las células de Deiters, pilar y falángicas, y fuera y medial al OC una marca difusa en las células del borde y del limbo espiral en las regiones superior e inferior de éste. En Nr4a3, se observa una marca intensa en la zona inferior de la primera CCI, en la célula falángica y una marca débil en las células de Deiters. También se observa una marca intensa hacia medial del OC en la parte inferior y superior del limbo. Además, en el extremo izquierdo del corte se aprecia una alta expresión de Nr4a3 en posibles neuronas del ganglio espiral. Cabe destacar, que en todos los cortes la marca obtenida con HIS está situada en el citoplasma de las células teñidas.

Debido a que la expresión de Nr5a1 entre los estadios estudiados no sufre un cambio importante (baja intensidad en ambos estadios) en comparación a los otros genes estudiados, y además, debido a que no fue posible obtener partidores confiables

(estables en las mediciones) para RT-PCR, este gen no fue elegido para realizar el estudio de expresión temporal. Además, los resultados obtenidos se contradicen con los señalados por ARN-Seq por lo que la expresión de este gen en OC no fue validada.

6.4 Evaluación de la expresión temporal de Tal1 y Nr4a3 en células de sostén y órgano de Corti.

Una vez validada la expresión de estos genes en CS se procedió a estudiar el patrón de expresión temporal de Tal1 y Nr4a3 para lo cual se desarrolló HIS en cócleas de ratones en estadios pre y postnatales temprano (E13.5, E16.5, E18.5, P0, P3 y P6 para Tal1 y E18.5, P0, P3 y P6 para Nr4a3). Además, se realizó RT-PCR para determinar el nivel de expresión de estos genes en los estadios señalados, excepto E13.5.

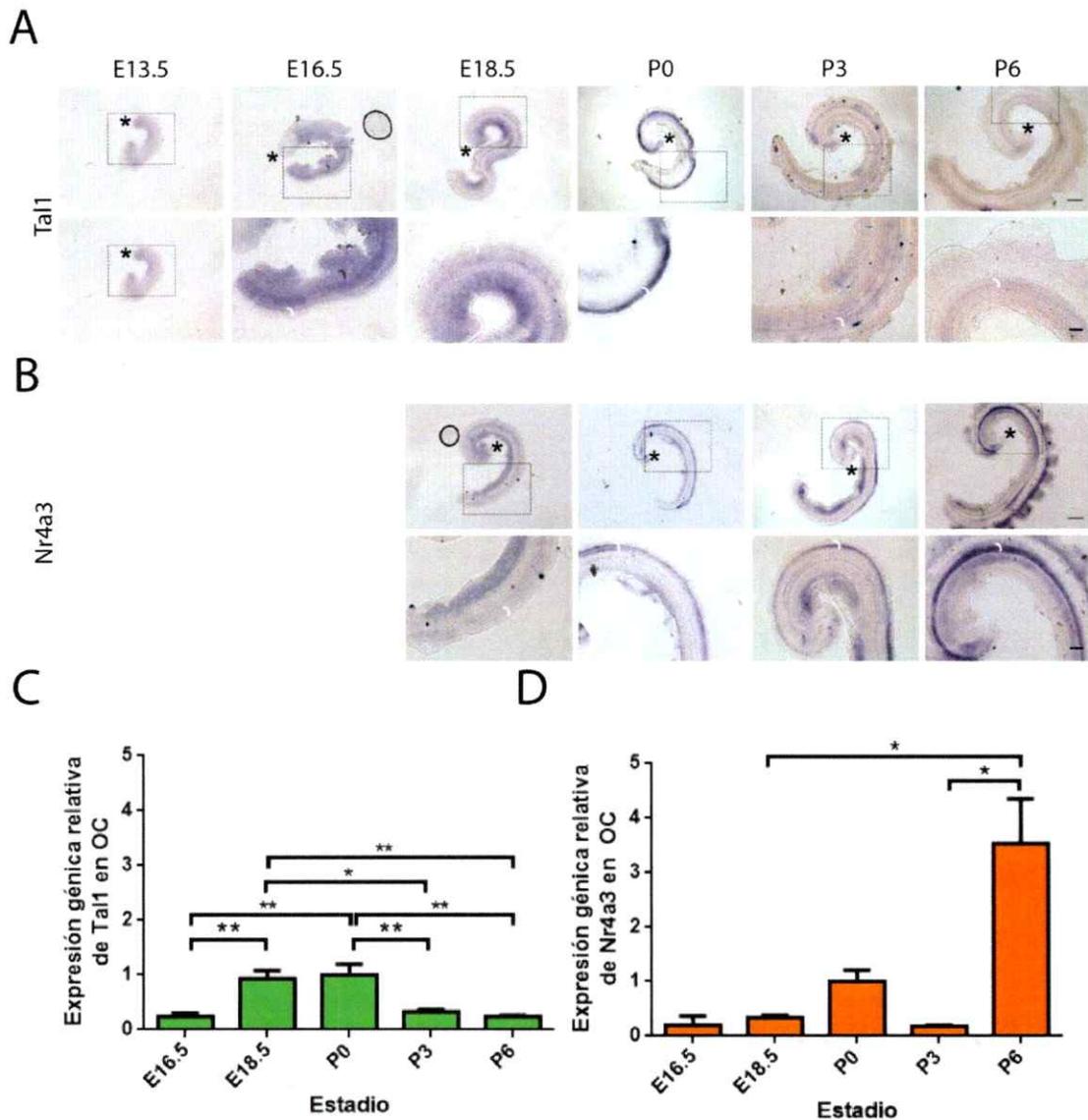


Figura 5: Perfil de expresión temporal de Tal1 y Nr4a3. A. Hibridación *in situ* del mensajero de Tal1 en cócleas de ratones en los estadios prenatales E13.5, E16.5, E18.5 y postnatales P0, P3 y P6. B. Hibridación *in situ* del mensajero de Nr4a3 en cócleas de ratones en los estadios prenatal E18.5 y postnatales P0, P3 y P6. Fila inferior en A y B corresponde a un zoom de la imagen superior. Asterisco señala el ápice de la cóclea. Cuadrado con líneas discontinuas señala la zona amplificada. Corchete blanco señala OC. Escala: 300 μm fila superior y 50 μm fila inferior en A y B. C-D. Gráficos representativos de los resultados de RT-PCR obtenidos al

amplificar específicamente cADN de Tal y Nr4a3, respectivamente, en los estadios pre y postnatales E16.5, E18.5, P0, P3 y P6 para ambos. Los datos fueron normalizados en base a la expresión del gen en el estadio P0. Mediante el test de Shapiro-Wilk se evaluó normalidad. Los datos de Tal1 fueron evaluados por ANOVA y test de Tukey, en tanto Nr4a3 fue evaluado por el test de Krustal Walis. Los resultados corresponden al promedio \pm SEM (n=4).*:p<0,05 y **:p<0,001.

El patrón de expresión temporal de Tal1 en el OC determinado mediante HIS comienza con una muy baja expresión en el estadio E13.5, el cual va aumentando hasta alcanzar su máxima expresión en P0 la que luego decae drásticamente hacia P3 y P6 (Figura 5.A). En los estadios prenatales es posible observar una mayor marca hacia el ganglio (zona interna de la cóclea, ver esquema Figura 1.C) que en OC, a diferencia de los estadios postnatales en los cuales la expresión es principalmente en OC. Los puntos azules que se aprecian en el estadio P3 corresponden a precipitado inespecífico producto de la técnica utilizada. El patrón de expresión de Tal1 determinado por RT-PCR confirma una máxima expresión en E18.5 y P0 los cuales son significativamente distintos a la expresión obtenida en los otros estadios. La disminución de la expresión de Tal1 hacia el estadio P3 y P6 concuerda con lo observado por HIS y lo determinado por ARN-Seq.

Al observar las HIS en cócleas de los distintos estadios indicados para Nr4a3, se aprecia una alta expresión en P0, P3 y P6, siendo es este último bastante intensa. En el estadio prenatal E18.5 se observa una leve expresión de Nr4a3 en el OC, pero una mayor expresión en la zona del ganglio. En el estadio P6, también es posible apreciar una alta expresión de Nr4a3 en la EV (hacia lateral de la cóclea). A diferencia de lo señalado en el gráfico de RT-PCR para Nr4a3 (Figura 5.D), la HIS en P3 presenta una marcada expresión en el OC, menor a P6, pero bastante similar a P0. Por RT-PCR se confirma que la expresión más alta de éste corresponde al estadio P6 y que este es significativamente diferente de E18.5 y P3, lo cual concuerda con lo observado en la HIS. Sin embargo, esta expresión no es significativamente distinta de P0 aunque existe una tendencia al aumento de P0 hacia P6. Esto se contradice con lo

obtenido en ARN-Seq, donde la expresión en P0 es mayor que en P6, pero su relación P0/P6 no es significativa.

Cabe destacar que para la realización del RT-PCR se utilizó todo el OC, por ende los resultados obtenidos corresponden a la expresión de estos genes tanto en CS como en otras células del órgano en las cuales también se pueden estar expresando.

7 Discusión

La falta de conocimiento en relación a las causas de la pérdida del poder regenerativo y el perfil de expresión génico de las células del OC, limitan los avances hacia la restitución de la audición en mamíferos. Es importante conocer más sobre la expresión génica de las CS ya que estas mantienen su morfología en el epitelio luego del daño, convirtiéndose en el blanco celular más atractivo para restituir las CC y por ende la audición.

Con el objetivo de conocer más sobre el perfil de expresión génico de estas células, se validó la expresión de Nr5a1, Tal1 y Nr4a3, genes seleccionados para su estudio principalmente por tener una mayor expresión en estadio P0 que en P6. Esta es una característica interesante a estudiar debido a que es en esta etapa del desarrollo donde se ha logrado la transdiferenciación exitosa de CS a CC, sin embargo esta respuesta no es mantenida en el tiempo (Izumikawa y col., 2005; Oesterle y col., 2011). Junto con ello, esta etapa coincide con el momento en que en el tejido del OC aparece una disminución notoria e importante en la respuesta regenerativa (Maass 2015).

Cabe señalar que durante el desarrollo de un organismo pluricelular actúan estrategias de expresión génica comunes que dan origen a la variedad de órganos y tipos celulares diferentes de un individuo (Cooper, 2000). Es por esto que resulta importante estudiar la expresión de genes ya estudiados en otros sistemas durante el desarrollo y de los cuales no se han estudiado en el órgano de la audición.

Nr5a1 (también conocido como SF-1) es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que codifica para un factor de transcripción el cual está

involucrado en la determinación del sexo y en el desarrollo reproductivo y adrenal humano mediante la regulación de los promotores de genes androgénicos (Luo y col., 1994). Antecedentes señalan que variaciones de este gen causan agénesis adrenal, disgénesis testicular (desarrollo anormal del testículo) con un subsecuente fenotipo femenino o reducción de la producción de andrógenos, insuficiencia ovárica primaria (pérdida de la función normal de los ovarios antes de los 40 años) e hipospadia (afección en la cual la apertura que drena la orina está ubicada en la parte inferior del pene) (Luo y col., 1994; Shinoda y col., 1995). Este gen fue elegido para la validación de su expresión debido a que tiene una expresión significativa durante el desarrollo postnatal temprano y por su participación en el desarrollo de otros sistemas. Los resultados obtenidos por HIS indican que Nr5a1 se expresa en el OC y que su expresión varía temporalmente (Figura 3.A). En los cortes de cóclea se observó expresión de Nr5a1 en las células pilares, células falángicas y en general en la zona bajo las células ciliadas internas. También es posible observar una expresión menos intensa en las células de Deiters (Figura 4.A). Los datos obtenidos por RT-PCR indican que la expresión de Nr5a1 tiende a ser mayor en P6 que en P0, siendo mayor en la EV que en OC. Estos resultados se contradicen con lo observado en las HIS y lo señalado por ARN-Seq, lo cual se puede atribuir a que el equipo utilizado para RT-PCR no logró detectar regularmente la señal emitida por el cADN unido a fluoróforo debido a que desde un comienzo la cantidad de cADN fue baja, es decir, Nr5a1 presenta una baja expresión en cóclea en los estadios estudiados, lo que a su vez se corrobora con los valores de RPKM señalados en la Tabla III. Cabe destacar, que para lograr amplificar adecuadamente el cADN de este gen fue necesario diseñar y probar cuatro pares de partidores fallidos hasta dar con el utilizado en este seminario de título (Tabla II), ya que siempre se obtuvieron valores del ciclo umbral (Ct) bajos, es decir, una baja

expresión de este gen en las muestras analizadas. Por todo lo mencionado anteriormente, la expresión de Nr5a1 no fue validada puesto que los resultados obtenidos en este seminario de título fueron contradictorios a los obtenidos por ARN-Seq. Por consiguiente, debido a estos resultados contraproducentes y a que su expresión cambia levemente entre P0 y P6 comparado con los otros genes candidatos, Nr5a1 no fue elegido para realizar el estudio de expresión temporal.

Nr4a3 (también conocido como Nor-1, receptor nuclear de hormona) es uno de los tres miembros de la familia de receptores nucleares (NR) 4 subgrupo A. Este gen codifica para una proteína que actúa como factor de transcripción el cual está involucrado en la regulación de la proliferación, supervivencia de variados tipos celulares y también en metabolismo e inflamación (Ranhotra, 2015). Entre sus principales roles está la mediación de la proliferación vascular del músculo liso, células progenitoras mieloides y células pancreáticas del tipo B. También, media la supervivencia neuronal inducida por CREB, regula la translocación de SLC2A4 (transportador de glucosa) a la superficie celular y durante la gastrulación juega un rol crucial en la formación de mesodermo anterior mediante el control de la migración celular (Liu y col., 2013; Medunjanin y col., 2015; Ranhotra, 2015). Defectos en este gen son una de las causas del sarcoma de Ewing que consiste en tumores y metástasis de células primitivas de hueso y tejidos blandos que afecta a niños y adolescentes (Agaram y col., 2014). A diferencia de los otros genes seleccionados para su validación en OC, Nr4a3 si ha sido descrito en oído interno donde desempeña un papel como mediador clave de la fase de crecimiento proliferativo en el desarrollo del canal semicircular (Ponnio y col., 2002) pero su expresión no había sido descrito en el órgano de la audición. Según los resultados obtenidos en este seminario de título,

por primera vez se describe la expresión de Nr4a3 en el OC durante la primera semana del desarrollo del ratón. El estadio donde se observa la mayor expresión de este gen es en P6 lo cual fue verificado tanto por HIS como RT-PCR (Figura 5.B y D). Estos resultados, no concuerdan con los obtenidos por ARN-Seq donde se señala una mayor expresión en P0 que P6, sin embargo la relación P0/P6 resulta no significativa (Tabla III). Ponnio 2012, indica que durante el desarrollo ótico temprano, Nr4a3 se expresa en el canal semicircular formando las placas de fusión. Después de la formación de la cóclea, Nr4a3 es expresado en el vestíbulo limitándose a las células epiteliales no sensoriales localizadas en el borde interior de los canales semicirculares, paredes ampulares y utriculares. Según los cortes de la cócleas con HIS e inmunofluorescencia, Nr4a3 se expresa principalmente en la zona inferior de la primera célula ciliada externa y en la célula falángica en estadio P0 (Figura 4.A). La alta expresión de este gen al final de la primera semana de nacido, sugiere que podría estar involucrado en la pérdida de potencial regenerativo observado luego de lograr la transdiferenciación eficiente en estadio postnatal temprano (Izumikawa et al., 2005; Mizutari et al., 2013; Tona et al., 2014). Considerando lo mencionado anteriormente, Nr4a3 podría estar inhibiendo los genes involucrados en la reentrada al ciclo celular en las células de sostén en las cuales se demostró su expresión durante P0. De esta manera, el aumento en la expresión de Nr4a3 de P0 a P6 podría significar una inhibición directa sobre genes que permiten la entrada y mantención en el ciclo celular. Por tanto, resulta interesante seguir evaluando este gen mediante la modulación de su expresión en cócleas sanas y con daño, con el objetivo de investigar su posible rol en la detención del potencial regenerativo.

Tal1 (también conocido como SCL-1) es un factor de transcripción miembro de la familia hélice-bucle-hélice base (bHLH). Experimentos de "gene targeting" han revelado que este gen es crucial para el desarrollo de la hematopoyesis primitiva en ratón y también es requerido para la generación de todo el linaje hematopoyético en adulto (Robb & Begley, 1997). Está asociado a enfermedades que incluyen la leucemia linfocítica aguda de células T y leucemia aguda linfoblástica de precursores de células T (Q. Chen y col., 1990). Los resultados de HIS y RT-PCR para Tal1 confirman lo señalado por ARN-Seq. Esto consiste en una alta expresión en P0 en comparación con los otros estadios estudiados, la que disminuye drásticamente hacia P3-P6. A E18.5, Tal1 se observa ubicuamente en la cóclea con una marca más intensa hacia la zona del ganglio que en OC. Por RT-PCR, E18.5 y P0 corresponden a los niveles más altos de expresión en el perfil de expresión pre y postnatal temprano, etapa en que ocurre la diferenciación terminal de CC y CS (Figura 5.C). Antecedentes señalan que la activación de la vía de señalización Notch acelera la degradación de TAL1 a través de vías dependientes de proteosomas mediados por ubiquitina *in vitro* (Nie y col., 2008). En el contexto de la audición, la activación de esta vía de señalización y por consiguiente la degradación de TAL1, podrían indicar que este gen actúa inhibiendo la diferenciación celular de CC y CS en estadios postnatales E14.5-E17.5. Junto con esto, existe la posibilidad de que TAL1 regule la transcripción mediante la manipulación del código de histonas y la estructura local de la cromatina (Huang y col., 2000). En vista de este antecedente, Tal1 podría estar jugando un rol importante en la pérdida del potencial regenerativo impidiendo la regeneración de las CC en etapa postnatal temprana mediante una modificación directa del ADN. Por otra parte, estudios de inhibición de la ruta de Notch mediante el uso de la droga DAPT (ensayos realizados por el laboratorio de Andrew Groves (datos no publicados)) apuntan a una disminución

de la expresión de Tal1, lo cual sugiere que este gen se encontraría río abajo de Notch. Sin embargo, en etapa postnatal temprana no resulta claro si Tal1 jugaría un rol en el término del potencial regenerativo, puesto que podría estar inhibiendo la diferenciación celular; o de manera opuesta, estaría otorgando potencial regenerativo. Se ha reportado que la ausencia de la señalización Notch-Hes5 en cócleas adultas normales y dañadas se correlaciona con la falta de potencial regenerativo, mientras que su activación en la cóclea neonatal se asocia con una mayor capacidad para la plasticidad o regeneración del tejido, lo que sugiere que esta vía puede estar involucrada en la regulación del potencial regenerativo (Hartman y col., 2009). Siguiendo esta idea, si Tal1 es un gen blanco río abajo de la señalización Notch en CS, podría actuar de manera similar que Hes5 debido a que su expresión en P0, que es la más alta dentro de los estadios estudiados, baja significativamente hacia P3-P6 tal como ocurre con Hes5. Por otro lado, antecedentes reportan que en un perfil de expresión génica hematopoyética defectuosa ocasionada por el bloqueo de la vía de señalización Hedgehog (Hh), manteniendo inhibida la vía de señalización Notch, la sobreexpresión de Tal1 rescata el fenotipo. Esto sugiere que Tal1 podría estar río abajo en la señalización de Hh, del cual se ha reportado su participación en la regulación de las propiedades de las células prosensoriales durante la diferenciación de las CC en una onda basal-apical en cóclea de mamífero (Tateya y col., 2013). Además al integrar estos antecedentes más los resultados obtenidos en este seminario de título, se podría plantear que Tal1 podría estar formando parte de la comunicación entre estas dos vías de señalización (Notch y Hh), además de estar involucrado en la inhibición de la diferenciación celular en estadio prenatal, y en forma opuesta, otorgar potencial regenerativo en estadio postnatal temprano, como el supuesto rol de Hes5 en este periodo. Si bien, lo anteriormente señalado corresponde a un ejercicio teórico de los

posibles roles que podría estar jugando Tal1 en el órgano de la audición, es necesario estudiar este gen en mayor profundidad confirmando estas suposiciones en futuras investigaciones. Resulta interesante realizar ensayos de pérdida de función de Tal1 o inhibición de la ruta de Notch/Hh para comprender el posible rol que podría estar cumpliendo este gen en OC en etapa pre y postnatal el cual podría estar interactuando con el ADN mediante un complejo proteico tal como ocurre en hematopoyesis el cual se asocia a las proteínas LMO1, E2a, Gata1 (complejo Ldb1) (Love y col., 1997).

Conocer más sobre las rutas en las cuales puedan estar involucrados estos genes puede resultar importante para la búsqueda de nuevos blancos génicos considerando que para la transdiferenciación de CS a CC es necesario una proliferación de CS que no altere la estructura del OC el cual es esencial para mantener la funcionalidad del órgano sensor. La modificación de la expresión de genes o rutas de señalización involucradas en la morfogénesis del oído interno, la salida del ciclo celular o diferenciación de CC han resultado en el restablecimiento de las CC en modelos donde se ha inducido sordera. Por tanto, es de gran interés evaluar el efecto de la activación/inhibición de estas rutas de señalización con y sin daño de las CC en los genes validados en este seminario de título, para así comprender la pérdida de potencial regenerativo, o bien encontrar nuevos blancos terapéuticos que mediante el uso de terapia génica permitan restituir las CC y lograr una respuesta regenerativa estable, significativa y más fisiológica.

8 Conclusión

- Se validó la expresión de Tal1 y Nr4a3 en las CS en los estadios P0 y P6, cuyos transcritos nunca antes habían sido descritos en OC.
- Nr4a3 tiene un máximo de expresión en el estadio P6 el cual comienza a ser notorio una vez nacido el ratón (P0)
- Tal1 presenta un máximo de expresión en el estadio P0. Posterior a ello decae drásticamente hacia P3-P6, siendo levemente visible por HIS a este estadio. Esto se relaciona directamente con los valores obtenidos por ARN-Seq.
- Como proyección, resulta interesante evaluar la expresión de Nr4a3 y Tal1 en ensayos de activación/inhibición de rutas de señalización involucradas en el desarrollo del oído interno, así como también evaluar el efecto de aumentar o disminuir la expresión de estos genes ya que estos podrían estar comprometidos en la pérdida del potencial regenerativo o bien, estos estudios podrían dar luces sobre nuevos blancos terapéuticos que mediante el uso de terapia génica permitan restituir la audición.

9 Referencias

- Agaram, N. P., Zhang, L., Sung, Y.-S., Singer, S., y Antonescu, C. R. (2014). Extraskeletal myxoid chondrosarcoma with non-EWSR1-NR4A3 variant fusions correlate with rhabdoid phenotype and high-grade morphology. *Human Pathology*, 45(5), 1084–91.
- Chen, P., Johnson, J. E., Zoghbi, Huda, Y., y Segil, N. (2002). The role of Math1 in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination. *Development*, 129(10), 2495–505.
- Chen, Q., Cheng, J. T., Tasi, L., Schneider, N., Buchanan, G., Carroll, A., Baer, R. (1990). The tal gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein. *The EMBO Journal*, 9(2), 415–24. Retrieved from
- Cooper, G. (2000). Signaling in Development and Differentiation. In *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland (MA).
- Cotanche, D. A. (1987). Regeneration of hair cell stereociliary bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma. *Hearing Research*, 30.
- Fekete, D., y Wu, D. (2002). Revisiting cell fate specification in the inner ear. *Elsevier Science*, 35–42.
- Fujioka, M., Okano, H., & Edge, A. S. B. (2015). Manipulating cell fate in the cochlea: A feasible therapy for hearing loss. *Trends in Neurosciences*, 38(3), 139–144.
- Gubbels, S. P., Woessner, D. W., Mitchell, J. C., Ricci, A. J., & Brigande, J. V. (2008). Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer. *NIH Public Access*, 455(7212), 537–541.
- Harris, J. (2003). Neomycin-Induced Hair Cell Death and Rapid Regeneration in the Lateral Line of Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO*, 234, 219–234.
- Hartman, B. H., Basak, O., Nelson, B. R., Taylor, V., Bermingham-McDonogh, O., & Reh, T. A. (2009). Hes5 expression in the postnatal and adult mouse inner ear and the drug-damaged cochlea. *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 10(3), 321–340.
- Hawking, J. (1973). Comparative otopathology: aging, noise, and ototoxic drugs. *Adv Otorhinolaryngol*. *Adv Otorhinolaryngol*, 20, 125–141.
- Hawkins, D., y Lovett, M. (2004). The developmental genetics of auditory hair cells. *Human Molecular Genetics*, 13(2), 289–296.
- Hoa M, Linthicum J., Merchant S. y Segil N. (2010). Supporting cell survival in temporal bones of patients with known hearing loss. In *Abstracts of the Thirty-Third Annual Midwinter Research Meeting Association for Research in Otolaryngology, Association for Research in Otolaryngology (ARO)* (p. 206).

- Huang, S., Qiu, Y., Shi, Y., Xu, Z., y Brandt, S. J. (2000). P/CAF-mediated acetylation regulates the function of the basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL. *The EMBO Journal*, 19(24), 6792–803.
- INE. (2012). Síntesis de Resultados Censo 2012. Retrieved March 31, 2016, from http://www.iab.cl/wp-content/files_mf/resumencenso_2012.pdf
- Izumikawa, M., Minoda, R., Kawamoto, K., Abrashkin, K. a, Swiderski, D. L., Dolan, D. F., Raphael, Y. (2005). Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nature Medicine*, 11(3), 271–6.
- Kelley, M. W. (2006). Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nature Neuroscience*, 7.
- Liu, Q., Zhu, X., Xu, L., Fu Y, y Garvey, W. (2013). 6-Mercaptopurine augments glucose transport activity in skeletal muscle cells in part via a mechanism dependent upon orphan nuclear receptor NR4A3. Retrieved March 11, 2016, from <http://www.uniprot.org/citations/24022864>
- Love, P. E., Warzecha, C., y Li, L. (2014). Ldb1 complexes: the new master regulators of erythroid gene transcription. *Trends in Genetics: TIG*, 30(1), 1–9.
- Löwenheim, H., Furness, D. N., Kil, J., Zinn, C., Gültig, K., Fero, M. L. Zenner, H. P. (1999). Gene disruption of p27(Kip1) allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of corti. *Proc Natl Acad Sci*, 96(7), 4084–8.
- Luo, X., Ikeda, Y., y Parker, K. L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77(4), 481–90.
- Maass, J. C. (2010). *Como Herramienta Molecular Para Inducir Proliferación*. Universidad de Chile.
- McFadden, S. L., Ding, D., Jiang, H., y Salvi, R. J. (2004). Time course of efferent fiber and spiral ganglion cell degeneration following complete hair cell loss in the chinchilla. *Brain Research*, 997(1), 40–51.
- McFadden, S. L., Ding, D., Jiang, H., Woo, J. M., & Salvi, R. J. (2002). Chinchilla models of selective cochlear hair cell loss. *Hearing Research*, 174(1-2), 230–8.
- Medunjanin, S., Daniel, J.-M., Weinert, S., Dutzmann, J., Burgbacher, F., Brecht, S., Braun-Dullaeus, R. C. (2015). DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) permits vascular smooth muscle cell proliferation through phosphorylation of the orphan nuclear receptor NOR1. *Cardiovascular Research*, 106(3), 488–97.
- Merchant, S., y Nadol, J. (1993). *Schuknecht's Pathology of the ear* (Vol. 2nd edn. L).
- Mizutari, K., Fujioka, M., Hosoya, M., Bramhall, N., Okano, H. J., Okano, H., y Edge, A. S. B. (2013). Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma. *Neuron*, 77(1), 58–69.
- Monzack, E., y Cunningham, L. (2013). Lead roles for supporting actors: critical functions of inner ear supporting cells. *Hearing Research*, 303, 20–9.

Nie, L., Wu, H., y Sun, X. H. (2008). Ubiquitination and degradation of Tal1/SCL are induced by Notch signaling and depend on Skp2 and CHIP. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2), 684–692.

Oesterle, E. C., Chien, W., Campbell, S., Nellimarla, P., y Fero, M. L. (2011). p27 Kip1 is required to maintain proliferative quiescence in the adult cochlea and pituitary, 1237–1248.

Ponno, T., Burton, Q., Pereira, F. A., Wu, D. K., y Conneely, O. M. (2002). The Nuclear Receptor Nor-1 Is Essential for Proliferation of the Semicircular Canals of the Mouse Inner Ear. *Molecular and Cellular Biology*, 22(3), 935–945.

Ranhotra, H. S. (2015). The NR4A orphan nuclear receptors: mediators in metabolism and diseases. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 35(2), 184–8.

Raphael, Y. (2007). Non-sensory cells in the deafened organ of Corti: approaches for repair. *Int J Dev Biol.*, 51(6-7), 649–54.

Robb, L., & Begley, C. G. (1997). The SCL/TAL1 gene: roles in normal and malignant haematopoiesis. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 19(7), 607–13.

Ryals B. y Rubel. E. (1988). Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult coturnix quail. *Science*, 240(15), 15–17.

Sage, C., Huang, M., Karimi, K., Hinds, P. W., Corwin, J. T., Corey, D., y Chen, Z. (2005). Proliferation of Functional Hair Cells in Vivo in the Absence of the Retinoblastoma Protein. *Science*, 1114(2005).

Schneider, M., Belyantseva, I., Azevedo, R., y Kachar, B. (2002). Rapid renewal of auditory hair bundles. *Nature*, 418(6900), 837–8.

Shi, F., Kempfle, J. S., y Edge, A. S. B. (2012). Wnt-Responsive Lgr5-Expressing Stem Cells Are Hair Cell Progenitors in the Cochlea. *Journal of Neuroscience*, 32(28), 9639–9648.

Shinoda, K., Lei, H., Yoshii, H., Nomura, M., Nagano, M., Shiba, H., Niwa, O. (1995). Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 204(1), 22–9.

Smith, R., Shearer, A., Hildebrand, M., y Camp, G. Van. (2014). Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. *Gene Reviews*.

Tateya, T., Imayoshi, I., Tateya, I., Hamaguchi, K., Torii, H., Ito, J., y Kageyama, R. (2013). Hedgehog signaling regulates prosensory cell properties during the basal-to-apical wave of hair cell differentiation in the mammalian cochlea. *Development (Cambridge, England)*, 140(18), 3848–57.

Tona, Y., Hamaguchi, K., Ishikawa, M., Miyoshi, T., Yamamoto, N., Yamahara, K., Nakagawa, T. (2014). Therapeutic potential of a gamma-secretase inhibitor for hearing

restoration in a guinea pig model with noise-induced hearing loss. *BMC Neuroscience*, 15(1), 66.

Village, E. G. (1999). Newborn and Infant Hearing Loss: Detection and Intervention. *Pediatrics*, 103(2), 527–530.

Wang, C., Chen, W., Lai, P., y Chung, B. (2013). Molecular and Cellular Endocrinology Distinct functions of steroidogenic factor-1 (NR5A1) in the nucleus and the centrosome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 371(1-2), 148–153.

White, P. M., Doetzlhofer, A., Lee, Y. S., Groves, A. K., y Segil, N. (2006). Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. *Nature*, 441(June), 984–987.

World Health Organization. (2015). WHO | Deafness and hearing loss. Retrieved September 9, 2014, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>

Yang, S., Chen, W., Guo, W., Jia, S., Sun, J., Liu, H., He, D. (2012). Regeneration of Stereocilia of Hair Cells by Forced Atoh1 Expression in the Adult Mammalian Cochlea. *Plos One*, 7(9), 1–8.