

Pérez Raffo, Gabriela Mabel

Diferenciación de células madre mesenquimales humanas hasta células tipo ciliadas de oído interno: bases para una potencial terapia de reemplazo celular en hipoacúsicos

Doctorado en Ciencias de la Salud

Tesis 2020

Cita sugerida: Pérez Raffo GM. Diferenciación de células madre mesenquimales humanas hasta células tipo ciliadas de oído interno: bases para una potencial terapia de reemplazo celular en hipoacúsicos [tesis de doctorado] [Internet]. [Buenos Aires]: Instituto Universitario Hospital Italiano de Buenos Aires; 2020 [citado AAAA MM DD]. 124 p. Disponible en: <http://trovare.hospitalitaliano.org.ar/descargas/tesisytr/20211228145737/tesis-perez-raffo-gabriela.pdf>

Este documento integra la colección Tesis y trabajos finales de Trovare Repositorio del Institucional del Instituto Universitario Hospital Italiano de Buenos Aires y del Hospital Italiano de Buenos Aires. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

Para más información visite el sitio <http://trovare.hospitalitaliano.org.ar/>



Diferenciación de células madre mesenquimales humanas hasta células tipo-ciliadas de oído interno: bases para una potencial terapia de reemplazo celular en hipoacúsicos.

**Tesis para optar al grado de Doctor
Médica Perez-Raffo Gabriela Mabel**

Director de Tesis: Pereyra-Bonnet Federico BSc. PhD.

Co-Director: Rivolta Marcelo Nicolás MD. PhD.

Tutora de Tesis: Rodríguez María Laura PhD.

Instituto Universitario del Hospital Italiano

2020



Instituto Universitario
Hospital Italiano

Índice

Agradecimientos	1
Resumen	2
Summary.....	3
1. Introducción	4
1.1 Hipoacusia.....	4
1.1.2 Opciones terapéuticas	5
1.2 Las Células Ciliadas.....	6
1.2.1 Estructura del oído interno y ubicación de las células ciliadas	6
1.2.2 Vías de Señalización en la Embriogénesis de las Células Ciliadas en el ratón.....	8
1.3 Células Madre	17
1.3.1 Células Madre Embrionarias	18
1.3.2 Células Madre Adultas	18
1.3.2.1 Células Madre Mesenquimales.....	19
1.3.2.1.1 Células Madre derivadas de Tejido Adiposo	20
2. Reprogramación celular	21
2.1 Métodos de Reprogramación	22
2.1.1 Reprogramación mediante métodos químicos a células ciliadas de oído interno	25
3. CRISPR-Cas.....	31
3.1 Reprogramación por el Sistema CRISPR-on	33
4. Justificación de la tesis	37
5. Hipótesis	38
6. Objetivos.....	38
7. Capítulo I.....	40
Aislamiento y Caracterización de Células Madre Mesenquimales de Tejido Adiposo	40
7.1 Introducción	40
7.2 Materiales y Métodos	40
7.3 Resultados.....	49
7.4 Discusión	58
7.5 Conclusión.....	60

8. Capítulo II.....	61
Reprogramación Celular por Métodos Químicos.....	61
8.1 Introducción	61
8.2 Materiales y Métodos	61
8.3 Resultados	66
8.4 Discusión	71
8.5 Conclusión	75
9. Capítulo III.....	76
Activación de genes específicos mediante CRISPR-on.....	76
9.1 Introducción	76
9.2 Materiales y Métodos	76
9.3 Resultados	86
9.4 Discusión	91
9.5 Conclusión	95
10. Conclusiones Generales	96
11. Perspectivas.....	97
12. Referencias	98
13. Anexo I.....	116

Agradecimientos

A Alejandro, Juan María y Juan Martín por su cariño, comprensión y aliento permanente e incondicional.

A mamá y papá por su ejemplo de vida.

A Mónica por su ayuda permanente.

A Federico Pereyra-Bonnet por sus invaluable aportes como director en el desarrollo de la tesis.

A Marcelo Rivolta por aceptar la codirección de esta tesis.

A Alejandra Cardoso, Carol Fagundez y Lucía Vigezzi su valiosa colaboración en el trabajo de mesada.

A todo el personal del ICBME y el IMTIB que con paciencia y cariño me enseñaron la metodología del trabajo de laboratorio.

A Carlos Boccio por su entusiasmo y acompañamiento en este proyecto.

A mis colegas del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Italiano de Buenos Aires

Resumen

Introducción: La hipoacusia es una de las discapacidades más frecuentes en los países industrializados. Más del 5% de la población mundial, presenta una pérdida auditiva discapacitante. En los mamíferos la hipoacusia neurosensorial es irreversible y el motivo fundamental es que las células ciliadas de la cóclea adulta carecen de capacidad regenerativa. Los recientes avances en biología del desarrollo, genética y biología celular del oído interno han llevado la investigación en esta patología a nuevas aproximaciones terapéuticas, que incluyen medicina regenerativa y células madre. El objetivo general de este trabajo de tesis es obtener *in vitro* células "tipo" ciliadas de oído interno a partir de la diferenciación de células madre mesenquimales humanas provenientes de tejido adiposo.

Materiales y métodos: Se aisló y cultivó la fracción estromal vascular obtenida de tejido adiposo humano. Se caracterizaron las células madre de tejido adiposo humano (hASC) mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo. Las hASC se diferenciaron a linaje ótico, aplicando un protocolo de reprogramación química de dos pasos por un total de 48 días. Las células diferenciadas se fijaron y se extrajo el ARN a los días 10 y 48 para analizar la expresión de los marcadores de células progenitoras óticas, neuronales y de células ciliadas del oído interno. Asimismo, se llevó a cabo un novedoso protocolo de activación de genes endógenos mediante el sistema CRISPR-dCas9-VP160. Para ello se diseñaron cuatro ARN guías para activar los genes blancos, *SOX2*, *ATOH1*, *POU4F3* y *GFI1*. Los ARN guías y los plásmidos dCas9-VP160 se lipofectaron en células HEK293T y hASCs. Los resultados fueron analizados por RT-qPCR al día 4 post-lipofección.

Resultados: Al día 10 de la diferenciación química, se detectó la expresión de marcadores de placoda ótica: PAX2 ($90,9 \pm 0,16\%$), PAX8 ($44,2 \pm 0,03\%$) y BMP7 ($86,4 \pm 0,24\%$). También fueron detectados marcadores de células ciliadas del oído interno y progenitores neurales: POU4F3 ($24,2 \pm 0,05\%$), MYOVIa ($10,8 \pm 0,05\%$) y BIII TUBULINA ($28,8 \pm 0,37\%$). Al día 48, se observó un aumento de los marcadores de células ciliadas del oído interno ($33,2 \pm 0,04\%$ MYOVIa, $33,9 \pm 0,3\%$ POU4F3 y $14,3\%$ ATOH1), una disminución de los marcadores progenitores óticos ($46,2\%$ PAX2 y $15,9\%$ PAX8) y ausencia de marcadores neurales. Otros dos marcadores de progenitores óticos (*p27^{kip1}* y *EYA1*) se regularon positivamente después del primer paso de diferenciación. Por último, el sistema CRISPR-VP160 activo significativamente a los genes *SOX2*, *ATOH1* y *POU4F3* ($p < 0.05$) en las células HEK293, y al gen *ATOH1* en las hASCs ($p < 0.05$).

Conclusión: Los resultados obtenidos nos permiten concluir que es posible obtener *in vitro* células "tipo" ciliadas de oído interno a partir de la diferenciación de hASCs, aportando información de referencia para el desarrollo de nuevas terapias de reemplazo celular en hipoacúsicos.

Palabras claves: hipoacusia - células ciliadas - oído interno - células madre - reprogramación celular - CRISPR - CRISPR/dCas9

Summary

Introduction: Hearing impairment is the most frequent sensory deficit in industrialized countries. More than 5% of the world's population lives with a disabling hearing loss. In mammals, sensorineural hearing loss is irreversible, and the main reason is that the hair cells of the adult cochlea have no regenerative capacity. Recent advances in developmental biology, genetics, and cell biology of the inner ear have led research in this pathology to new therapeutic approaches, including regenerative medicine and stem cells. The aim of this thesis is to obtain *in vitro* inner ear hair cells-like from the differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue.

Methods and Materials: The stromal vascular fraction of human adipose tissue was isolated and cultured. The human adipose stem cells (hASC) were characterized by immunocytochemistry and flow cytometry. The hASC were differentiated into otic lineage, applying a two-step differentiation protocol for 48 days. The differentiated cells were fixed, and RNA extracted at day 10 and 48 to analyze the expression of otic progenitor, neuronal and inner ear hair cell markers.

Additionally, an innovative protocol for activation of endogenous genes by the CRISPR-dCas9-VP160 system was put into practice. Four RNA guides were designed to activate the target genes, *SOX2*, *ATOH1*, *POU4F3* and *GFI1*. The RNA guides and plasmids dCas9-VP160 were lipofected in HEK293T cells and hASCs. The results were analyzed by RT-qPCR at day 4 post-lipofection.

Results: At day 10 of chemical differentiation, otic placode markers expression were detected: PAX2 (90,9 ± 0,16%), PAX8 (44,2 ± 0,03%) and BMP7 (86,4 ± 0,24%). Neural progenitors and inner ear hair cells markers, POU4F3 (24,2 ± 0,05%), MYOVIa (10,8 ± 0,05%) and BIII TUBULIN (28,8 ± 0,37%) were also detected. At day 48, an increase of inner ear hair cell markers (33,2 ± 0,04% MYOVIa, 33,9 ± 0,3% POU4F3 and 14,3% ATOH1), a decreased of otic progenitor markers (46,2% PAX2 and 15,9% PAX8) and absence of neural markers were seen. Other two otic progenitor genes markers (*p27^{kip1}* and *EYA1*) were upregulated after the first step of differentiation.

Finally, the CRISPR-VP160 system significantly activated *SOX2*, *ATOH1* and *POU4F3* genes in HEK293 cells (p <0.05) and *ATOH1* gene in hASC (p <0.05).

Conclusions: Our results allowed us to conclude that hASC can differentiate into inner ear hair cell-like *in vitro*, providing reference information for the development of new cell replacement therapies in hearing impaired.

Keywords: Hearing loss - inner ear hair cells - stem cells - inner ear - cell programming - CRISPR - CRISPR dCas9

1.

Introducción

1.1 Hipoacusia

La hipoacusia es una de las discapacidades más frecuentes en los países industrializados. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2019) más del 5% de la población mundial, es decir 466 millones de personas, tienen una pérdida auditiva discapacitante (432 millones de adultos y 34 millones de niños). La pérdida auditiva discapacitante se refiere a una pérdida mayor de 40 decibelios (dB) en el oído con mejor audición, en adultos y una pérdida auditiva mayor de 30 dB en el oído con mejor audición en niños (1). La mayor exposición al ruido y el uso de dispositivos electrónicos portátiles contribuyen al aumento de la incidencia de la hipoacusia (2). La OMS estima que 1.100 millones de jóvenes (de entre 12 y 35 años) corren riesgo de pérdida de audición debido a la exposición al ruido en entornos recreativos y que para el año 2050 el número de hipoacúsicos en el mundo ascenderá a 900 millones.

La pérdida de audición puede deberse a causas genéticas, complicaciones al nacer, ciertas enfermedades infecciosas, infecciones crónicas del oído, el uso de medicamentos ototóxicos, la exposición al ruido excesivo y el envejecimiento (1).

Toda sensación auditiva deriva de la emisión de salida de un número reducido de células sensoriales. Estas células ciliadas son las traductoras mecanoeléctricas del oído, la deflexión de sus cilios en su extremo apical se transmite hacia el polo opuesto dando lugar al potencial de acción del nervio auditivo. El ser humano nace con alrededor de 16000 células ciliadas y 30000 neuronas auditivas (3).

La gran mayoría de las hipoacusias son neurosensoriales (HNS), por alteraciones de las células ciliadas ubicadas dentro de la cóclea, y en grado variable, de sus neuronas asociadas debido a la deaferentación, causadas por la pérdida de factores tróficos (4,5). La neuropatía auditiva, que causa sordera por disfunción o degeneración primaria del nervio auditivo, es menos frecuente (5,6)

Las HNS pueden ser congénitas o adquiridas. Dependiendo de su edad de comienzo y el grado, la hipoacusia puede afectar la adquisición del lenguaje, el desarrollo cognitivo y psicosocial. Los cálculos de la prevalencia de la HNS pediátrica congénita y precoz varían en Europa y Estados Unidos entre 1,4 y 3 cada 1000 nacidos vivos (1,7,8).

La HNS es irreversible y la razón fundamental de esta irreversibilidad es que la cóclea adulta del mamífero carece de capacidad regenerativa (9).

1.1.2 Opciones terapéuticas

En la actualidad las opciones terapéuticas en las HNS son los dispositivos de amplificación, la estimulación eléctrica del nervio auditivo a través del implante coclear (10), la estimulación eléctrica de la superficie del núcleo coclear por medio del implante de tronco cerebral y finalmente para aquellos pacientes que no se benefician con ninguna de las prótesis antes mencionadas se habían comenzado con ensayos clínicos de una prótesis diseñada para estimular el colículo inferior, pero estas no han prosperado (10–12) .

Como se verá más adelante en el cuerpo de esta tesis, los recientes avances en biología del desarrollo, genética y biología celular del oído interno han llevado la investigación en esta

patología a nuevas aproximaciones terapéuticas, que incluyen medicina regenerativa y células madre.

1.2 Las Células Ciliadas

Las células ciliadas se encuentran en el oído interno y son, junto a sus neuronas asociadas, los focos de atención de las investigaciones para futuras terapias.

1.2.1 Estructura del oído interno y ubicación de las células ciliadas

El oído interno se encuentra ubicado en el interior del hueso temporal y está formado por la cóclea y los órganos vestibulares (13).

La cóclea es un sistema de conductos óseos enrollados en forma de caracol que contiene al órgano sensorial de la audición (Figura 1 A). En conjunto, la cóclea y los órganos vestibulares se denominan laberinto. Las estructuras óseas se conocen como el laberinto óseo y el contenido es el laberinto membranoso. El laberinto membranoso tiene tres canales llenos de líquido: la escala vestibular; la escala timpánica; y la escala media. La escala media, ubicada en medio, está separada de la escala vestibular por la membrana de Reissner y de la escala timpánica por la membrana basilar (Figura 1 B). La composición iónica del líquido en la escala media es similar a la del líquido intracelular, por lo tanto, rica en potasio y baja en sodio, mientras que el líquido en la escala vestibular y la escala timpánica es similar a la del líquido extracelular y al líquido cefalorraquídeo, por lo tanto, rico en sodio (Na^+) y pobre en potasio (K^+). La membrana basilar

separa los sonidos según su frecuencia (espectro) y el órgano de Corti, ubicado a lo largo de la membrana basilar, contiene las células sensoriales (células ciliadas) que transforman la vibración de la membrana basilar en un impulso neural (14).

El órgano de Corti consiste en células epiteliales que varían tanto en estructura como en función. Las células ciliadas cocleares pueden dividirse anatómica y funcionalmente en células ciliadas internas y externas. Las células ciliadas internas detectan el sonido y transmiten la información al cerebro a través de los nervios aferentes de la vía auditiva, mientras que las células ciliadas externas son importantes en la amplificación del sonido y reciben inervación eferente del tronco encefálico. Cada célula ciliada está rodeada por células de sostén (Figura 1 C). La membrana tectoria es una lámina acelular secretada en gran parte por las células del surco interno en la cresta epitelial mayor. Se ha informado que las células de Claudio y las células de Boettcher mantienen el microambiente de la cóclea, con la absorción de Na^+ o la secreción de óxido nítrico (15) (Figura 1 C).

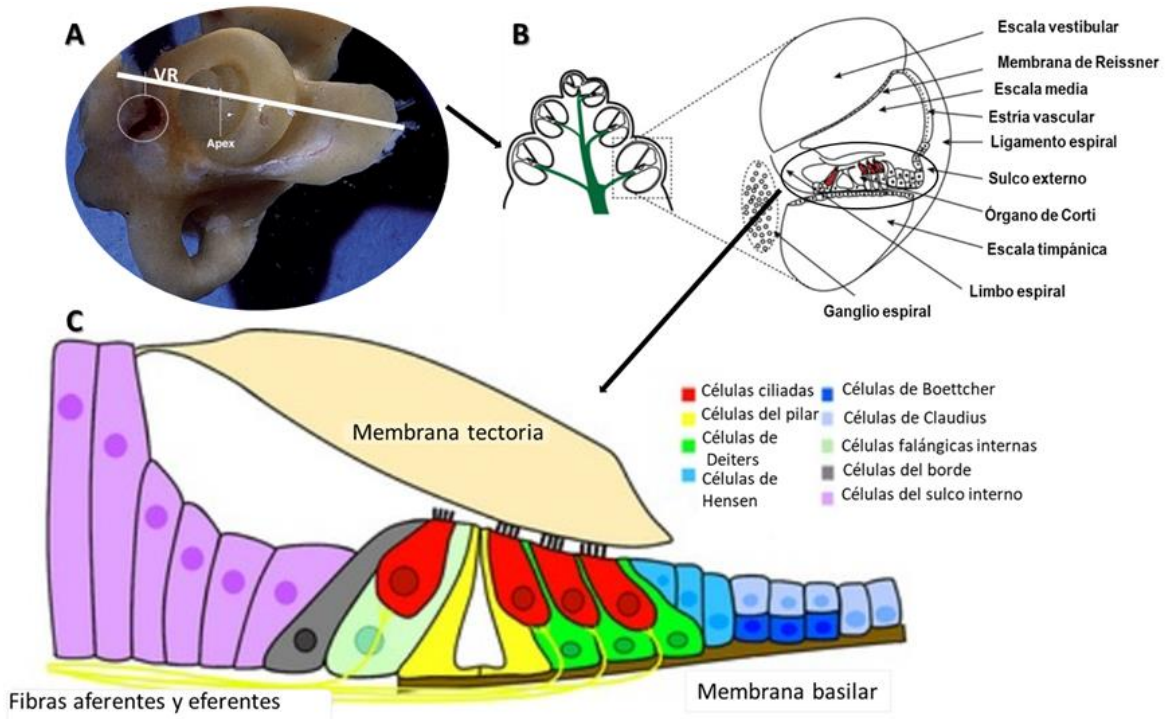


Figura 1 A: Cóclea humana completa. El nicho de la ventana redonda se indica con un círculo. VR: membrana de la ventana redonda. La línea blanca indica corte transversal. Extraído de Roy et al, 2012 (16). B: Sección transversal esquemática a través de la cóclea de mamíferos, que muestra la organización de las tres rampas y la posición de las células ciliadas del órgano de Corti (en rojo). La ubicación del esquema relativo a la cóclea se ilustra mediante líneas de puntos. El círculo negro engloba al órgano de Corti. Extraído de Schimmang y Maconochie 2016 (17). C: Estructura del Órgano de Corti. Extraído de Kelley, 2006 (15).

1.2.2 Vías de Señalización en la Embriogénesis de las Células Ciliadas en el ratón

El desarrollo del oído interno comienza con un engrosamiento del ectodermo a ambos lados del romboencéfalo, llamado placoda ótica que deriva de la región anterior de la placa neural llamada región pre-placoda (18).

La pre-placoda es inducida por una combinación de señales de la placa neural y del mesodermo ubicado debajo de ella que requiere de factores de crecimiento fibroblástico (FGF, del inglés *Fibroblast Growth Factor*) y la supresión de genes *Wnt* (del inglés, *Wingless-related MMTV integration site*) y de *Bmp* (del inglés, *Bone Morphogenetic Protein*) (19).

Después de la formación de la pre-placoda el *Fgf* actúa sobre la pre-placoda para inducir la formación de la placoda (20). La expresión de *Fgf* es necesaria y suficiente para inducir los marcadores tempranos de placoda (20,21) como son: *Pax8* (del inglés, *Paired box gene-8 protein*), *Pax2* (del inglés, *Paired box gene-2 protein*), *Foxi1/3* (del inglés, *Forkhead box I1 y 3*) y *Sox9* (del inglés, *Transcription factor Sox-9*) (22,23).

La placoda ótica se invagina y al cerrarse da lugar a la formación del otocisto (24). Para la formación del otocisto se establecen tres ejes cardinales que ocurren en diferentes tiempos y por diferentes grupos de señales. Los primeros ejes en establecerse son el medio-lateral y el anteroposterior, mientras que el eje dorsoventral se determina inmediatamente después. El gradiente posterior de ácido retinoico permite la expresión de marcadores anteriores y posteriores de genes óticos. El tubo neural provee la fuente de *Wnt* para crear el gradiente dorsal. Estos signos de dorsalización aumentan por el gradiente inhibitorio de *Gli3R* (del inglés, *transcriptional repressor Gli3R*) mientras que la notocorda instala un gradiente de *Shh* (del inglés, *Sonic Hedgehog*) que establece el carácter ventral. En este proceso los gradientes de *Wnt* y *Fgf3* (del inglés, del inglés *Fibroblast Growth Factor 3*) que tienen origen en el tubo neural establecen el eje medial y lateral (25). El *Fgf3* y el *Fgf10* son necesarios y forman parte de los mecanismos de inducción de la placoda ótica. (26)

El oído interno se encuentra dividido en dos unidades funcionales: el sector posterior dorsal compuesto por el sistema vestibular y el sector inferior y ventral constituido por el ducto coclear y la mácula sacular. Los genes marcadores ventrales son *Lfng* (del inglés, *O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase*), *Neurog1* (del inglés, *Neurogenin-1*), *NeuroD1* (del inglés, *Neurogenic differentiation 1*), *Sox2* (del inglés, *Sex determining Region Y-box 2*), *Six1* (del inglés, *Sineoculis homeobox homolog 1*) y *Eya1* (del inglés, *Eyes absent homolog 1*). Las señales descritas definen la partición del otocisto en tres ejes cardinales. El ducto coclear crece de la región ventral del otocisto alrededor del día 11 en el ratón. Durante los siguientes 5 días el ducto coclear se elonga en dirección anterior y medial hasta alcanzar su longitud final (27)

En el día 11 (E11) el sector ventral del ducto coclear expresa *Sox2* y *Jag1* (del inglés, *Jagged1*). Esto dará lugar a un sector central con la expresión de *Sox2* y una línea paralela del lado neural del ducto, cerca del ganglio espiral que expresa *Jag1* y otra línea que expresa *Bmp4* (del inglés, *Bone Morphogenetic Protein 4*) en el sector no neural (27,28) (Figura 2).

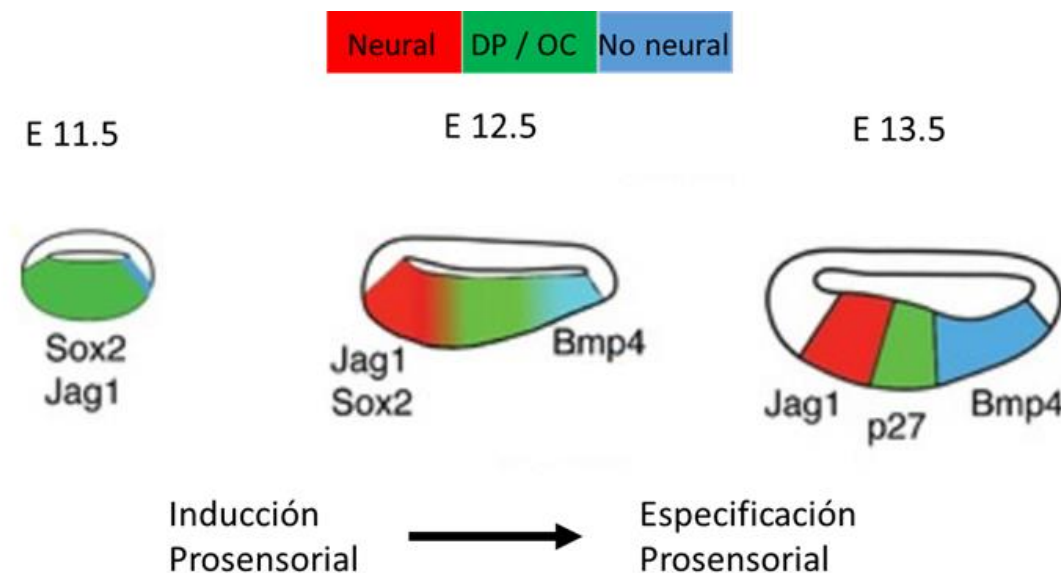


Figura 2: Diferenciación y especificación del dominio pro-sensorial (DP) y el órgano de Corti (OC) entre los días 11.5 y 13.5. Adaptado de Basch et al, 2016 (25).

El órgano de Corti deriva específicamente del dominio pro-sensorial *Sox2* localizado en la región ventral de otocosito. Después de un período de proliferación y extensión que ocurre entre el E10 y el E12 las células progenitoras del dominio pro-sensorial salen del ciclo celular comenzando desde el ápex del ducto coclear (29–31) (Figura 3). Este proceso desde el ápex a la espira basal de la cóclea se extiende desde E12.5 a E14.5. Un factor determinante para este evento es la expresión del inhibidor del ciclo celular *p27^{kip1}* (del inglés, *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*). Como resultado hacia el día E14 todas las células positivas para *Sox2* son también positivas para *p27^{kip1}*. El *p27^{kip1}* se expresa sólo en las células ciliadas y no se expresa en células por fuera de la población de *Sox2*. Otros inhibidores del ciclo celular como el *p19^{ink4d}* (del inglés, *Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D*) y el *p21^{cip1}* (del inglés, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) se expresan en las células ciliadas y en células de sostén, se cree que esta combinación es necesaria para mantener el estado pos-mitótico y la viabilidad de ambas poblaciones celulares.

En general durante el desarrollo la diferenciación celular y la salida del ciclo celular se encuentran íntimamente ligados, con señales de diferenciación celular que llevan a la salida del ciclo celular. Esto no ocurre en la cóclea. En el día E13.5 las células de la espira media del ducto coclear se empiezan a diferenciar en células ciliadas y expresan el factor de transcripción *Atoh1* (del inglés, *Protein atonal homolog 1*). Esta región de células diferenciadas se expande rápidamente hacia la base y el ápex de la cóclea entre los 3 y 4 días subsiguientes. De esta manera las primeras células

en salir del ciclo celular son las últimas en diferenciarse. Hasta el momento se desconocen las señales que dan inicio a la salida del ciclo celular en el ápex coclear (25) (Figura 3).

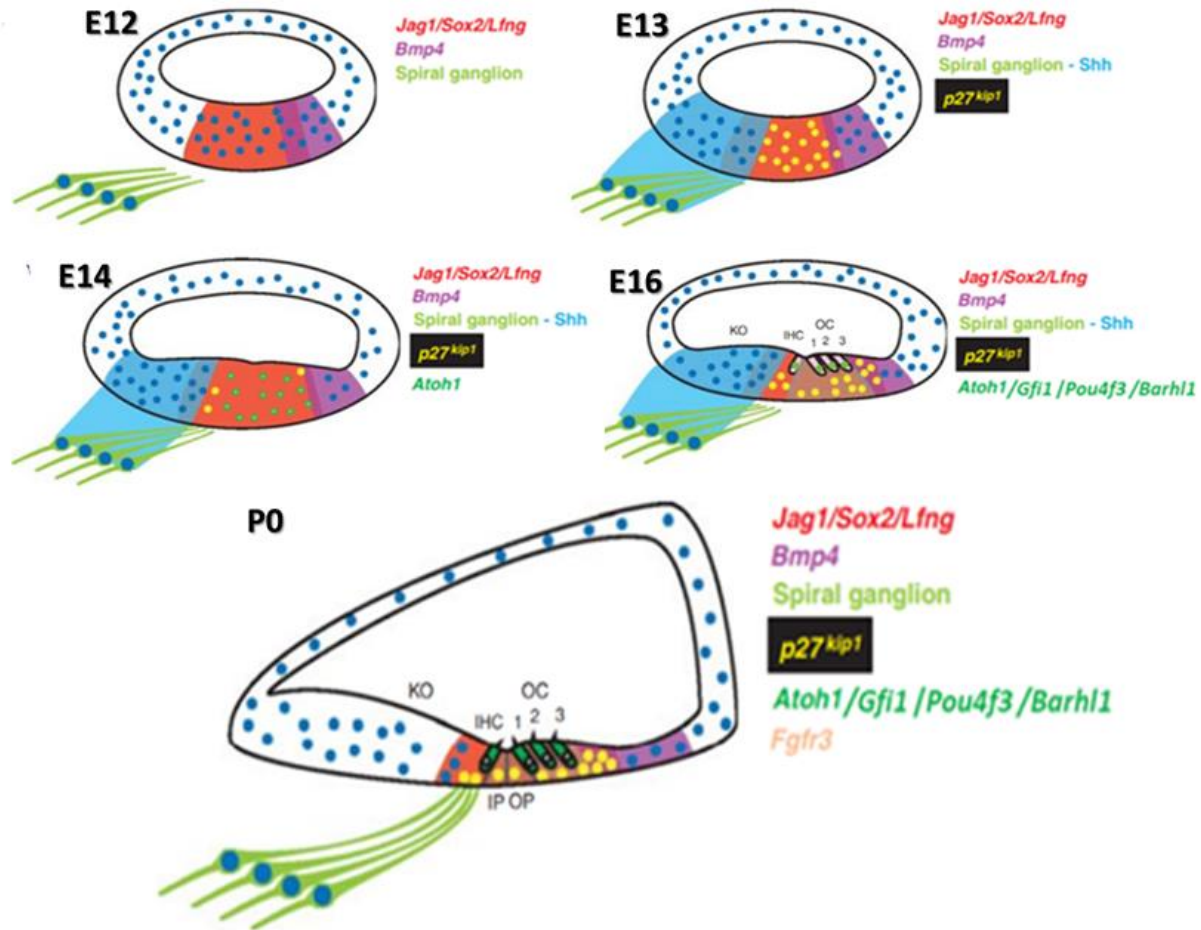


Figura 3: Desarrollo del conducto coclear. Secciones transversales esquemáticas a través de la base del conducto coclear. En E12 el dominio se define por la expresión de *Jag1 / Sox2 / Lfng*. El dominio de expresión de *Bmp4* se ubica en el borde lateral del conducto. Las neuronas del ganglio espiral en desarrollo se encuentran cerca del borde medial del conducto y en E13 comienzan a expresar *Shh*, que se cree que se difunde en el lado medial del conducto. El gen *p27^{kip1}* se expresa en un subconjunto de las células *Jag1 / Sox2 / Lfng* positivas. En E14, la expresión de *Atoh1* comienza en un subconjunto de células positivas para *p27^{kip1}*. Por E16, las células ciliadas

expresan *Atoh1*, *Gfi1*, *Pou4f3*, *Bart11* y *Fgfr3* (del inglés, *Fibroblast Growth Factor Receptor 3*) se expresa en las células del pilar y de Deiter. En el día posnatal 0 (P0), el patrón celular está esencialmente completo. Las células ciliadas positivas para *Atoh1* se encuentran rodeadas de células de soporte. Las neuronas del ganglio espiral ya no expresan *Shh*. Abreviaturas: IHC, células ciliadas internas, IP, células del pilar interno; KO, órgano de Kolliker; OC, órgano de Corti; OP, células del pilar externo. Modificado de Kelley, 2006 y Wu & Kelley, 2012 (15,27).

Las células que expresan *Atoh1* (del inglés, *Protein atonal homolog 1*), (previamente llamado MATH1) son capaces de generar células ciliadas y células de sostén en el órgano de Corti. A medida que continúa la diferenciación las células ciliadas comienzan a expresar dos miembros de la vía de señalización de *Notch* (del inglés, *Notch homolog, translocation-associated*), *Jag2* (del inglés, *Jagged2*) y *Dll1* (del inglés, *Delta-like protein 1*) (32,33) en respuesta a una señal todavía no identificada. Estas células se diferenciarán a células ciliadas y darán esta señal a sus vecinas. Como consecuencia de la activación de *Notch*, las células que reciban esta señal expresarán *Hey* (del inglés, *Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein*) y *Hes* (del inglés, *Transcription factor Hes*) que actuando como genes represores de transcripción bloquean el programa de diferenciación de células ciliadas, de esta manera las células vecinas adoptarán el destino de ser células de sostén (34–36). Sin embargo, el origen de la complejidad y la asimetría de la cóclea del mamífero no se podría explicar simplemente por inhibición lateral (27) (Figura 3)

Luego de la expresión de *Jag2* y *Dll1* las células ciliadas comienzan a expresar un grupo de factores de transcripción necesarios para su maduración y supervivencia luego de la diferenciación inicial.

Los genes *Gfi1* (del inglés, *Zinc finger protein Gfi-1*), *Pou4f3* (del inglés, *Pou domain, class 4, transcription factor 3*) (previamente llamado Brn3c), y *Barhl1* (del inglés, *BarH-like homeobox 1*) son en la actualidad considerados necesarios para la maduración y el mantenimiento de las células ciliadas.

El factor de transcripción *Gfi1* se expresa al inicio de la génesis de las células ciliadas y su expresión más tarde se torna exclusiva en las células ciliadas (37). El factor de transcripción *Pou4f3* muestra un comportamiento similar al patrón de expresión de *Gfi1*. Ambos genes son necesarios para la maduración y el mantenimiento de las células(38). De hecho, una combinación de *Gfi1*, *Pou4f3* y *Atoh1* son suficientes para reprogramar las células hacia células ciliadas (39,40).

El tercer factor es el *Barhl1* que se expresa en las células ciliadas de la cóclea a partir de E14.5 (41). Es probable que este factor de transcripción sea el responsable del mantenimiento a largo plazo de las células ciliadas y tal vez de su diferenciación final.

En el inicio de la génesis de las células ciliadas *Gfi1* y *Pou4f3* son necesarios para una etapa tardía de diferenciación, maduración y supervivencia a corto plazo mientras que *Bart11* juega un papel esencial en la supervivencia a largo plazo de estas células (42) (Figura 3).

Cada célula ciliada posee en su ápice un conjunto de estereocilias, entre 50 y 200, que cumplen una función esencial en la mecanorrecepción. La disposición de cada conjunto de estereocilias varía según la especie, sin embargo la estructura de cada manojo de estereocilias posee una estructura similar en forma de escalera con la estereocilia más alta en un extremo. El patrón de ensamble de las estereocilias constituye una parte importante en la diferenciación de las células

(43). La longitud de las estereocilias de células ciliadas podría regularse mediante el ajuste fino de las proteínas reguladoras de actina en cualquier extremo del núcleo del filamento de actina o por miembros del grupo de miosinas que están presentes en el grupo de estereocilias como *MyoIc* (del inglés, *Myosin -Ic*), *MyoIIIa*, *MyoVI*, *MyoVIIa* y *MyoXVa* (44).

La caracterización molecular del tejido embrionario del oído interno humano es escasa y cubre principalmente etapas de desarrollo ligeramente tardías (de la semana 7 a la semana 18 de desarrollo fetal) (45,46). En la figura 4 se compara en una línea de tiempo comparativa entre el desarrollo del oído interno en el ratón y el humano.



Figura 4: La línea de tiempo del desarrollo del ratón (días, en azul), los estadios humanos (semanas en negro) resaltan específicamente la maduración del epitelio sensorial coclear.

Extraído de Roccio y col, 2019. (47)

Como está descrito en esta sección, el destino celular está determinado por un conjunto complejo de factores de transcripción y redes epigenéticas que gobierna el programa de diferenciación. Las células ciliadas de oído interno en el mamífero adulto se encuentran en un estado post-mitótico y son incapaces de desandar este camino recorrido. Sin embargo, en 1988 dos grupos de investigadores independientes, Corwin y Cotanche (48), y Ryals y Rubels (49) reportaron por primera vez que las células ciliadas en las aves se regeneran luego de haber

sufrido trauma acústico u ototoxicidad. Los dos grupos trabajaron sobre la misma hipótesis “las nuevas células ciliadas surgirían de la división de las células de sostén o de la división de alguna célula madre latente no identificada”. La respuesta regenerativa es muy rápida y las células entran en el ciclo celular durante las primeras 16 horas (48,49) y el reemplazo se observa a los 2 ó 3 días. El primer reemplazo parecería darse por la transdiferenciación de las células de sostén y la recuperación tardía por la proliferación de estas mismas células (50,51). Sin embargo, esta regeneración no ocurre ante la ototoxicidad con cisplatino (52).

En los mamíferos la regeneración de células ciliadas posterior a toxicidad por aminoglucósidos sólo se comprobó en los órganos vestibulares de ratón y chanchitos de la india (9,53,54), pero la densidad celular nunca vuelve a ser la misma y parecería que el reemplazo se realiza por transdiferenciación de las células de sostén (9). Algún nivel de regeneración de las células ciliadas se ha observado *in vitro* después de una selectiva ablación de células ciliadas inducida por láser en cócleas embrionarias, mientras que muy pocas células fueron regeneradas en el epitelio sensorial post-natal en iguales condiciones.

El órgano de Corti es post-mitótico al nacer en el mamífero adulto y a diferencia de la cóclea de las aves, las células de soporte de mamíferos carecen de capacidad de reingresar al ciclo celular después del daño y regenerar las células dañadas o perdidas (55).

Basados en estas evidencias, los objetivos de las nuevas líneas de investigación en el tratamiento de las HNS en humanos son lograr el reemplazo de las células ciliadas en el órgano de Corti y de sus neuronas asociadas ya sea por estimulación y regeneración a partir de células endógenas del

oído, como naturalmente ocurre en no-mamíferos vertebrados, o mediante el trasplante de células madre o progenitoras capaces de diferenciarse en células ciliadas del oído interno.

1.3 Células Madre

Las células madre se definen funcionalmente como células capaces de autorrenovarse y tener la habilidad de generar células diferenciadas (56). Son capaces de generar células hijas idénticas (autorreplicación), como así también generar células de su progeñie con un potencial de diferenciación restringido (células diferenciadas) (57).

La comprensión del significado de la potencialidad en las células madre puede ser el parámetro más difícil de incorporar. Una célula madre multipotente se encuentra encima de una jerarquía de linaje y puede generar múltiples tipos celulares diferenciados, con distintas morfologías y patrones de expresión génica. Al mismo tiempo, muchos argumentaron que una célula autorrenovable que solo puede producir un tipo de descendiente diferenciado es una célula madre unipotente (58). Quizá esta célula se podría definir mejor como una célula progenitora para claridad de la terminología. Los progenitores son típicamente los descendientes de las células madre, sólo que están más restringidos en su capacidad de diferenciación y de autorrenovación (59).

De acuerdo a la potencialidad, existen cuatro tipos de células madre: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. La denominación de "totipotencial" hace referencia al potencial que tienen estas células de generar un embrión completo (tejido embrionario y extraembrionario). El término pluripotencial es utilizado para describir las células madre que

pueden dar origen a células que pueden diferenciarse en las tres capas germinales embrionarias. Ejemplos de células madre pluripotenciales son las células madre embrionarias (ESCs) y las células pluripotenciales inducidas (iPSC). Las células madre multipotenciales son aquellas que pueden dar origen a precursores relacionados con una de las tres capas embrionarias. Finalmente, la última categoría corresponde a las células madre unipotenciales o progenitoras (60).

1.3.1 Células Madre Embrionarias

Las células madre embrionarias (ESCs) son células pluripotenciales que derivan directamente de la masa celular interna de embriones de preimplantación después de la formación de un blastocisto (61). Esta población de células normalmente produciría el epiblasto y eventualmente se diferenciaría en todos los tejidos adultos. Para cuando el cigoto ha alcanzado la etapa de blastocisto, el potencial de desarrollo de ciertas células se ha restringido. Las células externas del embrión han comenzado a diferenciarse para formar el trofoectodermo. En el ratón una población celular cercana al epiblasto se identifica como células germinales primordiales. Estas células posteriormente migran y colonizan las crestas genitales donde generarán gametos maduros. Estas células cultivadas bajo determinadas condiciones dan lugar a las células germinales embrionarias (ESG), que comparten algunas características con las ESCs (62).

1.3.2 Células Madre Adultas

Las células madre adultas se encuentran en los tejidos de un individuo ya desarrollado. Están presentes en: la médula ósea, el tejido adiposo, el sistema neuronal, el sistema gastrointestinal,

el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el hígado, el páncreas y el pulmón, entre otros (63–68).

Estudios de varios grupos de investigadores sugieren que las células madre adultas son capaces de diferenciarse funcionalmente a células especializadas procedentes de capas embrionarias distintas a las de su origen; y han sido capaces de probar la pluripotencialidad de células madre adultas procedentes de la médula ósea, del tejido adiposo o de sistema nervioso central (68–71).

Las células madre adultas poseen la capacidad de responder a los cambios del ambiente donde se desarrollan cambiando su fenotipo como respuesta (72).

El origen de la mayoría de las células madre adultas es poco conocido. Los estudios diseñados para dilucidar su ontogenia pueden ayudar a revelar sus relaciones de linaje específicas y arrojar luz sobre su plasticidad y potencial. La información sobre los orígenes de las células madre adultas también ayudaría a entender los programas moleculares involucrados en la determinación del linaje, que pueden proporcionar información sobre los métodos para manipular su diferenciación (59).

1.3.2.1 Células Madre Mesenquimales

Las células madre mesenquimales son células madre adultas. El Comité de células madre mesenquimatosas y tisulares de la Sociedad Internacional de Terapia Celular propuso los siguientes criterios mínimos para definir MSC humanas: 1. Las MSC deben ser adherentes al plástico cuando se mantienen en cultivo estándar de condiciones y forma, 2. Las MSC deben expresar CD105, CD73 y CD90, y carecer de expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 alpha o CD19, y moléculas de superficie HLA-DR y 3. Las MSC deben diferenciarse a osteoblastos,

adipocitos y condroblastos *in vitro* (73). Las MSC se han aislado de diferentes tejidos en las diferentes etapas de desarrollo del adulto; tales fuentes son el líquido amniótico, la médula ósea, el cordón umbilical, la sangre del cordón umbilical y el tejido adiposo (74,75).

Las MSCs se describen como un subconjunto de células progenitoras que tiene la capacidad de diferenciarse en tipos de células derivadas mesodérmicas. Además, se expanden fácilmente *ex vivo* (76) y exhiben capacidad de autorrenovación en experimentos *in vivo* (76,77). Debido no solo a estas propiedades sino también por los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* (76–78) las MSCs parecen ser una herramienta particularmente útil y prometedora en Ingeniería de Tejidos y Terapia Celular (79).

1.3.2.1.1 Células Madre derivadas de Tejido Adiposo

A lo largo de los últimos años, el tejido adiposo ha sido reconocido como una fuente rica en células madre, así como también un tejido con un rol vital en el metabolismo (80). El compartimiento o fracción estromal vascular del tejido adiposo, por sus siglas en inglés SVF, es el sitio de origen de las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs) (81,82), se cree que se ubican entre los adipocitos, en las paredes de los vasos o en el tejido conectivo (83,84). La SVF se obtiene luego de la digestión del tejido con colagenasa. Cuando la SVF es cultivada, un grupo de células se adhiere a la superficie de la placa de cultivo; éstas células son las que exhiben propiedades de células madre. La SVF contiene además células derivadas de la sangre periférica como leucocitos y eritrocitos, células endoteliales vasculares, macrófagos, linfocitos y otras células como pericitos y fibroblastos (85). Aproximadamente el 2% de las células de la SVF son células madre con potencial multilinaje (86,87).

Basado en análisis de citometría de flujo, las ASCs expresan antígenos típicos tales como: CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA-I, HLA-ABC y son negativas para: CD10, CD14, CD24, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD49d, CD117, CD133, SSEA4, CD106, HLA-II, HLA-DR (88) .

Estas células tienen la capacidad de diferenciarse hacia diferentes tipos celulares de varios tejidos: grasa, hueso, cartílago, músculo esquelético, liso y cardíaco, endotelio, hematopoyético e hígado y neuronal (89–93).

En hombres y mujeres no obesos, el tejido adiposo representa alrededor del 37% de la masa corporal total con una distribución variable (80). El tejido puede obtenerse por resección quirúrgica o liposucción, el número de ASCs obtenidas puede variar dependiendo del método empleado inclusive partiendo de la misma cantidad de tejido adiposo (94,95).

Por sus características el tejido adiposo sería una fuente prometedora de células madre para aplicación en terapias celulares regenerativas ya que cumplen con los criterios sugeridos por Gimble y col. para tal fin, éstas deberían estar disponibles en grandes cantidades (10^6 - 10^9 células); aislarse utilizando metodologías poco dolorosas; exhibir un gran potencial de diferenciación en múltiples linajes; utilizarse con éxito en trasplantes autólogos o alogénicos y poder usarse de acuerdo con pautas aplicables de buenas prácticas clínicas (96,97).

2. Reprogramación celular

Durante la ontogénesis, el destino celular está determinado por un conjunto complejo de factores de transcripción y redes epigenéticas que gobierna el programa de diferenciación. El proceso de reprogramación generalmente incluye la introducción o regulación de factores claves

de reprogramación que son vitales para el desarrollo de la identidad y la función celular. La reprogramación de células somáticas, implica borrar este recuerdo para restablecer la red transcripcional intrínseca de una célula en estado pluripotente.

2.1 Métodos de Reprogramación

Durante el desarrollo y en la homeostasis de los tejidos, las identidades celulares se definen mediante programas específicos de expresión génica, que se rigen por factores de transcripción centrales. Estos factores interactúan con otros factores de transcripción que funcionan como elementos reguladores que actúan de manera cooperativa para activar genes específicos. También reclutan otros co-reguladores transcripcionales con actividades de remodelación de la cromatina para regular la accesibilidad de la cromatina en secuencias de ADN específicas, así como cofactores transcripcionales para activar o inhibir la actividad de la maquinaria transcripcional. Estos factores modulan en colaboración la frecuencia, la especificidad y la fuerza de la expresión génica para determinar un destino celular particular. Para reprogramar y establecer un nuevo destino a una célula, el equilibrio de la red transcripcional original debe romperse. Convencionalmente, la alteración de este equilibrio se produce a través de enfoques genéticos, como la sobreexpresión o la eliminación / desactivación de los factores de transcripción del núcleo (98).

En la última década, los **enfoques genéticos** tomaron mucha relevancia. Uno de los descubrimientos más importantes en este campo fue el realizado por Yamanaka y otros investigadores, que demostraron que un cóctel de solo cuatro genes que codifican los factores de transcripción *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* (del inglés, *Kruppel-like factor 4*) y *c-Myc* (del inglés, *transcription*

factor Myc), es suficiente para reprogramar fibroblastos de murinos (99) y humanos (100,101) en células madre pluripotentes inducidas (iPSc).

Otra ruta para generar células de un tipo celular diferente con este enfoque es mediante la transdiferenciación. Las células utilizadas en este proceso son células somáticas maduras. La transdiferenciación puede ocurrir de tres formas principales. Primero, los transgenes exógenos pueden introducirse en las células para sobreexpresar factores claves de transcripción para impulsar el proceso de transdiferenciación (102–105) En segundo lugar, los genes endógenos vitales para el proceso de transdiferenciación pueden ser específicamente dirigidos y silenciados o regulados, utilizando métodos que se centran en la manipulación directa del ADN o el entorno epigenético, como CRISPR-Cas9 (del inglés, clustered regularly interspaced short palindromic repeats) (106–110), cuyo concepto será ampliado en la próxima sección. Por último, las vías de transcripción pueden dirigirse con pequeñas moléculas que pueden provocar una cascada que desencadena la remodelación epigenética o altera directamente el entorno epigenético (111,112). El uso de vectores virales para introducir genes exógenos en las células es actualmente el método más destacado para inducir la transdiferenciación, pero se ha demostrado que este método es relativamente ineficiente (106).

Entre las **estrategias químicas**, el uso de factores de crecimiento (FC) ha sido siempre de considerable interés. Los FC pueden regular o disminuir las actividades celulares (adhesión, proliferación y diferenciación) uniéndose a los receptores de la superficie celular que a su vez activan las vías de señalización (113) . En general, los factores de crecimiento han sido definidos principalmente por su capacidad para regular la proliferación de células en cultivos. Sin embargo,

en la actualidad se los reconoce como péptidos multifuncionales que pueden desencadenar una amplia gama de respuestas celulares, incluyendo efectos sobre la formación de matriz extracelular, la motilidad celular, la supervivencia, la secreción y la expresión y determinación de los caracteres de diferenciación. Por lo tanto, las acciones de los FC pueden subdividirse de manera útil en dos categorías generales: efectos sobre la proliferación celular y efectos sobre el fenotipo celular (114). La utilización de ciertas clases de factores de crecimiento es útil para lograr la diferenciación de capas germinales específicas. El uso de FC como mecanismo de inducción para lograr la diferenciación *in vitro* hacia distintos linajes celulares es una herramienta ampliamente utilizada en la literatura (115–118).

Recientemente, se descubrió que las moléculas pequeñas (< 1000 Da) son capaces de activar rutas de señalización particulares que pueden conducir al crecimiento y diferenciación (119,120). Las moléculas pequeñas proporcionan varias ventajas en la reprogramación. Pueden modular objetivos específicos de proteínas de forma rápida y a menudo reversible, y así pueden regular las funciones celulares con mayor precisión de manera temporal. Además, se pueden aplicar a diversas concentraciones y combinaciones para que sus efectos puedan ser ajustados (98).

Las moléculas pequeñas pueden regular la transcripción génica típicamente a través de cuatro clases de mecanismos: como moduladores de la vía de señalización, activando o reprimiendo componentes de la transducción de señales para regular la transcripción corriente abajo del gen candidato (111); como moduladores de proteínas epigenéticas, regulando la actividad de los complejos epigenéticos (121); como reguladores metabólicos, que ajustan el estado celular y cambian el equilibrio de metabolitos que sirven como ligandos para proteínas y cofactores para

proteínas epigenéticas (122); como agonistas y antagonistas de receptores nucleares, que modulan directamente la transcripción regulando la actividad de los receptores nucleares (123).

Recientemente, se publicó un sistema predictivo, llamado Mogrify, que tiene como objetivo predecir la composición de los factores de transcripción necesarios para la transdiferenciación óptima en un tipo celular dado (124). Combina datos de expresión génica con información de la red reguladora para predecir los factores de transdiferenciación necesarios para inducir la conversión celular.

2.1.1 Reprogramación mediante métodos químicos a células ciliadas de oído interno

El paso inicial para el desarrollo del oído interno es la formación del ectodermo y la posterior formación del ectodermo pre-placoda. Muchos protocolos en primera instancia inhiben el factor de crecimiento- β y la vía WNT y activan la vía BMP para promover el desarrollo del ectodermo no-neural reduciendo el desarrollo mesodérmico (118,125–128). El factor de crecimiento insulínico tipo I, IGF-1 (del inglés, Insulin-like growth factor 1) promueve la formación del ectodermo anterior desde donde emerge el ectodermo pre-placoda (115,127). Este ectodermo da origen a la placoda ótica, el FGF, especialmente el FGF3 y FGF10 en el ratón, son los mayores inductores del dominio posterior del ectodermo pre-placoda que dará lugar a la placoda ótica (129).

Con el objetivo de diferenciar células madre pluripotentes a células “tipo” ciliadas de oído interno se han desarrollado numerosos protocolos. Muchos de ellos comienzan con la generación de “cuerpos embrionarios flotantes”, término que se utiliza para describir una colonia celular en

suspensión que se expande y multiplica *in vitro* en un medio de cultivo. A esta etapa le sigue un tratamiento “paso a paso” con una combinación de proteínas y/o moléculas pequeñas en cultivos 2D (115,125,127,128,130,131).

Li y col fueron los primeros que en 2003 lograron generar *in vitro* células progenitoras de oído interno a partir de células madre embrionarias, utilizando 3 líneas celulares: R1, YC5/TYPF y ROSA 26. Estas células expresaron un grupo de marcadores genéticos cuya combinación se identifica con el linaje de las células ciliadas del oído interno. Posteriormente una subpoblación de estas células mostró fenotipo de células ciliadas, expresando marcadores de generación y mantenimiento de maduración celular. Los mismos autores sembraron las células progenitoras en la vesícula ótica de embriones de pollo, obteniendo el desarrollo de células ciliadas también *in vivo*. Las células progenitoras encontradas fuera del oído interno no expresaron los marcadores de las células ciliadas. Este evento sostendría la hipótesis que la diferenciación de las células ciliadas responde a factores locales en el desarrollo del oído interno del pollo (115) (Figura 5).

Otros autores utilizaron como órgano dador el cerebro completo de ratas obtenido el día 16,5 de desarrollo embriológico, y obtuvieron *in vitro* células inmunoreactivas para MyoVIIa o Pou4f3, pero solo menos del 0,1% expresaron inmunoreactividad para ambos marcadores (131) (Figura 5).

Oshima y col publicaron un protocolo paso a paso partiendo de ESCs de ratón e iPSCs, que se dirigían a convertirse en ectodermo capaz de responder a factores de crecimiento inductores óticos. Las células progenitoras óticas resultantes se sometieron a condiciones de diferenciación variables, una de las cuales promovió la organización de las células en grupos epiteliales que

mostraron células similares a células ciliadas con haces de estereocilios. Las células portadoras de estos haces respondieron a la estimulación mecánica con corrientes que recordaban las corrientes de transducción de células ciliadas inmaduras (125) (Figura 5). Ouji y col lograron obtener *in vitro* células que expresaban marcadores de células ciliadas partiendo de ESCs de ratón utilizando en todas las etapas de la diferenciación un único medio de cultivo condicionado a partir de la línea celular ST2 (130) (Figura 5). Ronaghi y col partiendo de una línea celular humana de ESCs (H9 ESCs), obtuvieron marcadores de células ciliadas, estas células también mostraban protusiones apicales similares a estereocilias (127) (Figura 6).

Ratón	Protocolos de Diferenciación a Células "tipo" Ciliadas	Caracterización
Li y col, 2003		RT-PCR/IHC d14: PAX2 ⁺ BMP7 ⁺ JAG1 ⁺ ATOH1 ⁺ MYO7A ⁺ ESPN ⁺ POU4F3 ⁺ Parvalbumin3 ⁺
Kojima y col, 2004		IHC d28: MYO7A ⁺ POU4F3 ⁺
Oshima y col, 2010		RT-PCR/IHC/SEM/ electrofisiología d8: PAX2 ⁺ DLX5 ⁺ PAX8 ⁺ d20: ATOH1 ⁺ MYO7A ⁺ ESPN ⁺ CDH23 ⁺ (~13% ATOH1 ⁺ MYO7A ⁺ ESPIN ⁺) mecanosensibles
Ouji y col, 2012		qRT-PCR/IHC d10: PAX2 ⁺ POU4F3 ⁺ ATOH1 ⁺ MYO7A ⁺ (~32% MYO7A ⁺) RT-PCR/IHC/SEM d18: ATOH1 ⁺ MYO6 ⁺ Myo7A ⁺ POU4F3 ⁺ Calretinin ⁺ (~20% POU4F3 ⁺)

Figura 5: Resumen de estrategias de inducción y caracterización de células "tipo" ciliadas derivadas de células madre pluripotenciales de ratón. Las placas de Petri indican cultivos 2D. d: día. CE: Cuerpos embrionarios. En recuadro naranja: caracterización, los marcadores moleculares se expresan en porcentajes y se indica la mecanosensibilidad. SEM: microscopía de barrido. Adaptado de Tang y col (132)

Otros protocolos son llevados a cabo enteramente en cultivos 2D, dando como resultado poblaciones celulares más homogéneas (6,118,133,134).

Varios autores utilizaron líneas de ESCs humanas con las que lograron obtener células “tipo” ciliadas demostrando en ellas propiedades electrofisiológicas (134) (Figura 6). Chen y col obtuvieron dos tipos de progenitores óticos capaces de diferenciarse *in vitro* en células similares a las células ciliadas y neuronas auditivas que mostraron las propiedades electrofisiológicas esperadas. Además, estas células fueron trasplantadas en un modelo de neuropatía auditiva, los neuro progenitores óticos se injertaron, diferenciaron y mejoraron significativamente los umbrales de los potenciales auditivos (6).

Asimismo, utilizando iPSCs humanas otros autores han logrado obtener células que expresaban marcadores de células “tipo” ciliadas que en su extremo apical presentaron una estructura similar a haces de estereocilias (133) (Figura 6) y que expresaban marcadores de progenitores óticos (118) (Figura 6).

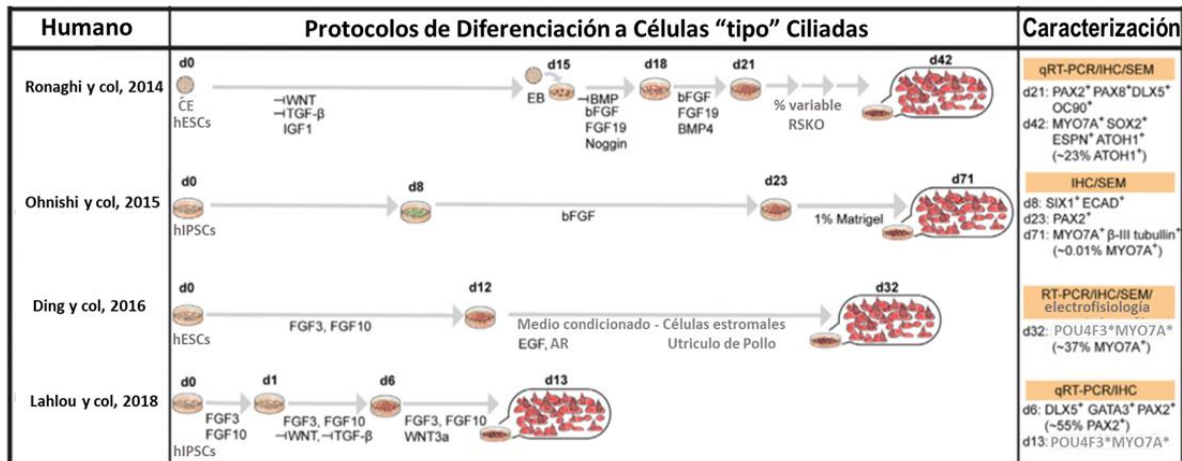


Figura 6 Resumen de estrategias de inducción y caracterización de células "tipo" ciliadas derivadas de células madre pluripotenciales humanas. Las placas de Petri indican cultivos 2D. d: día. CE: Cuerpos embrionarios. En recuadro naranja: caracterización, los marcadores moleculares se expresan en porcentajes y se indica la mecanosensibilidad. SEM: microscopía de barrido. AR: ácido retinoico. RSOK: Recambio de suero Knock-out. Adaptado de Tang y col (132)

Hasta aquí hemos realizado una revisión de los protocolos en los que se han obtenido células "tipo" ciliadas de oído interno a partir de ESCs e iPSCs, también Qin y col obtuvieron *in vitro* progenitores neurales (día:7) y células similares a las células ciliadas maduras que expresan *MyoVIIa* a partir de MSCs provenientes de médula ósea de rata mediante la adición de EGF e IGF-1 (135) (Figura 7). Otros trabajos reportan la obtención de células ciliadas a partir de MSCs de médula ósea de rata *in vitro* co-cultivándolas con células de otocisto de pollo o utilizando un vector que sobre-exprese *Atoh1* teniendo como objetivo activar una cantidad suficiente de este gen que permita la diferenciación celular (136) (Figura 7). Otros autores partiendo de MSCs de médula ósea humana obtuvieron células "tipo" progenitoras de oído interno exponiendo el cultivo antes de la inducción celular a un medio condicionado por células madre auditivas fetales (117,137) (Figura 7). También fue reportada la obtención de células ciliadas maduras partiendo del neuroepitelio olfatorio de ratones adultos utilizando como medio de cultivo el sobrenadante de cultivo de cócleas, no llegando a determinar si eran cocleares o vestibulares (138) (Figura 7).

Ratón	Protocolos de Diferenciación a Células “tipo” Ciliadas	Caracterización
Doyle y col 2007		<p>IHC</p> <p>d21: MYO7A*ESPIN*</p>
Rata		
Jeon y col, 2007		<p>RT-PCR/IHC</p> <p>d28: ESPIN*MYO7A* JAGGED2*POU4F3* P27kip*</p> <p>d21: JAGGED2* p27 kip*ATOH1* POU4F3*MYO7A* ESPIN*</p>
Qin y col, 2011		<p>IHC</p> <p>d7: NESTINA* d21:MYO7A*</p>
Humano		
Boddy y col, 2012		<p>RT-PCR/IHC</p> <p>d14: PAX2*PAX8* SOX2*GATA3*</p> <p>d28: ATOH1*MYO7A* POU4f3*</p>
Duran Alonso y col, 2012		<p>RT-PCR/IHC</p> <p>d17: ATOH1*MYO7A* CALRETININ* POU4F3*</p>

Figura 7: Resumen de estrategias de inducción y caracterización de células tipo ciliadas derivadas de células madre adultas. Las placas de Petri indican cultivos 2D. d: día. ES: Esferas en suspensión. En recuadro naranja: caracterización lograda, los marcadores moleculares AR: ácido retinoico. hFACS: Células madre fetales auditivas.

En 2013 Koehler y col lograron desarrollar el primer organoide de oído interno a partir de ESCs de ratón. El término organoides de oído interno es utilizado para referirse a cultivos tridimensionales de parches epiteliales sensoriales derivados de células madre pluripotentes diferenciados hacia la progenie ótica. Los protocolos actuales dan como resultado la generación

de epitelios sensoriales que se asemejan a las características generales de los órganos vestibulares (126,139–141). Los organoides cocleares se han logrado hasta ahora por expansión y diferenciación de células de soporte o precursoras del tejido sensorial de la cóclea, (142–144). Los cultivos en esferas suspendidas y la incrustación de las células en las células de la matriz extracelular les permite organizarse como quistes epiteliales, con polaridad apical-basal y orientación luminal del manojito de estereocilias.

3. CRISPR-Cas

Los sistemas CRISPR (en inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*; en español repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) son secuencias de ADN que se encuentran en aproximadamente el 40% de los genomas bacterianos y en el 90% de los genomas secuenciados de las arqueas (145,146)). Estas secuencias juegan un papel clave en el sistema inmunitario procarionte, ya que contienen fragmentos de ADN de virus que han atacado a las bacterias previamente. Estos fragmentos son utilizados por las bacterias para detectar y destruir el ADN de nuevos ataques de virus similares, y así poder defenderse eficazmente de ellos (Figura 8). Estos sistemas de defensa actúan en conjunto con proteínas nucleasas llamadas Cas (de aquí la denominación CRISPR-Cas para referirse a ellos). Cuando se produce una infección viral, las proteínas Cas se asocian con un ARN guía simple cadena (sgARN) transcrito a partir de las secuencias CRISPR, que guían al complejo Cas-sgARN hacia secuencias específicas del genoma viral y lo cortan y degradan (Figura 8) (146).

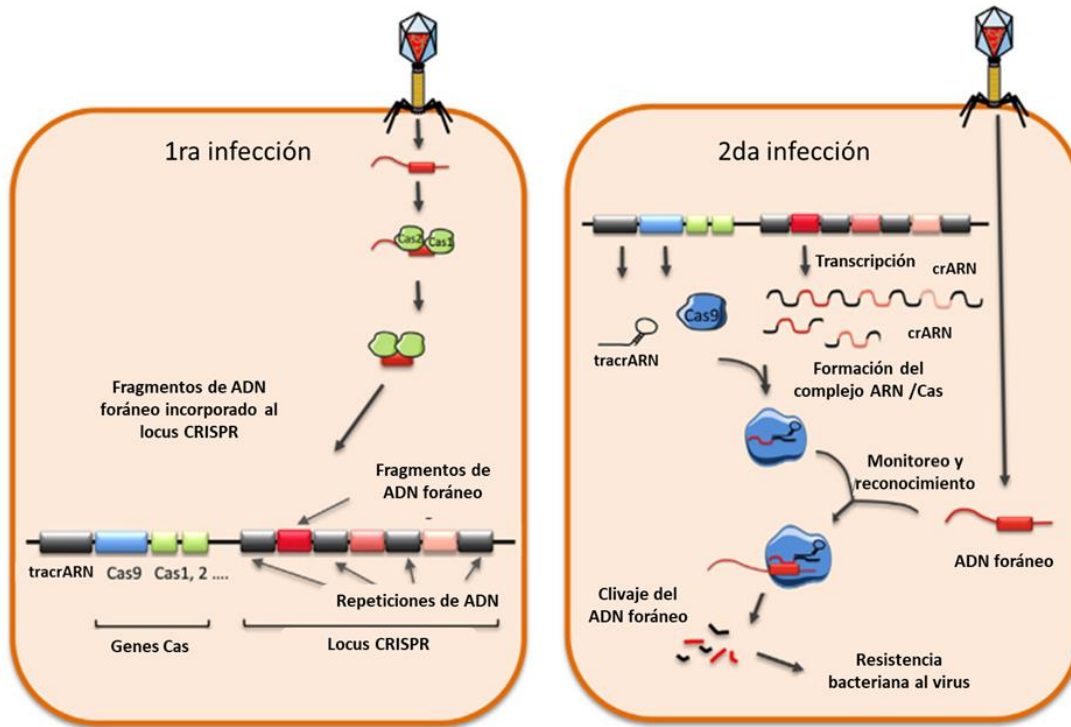


Figura 8: El sistema CRISPR-Cas9 como sistema inmune adaptativo en bacterias. Extraído y adaptado de Duroux-Richard 2017 (145).

Recientemente, utilizando este sistema bacteriano se ha desarrollado una novedosa tecnología de edición génica, conocida como CRISPR-Cas9. Esta tecnología permite insertar, eliminar o cambiar las secuencias de un gen específico. Utilizando un plásmido que codifica para la proteína Cas9 y las sgARN, se puede dirigir el sistema dentro de una célula para que corte una secuencia deseada que sea complementaria a los sgARN. Esto permite la eliminación funcional de genes o la introducción de mutaciones (tras la reparación del corte realizado por la maquinaria celular de reparación), como así también la inserción de secuencias enteras por recombinación homóloga cuando se incluye un fragmento donador (Figura 9).

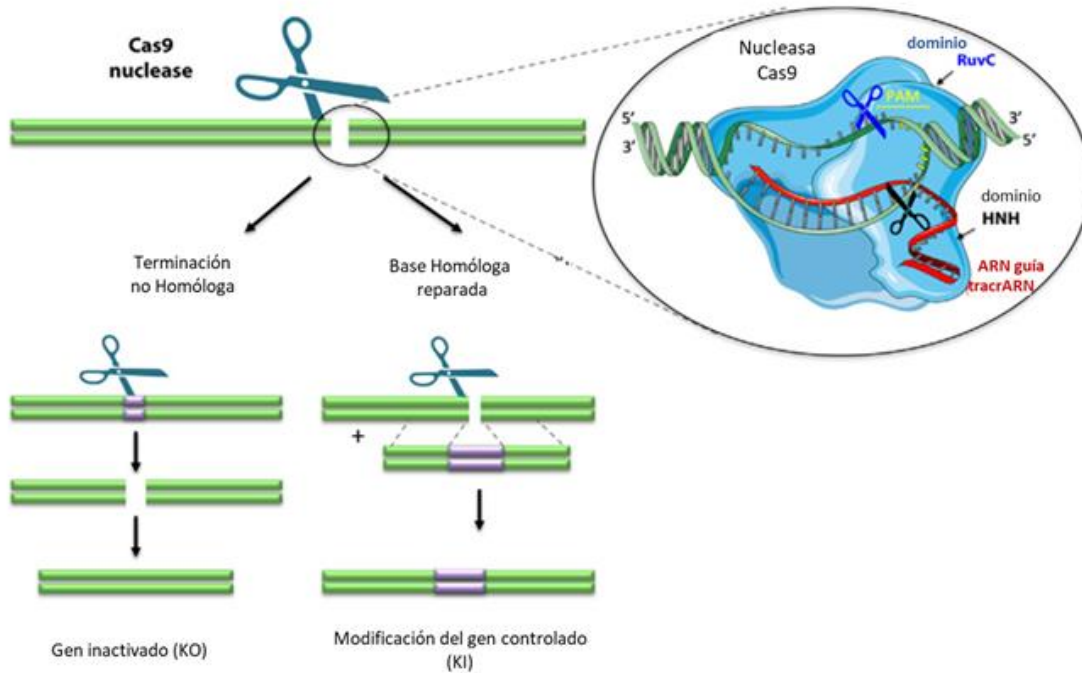


Figura 9: Representación de la tecnología CRISPR-Cas9. KO: knock-out; KI: knock-in. Extraído de Duroux-Richard 2017 (145).

3.1 Reprogramación por el Sistema CRISPR-on

Uno de los obstáculos a sortear para desembarcar a la clínica con terapias de reemplazo celular, es la incapacidad de obtener fenotipos celulares maduros luego de la reprogramación. Esto significa que cuando se llega a reprogramar una célula madre, esta célula reprogramada se parece a la célula fisiológica deseada, pero no es igual y sus principales funciones se ven empobrecidas.

Si bien las estrategias de diferenciación utilizando señales exógenas en medios de cultivo definidos, permiten obtener fenotipos similares a los maduros, nuevas estrategias están siendo

exploradas para mejorar la reprogramación. Una de las posibilidades es trabajar sobre la epigenética de las células a reprogramar, empleando la tecnología CRISPR-Cas9 con unas modificaciones que se explican a continuación.

En el año 2013 Lei Qi y su grupo (147) desarrollaron una estrategia llamada CRISPR-on para cambiar el patrón epigenético de un gen y por lo tanto activarlo. La Cas9 es una ADN endonucleasa que posee multidominio y multifunción (148). Contiene dos dominios de nucleasa distintos responsables de la escisión del ADN bicatenario: el dominio HNH de Cas9 escinde la cadena de ADN objetivo, mientras que el dominio tipo RuvC de Cas9 corta la hebra complementaria (149,150). Mutaciones en ambos dominios de nucleasa dan como resultado una proteína de unión al ADN guiada por ARN sin actividad endonucleasa (147,150). Esta Cas9 deficiente se denomina dCas9 y cuando ésta se fusiona con dominios efectores que poseen distintas funciones reguladoras, permite la utilización del sistema CRISPR-dCas9 como una plataforma versátil, con un ARN guía que tiene la posibilidad de identificar una secuencia de ADN específica sin la actividad de corte. Esta particularidad permite una modificación del genoma más allá de la edición permanente del mismo (151), pudiendo modificar la regulación génica (147,152) y la modulación epigenética (153,154).

Específicamente, la fusión de dCas9 a dominios efectores permiten una activación transcripcional puntual y eficiente del genoma en diversos organismos (155). El sistema CRISPR-on pueden dirigirse a la región promotora específica del gen de interés. La activación puede ser utilizando uno o varios dominios activadores como VP64 (cuatro copias de la proteína 16 del virus del herpes simple), o un modificador epigenético, como la acetiltransferasa de histonas p300. Por lo

tanto, CRISPR-on puede funcionar activando directamente la transcripción, modificando la conformación de la cromatina, o bien reclutando activadores transcripcionales y / o epigenéticos adicionales en una región blanco del ADN (156).

El sistema CRISPR-dCas9-VP64 es capaz de activar genes endógenos dirigidos y representa el sistema CRISPR-on de primera generación, mientras que todas las demás versiones mejoradas se consideran generalmente como sistemas de activación de segunda generación. Además, el uso de múltiples sgARNs logra la activación sinérgica de una amplia gama de genes seleccionados y la secuenciación de ARNs demostró que la activación genética dirigida era específica sin la activación de genes que se encontraban por fuera del objetivo (157,158). Acorde a lo esperado, aumentando el número de dominios repetidos de VP16, como dCas9-VP96, dCas9-VP64, dCas9-VP160 y dCas9-VP192 , la regulación de los genes endógenos resulta más eficiente (106,159–161)

En definitiva, el sistema CRISPR-on incluye una parte que sirve para posicionar el complejo CRISPR-on sobre un gen deseado (la sgARN) y otra parte encargada de activar la expresión (ej: dCas9 asociada a VP16) (Figura 10), como así también se puede fusionar a otros dominios activadores como veremos en el transcurso de esta tesis.

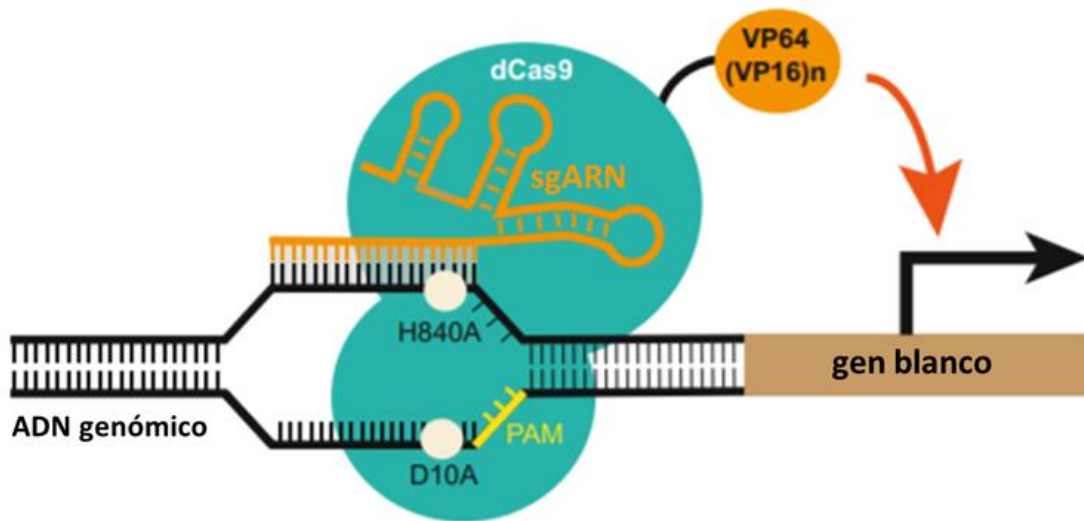


Figura 10: Esquema del funcionamiento del sistema CRISPR-on sobre el ADN. PAM: motivo adyacente del protoespaciador (del inglés *Protospacer adjacent motif*). Cuando el sistema CRISPR-on se posiciona sobre un gen, el dominio accesorio VP64 activa el gen mediante el reclutamiento de la maquinaria de transcripción. Adaptado de Chen y Qi, 2017 (156).

Esta herramienta molecular se ha utilizado exitosamente por nuestro grupo en protocolos de reprogramación celular para activar genes específicos (110) y en futuros ensayos la posibilidad de trabajar con el ARNm de estas construcciones, podrían facilitar su desembarco a la clínica.

4. Justificación de la tesis

Debido a que las células ciliadas del oído interno carecen de capacidad regenerativa, es necesario desarrollar nuevas estrategias para generar células ciliadas *in vitro* que puedan ser usadas en futuras terapias de reemplazo celular en pacientes hipoacúsicos.

5.

Hipótesis

Las células madre mesenquimales obtenidas a partir de tejido adiposo humano son capaces de diferenciarse en células "tipo" ciliadas de oído interno.

6.

Objetivos

General

El objetivo general de este trabajo de tesis es obtener *in vitro* células "tipo" ciliadas de oído interno a partir de la diferenciación de células madre mesenquimales humanas provenientes de tejido adiposo.

Específicos

- Aislar, expandir y caracterizar las células madre mesenquimales de tejido adiposo humano.
- Diferenciar *in vitro* células madre mesenquimales de tejido adiposo humano a células "tipo" progenitoras óticas y "tipo" ciliadas de oído interno mediante reprogramación química.
- Caracterizar las células reprogramadas obtenidas mediante reprogramación química.
- Utilizar el sistema CRISPR-on para la activación de genes específicos del desarrollo de células de oído interno.

- Complementar la reprogramación química con el sistema CRISPR-on para obtener fenotipos maduros.

Aislamiento y Caracterización de Células Madre Mesenquimales de Tejido Adiposo

7.1 Introducción

A lo largo de los últimos años, el tejido adiposo ha sido reconocido como una fuente rica en células madre (80). El SVF del tejido adiposo es el sitio de origen de las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs) (81).

Basado en análisis de citometría de flujo, las ASCs expresan antígenos típicos tales como: Stro1, CD29, CD73, CD90, CD105 y CD146, y son negativas para: CD14, CD34 y CD45. Tampoco expresan marcadores endoteliales como el factor de von Willebrand (88,94,162,163).

Estas células tienen la capacidad de diferenciarse hacia diferentes células de varios tejidos pertenecientes o no a la capa embriológica que le dio origen (164).

Este capítulo tiene como objetivo aislar, cultivar, caracterizar ASCs de origen humano (hASC) y demostrar su multipotencialidad hacia los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico.

7.2 Materiales y Métodos

Donantes

Las muestras de tejido adiposo humano fueron obtenidas de pacientes quirúrgicos del Hospital Italiano (n: 23) bajo consentimiento informado (Anexo I) de los pacientes y con la aprobación del

Comité de Ética y Protocolos de Investigación (CEPI) del Hospital Italiano de Buenos Aires, resolución número E/54. Este tejido habitualmente es descartado por tratarse de cirugías de reducción mamaria, lipoaspiraciones y abdominoplastias realizadas por el Servicio de Cirugía Plástica.

Aislamiento de la fracción estromal vascular (SVF)

Las metodologías para aislar células del tejido adiposo fueron descriptas en la década del 60 y luego adaptadas para la obtención de la SVF (165–167). En este trabajo se utilizaron muestras de tejido adiposo de pacientes sanos, provistas por el Hospital Italiano, a partir del cual se aisló la SVF (conteniendo las células madre mesenquimales).

Las muestras fueron tomadas bajo condiciones asépticas (Figura 11 A), trasladadas al laboratorio (Figura 11 B y C)) y lavadas tres veces con Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma, Buenos Aires, Argentina) con 2 % de eritromicina (ATB, Gibco, California, EE. UU.) para remover el exceso de sangre. El tejido fibroso y los vasos sanguíneos se disecaron y descartaron cuidadosamente (Figura 12 A). El tejido restante se disgregó mecánicamente primero y enzimáticamente después. Se utilizaron 10 ml de colagenasa tipo I al 0,1 % (Gibco) por cada 1 gramo de tejido. El tejido y la enzima fueron incubados durante 45 minutos a 1 hora en cámara de 37°C con agitación suave (0,28 g) en un agitador orbital con calefacción (Thermo Scientific modelo 420).



Figura 11 A: Obtención y B y C: traslado de las muestras de tejido adiposo al laboratorio

La actividad de la enzima fue neutralizada con el agregado del doble de volumen de un medio conteniendo: Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM, Gibco) suplementado con 20 % de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco) y 1 % de eritromicina. Luego las muestras se centrifugaron a 400 g durante 12 minutos para separar los adipocitos maduros flotantes de la SVF localizada en el pellet (Figura 12 B y C). Se descartaron las dos fases superiores conteniendo el aceite, los adipocitos flotantes, la enzima, el medio y el suero (fase acuosa). La SVF fue resuspendida en medio estándar compuesto por DMEM baja glucosa (Gibco) con 10% de SFB y 1% de ATB. Se realizó el recuento celular y se evaluó la viabilidad de las células utilizando el ensayo de exclusión con Azul Tripán. Las células fueron sembradas en placas de 60 mm (Cellstar, greiner bio-one) y cultivadas en estufa gaseada a 37 °C, 5 % de CO₂ y 100 % humedad. Una vez alcanzado el 80-100 % de confluencia se efectuaron los sucesivos pasajes para expandir la población hasta ser usadas en los protocolos de diferenciación.

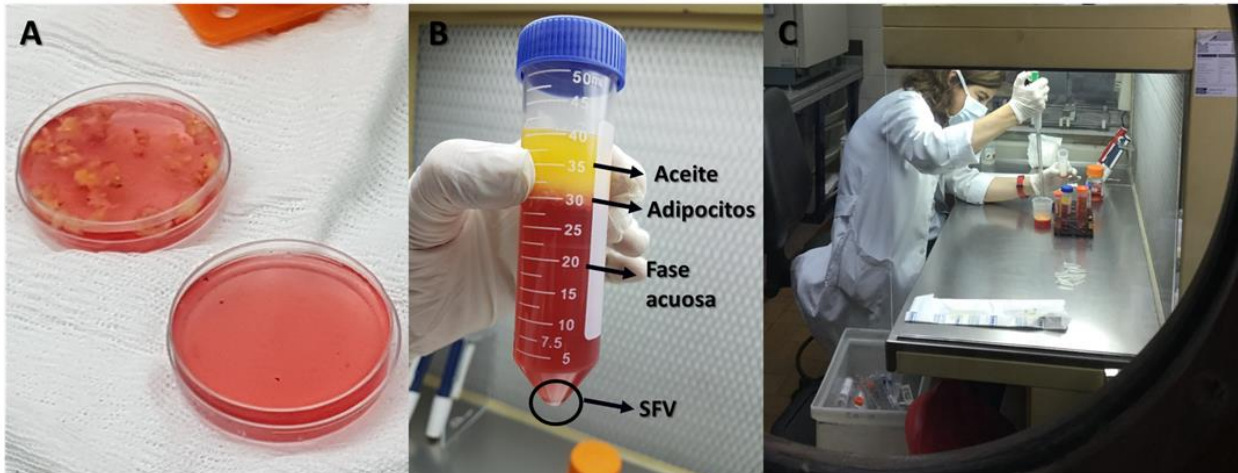


Figura 12: Aislamiento de la SVF y cultivo de células madre mesenquimales humanas (hASC). A: Digestión mecánica; B: Fases del Centrifugado. El círculo negro indica la SVF; C: Obtención de la SVF.

Cultivo Celular

Las células madre mesenquimales obtenidas (en adelante hASC - *human adipose stem cells*-) se cultivaron en condiciones estándares (37°C, 5% CO₂) en placas de 30 o 60 mm (Nunc International, Roskilde, Denmark) (Figura 13) dependiendo del tamaño del *pellet* y como se indicó en el apartado superior, se empleó medio DMEM suplementado con 20% de SFB y 1% de ATB. Luego de 48 horas, las células no adherentes fueron removidas a través de un cambio de medio. Una vez que las células primarias (Pasaje 0) alcanzaron el 80-100% de confluencia, las células fueron repicadas a través de una digestión enzimática con tripsina-EDTA (0.25%, Sigma) a 37°C durante 5 min, lavadas con medio estándar para inactivar la tripsina 1 vez, y luego centrifugadas 400 g por 10 minutos; para finalmente ser expandidas en placas de cultivo de 100 mm (Nunc International, Roskilde, Denmark). El medio de cultivo fue cambiado dos veces a la semana. Las células se mantuvieron en cultivo. Se las caracterizó del pasaje I al VII y se las cultivó hasta el

pasaje III - VII, para emplearlas en los diferentes experimentos. Para los experimentos de determinación de capacidad de diferenciación multilínea se utilizaron células en los pasajes III - V. Para los experimentos de diferenciación a progenitores ósticos se utilizaron células en los pasajes V -VII.



Figura 13: Cultivo celular en estufa gaseada a 37 °C, 5 % de CO₂ y 100 % humedad.

Por otro lado, en este trabajo de tesis se emplearon otras líneas celulares para poner a punto ensayos y como controles. Concretamente se utilizaron células de la línea HEK293 y HeLa provistas por el Instituto de Medicina Traslacional e Ingeniería Biomédica (IMTIB). Estas células fueron sembradas en placas de 30 mm (Cellstar, greiner bio-one) y cultivadas en estufa gaseada a 37 °C, 5 % de CO₂ y 100 % humedad. Se cultivaron en medio estándar (DMEM + 10% de SFB + 1% de ATB) hasta alcanzar el 70/80% de confluencia, momento en el cual fueron empleadas para los experimentos.

Caracterización de las hASC mediante Inmunocitoquímica (ICQ) y Citometría de Flujo

Inmunocitoquímica

Ensayos de ICQ para la caracterización de hASC

La determinación de marcadores de las hASC se realizó mediante ICQ. Esta técnica permite identificar *in situ* un antígeno celular mediante una reacción antígeno-anticuerpo, que se visualiza gracias a una molécula marcadora. Para la inmunomarcación se siguió un protocolo previamente puesto a punto para cada anticuerpo utilizado. El protocolo empleado se muestra en la tabla suplementaria (Tabla S1). En líneas generales, si se parte de células en cultivo se realiza una fijación con paraformaldehído al 2- 4%, mientras que si el material de partida es tejido incluido en parafina se realiza una desparafinización e hidratación pasando la muestra por xilol y alcoholes de graduación decreciente. El paso siguiente es la recuperación antigénica para el cual utilizamos el calentamiento de la muestra en horno microondas como método, utilizando buffer de recuperación elegido según cada caso: Buffer Citrato 0,01 M, pH 6 o Tris-EDTA pH 9. Luego se realiza un paso de permeabilización con Tritón 0.1% o Metanol Frío y de bloqueo de las uniones inespecíficas con el reactivo comercial PowerBlock (Biogenex). Posteriormente se incubó el anticuerpo primario durante toda la noche (en cámara húmeda) a 4°C. Al día siguiente se incubó el anticuerpo secundario y luego se revela con Fluoresceína (FITC) o Texas Red (1:50, 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, USA) en Solución Buffer Fosfato (PBS) pH 8.2. Por último, en algunos casos se realiza una contra-coloración nuclear con el fluorocromo Hoechst 33258 (Sigma) durante 20 minutos. Las placas fueron examinadas bajo el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400) y las imágenes fueron captadas por una cámara digital acoplada al mismo (Nikon DS-Fi2).

En todos los casos se realizaron controles de especificidad sustituyendo el anticuerpo primario con un suero no inmune. Los controles positivos consistieron en tejidos cuya reacción positiva fue comprobada con anterioridad (Tabla S2).

Citometría de Flujo

Las hASC se caracterizaron fenotípicamente con un panel de anticuerpos para células madre por Citometría de flujo. Los anticuerpos utilizados fueron Anti CD29, CD73, CD90, CD105, CD45, CD34, CD14 y CD 146.

Se lavaron las placas de cultivos con HBSS y se repicaron a través de una digestión enzimática con tripsina-EDTA 0.25% a 37°C durante 5 minutos, se lavaron con medio estándar para inactivar la tripsina, y luego se centrifugaron a 400 g por 10 minutos; el pellet celular se resuspendió en PBS, se cuantificó la muestra en cámara de Neubauer. Se fijaron las células con 100 µl de paraformaldehído al 4% por 10 minutos. En cada ensayo se utilizaron 100 µl de muestra conteniendo aproximadamente 250.000 células. Se adicionó 5 µl de solución de albúmina (Sigma-Aldrich) 2mg/ml junto con el volumen correspondiente de cada anticuerpo de citometría utilizado, se incubó en oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y finalmente se resuspendió en 1ml de PBS. En estas condiciones se realizó la adquisición y el análisis con el citómetro de flujo (Sysmex, modelo: CyFlow® Spacecon) panel para células madre: CD90, CD73, CD105, CD14, CD34, CD45, 146 (BD Pharmingen/BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos).

Potencial multilinaje

Se corroboró el potencial multilinaje de las hASC llevándose a cabo inducción osteogénica, adipogénica y condrogénica (80,164,168).

Diferenciación Osteogénica

Para la diferenciación osteogénica, las hASC (pasaje III - V) fueron sembradas a una densidad de 3000 células/cm² e incubadas en medio estándar hasta alcanzar 60% de confluencia. El medio fue reemplazado con medio de inducción osteogénico, el cual consiste en medio estándar suplementado con 10 µM β-glicerofosfato (Sigma-Aldrich), 50 µM ascorbato-2-fosfato (Sigma-Aldrich), 100 µM dexametasona (Sigma-Aldrich) . El medio osteogénico fue cambiado dos veces a la semana hasta completar los 21 días de diferenciación. Los cultivos control fueron mantenidos en medio estándar.

Al día 21, las células fueron fijadas en etanol 70% frío durante 60 minutos y luego la diferenciación osteogénica fue evaluada incubando las células fijadas durante 30 minutos en la solución acuosa de Rojo Alizarina al 2% (Biopack, Buenos Aires, Argentina).

Diferenciación Adipogénica

Para la diferenciación adipogénica, las hASC (pasaje III - V) fueron sembradas y cultivadas en monocapa hasta que alcanzaron 60% de confluencia. Los cultivos subconfluentes fueron incubados en medio de inducción adipogénico conteniendo DMEM alta glucosa (Gibco), 10% SFB, 1% ATB, 1 µM dexametasona (Sigma-Aldrich), 0.5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX) (Sigma-Aldrich), 10 µM de insulina (Gibco) y 200 µM indometacina (Sigma-Aldrich), durante 2 días, y luego en medio de mantenimiento adipogénico conteniendo DMEM Alta Glucosa, 10% SFB, 1 µM

dexametasona y 10 μ M de insulina durante otros 2 días. La inducción fue llevada a cabo cultivando las células 2 días en medio de inducción, luego 2 días en medio de mantenimiento, y así sucesivamente hasta completar los 21 días de protocolo. Los cultivos control fueron mantenidos en medio estándar durante los 21 días de diferenciación.

La adipogénesis fue evaluada utilizando la coloración de Oil Red O (Biopack), para lo cual las células fijadas en 4% de paraformaldehído fueron incubadas en solución de Oil Red O preparada en el día durante 20 a 50 minutos.

Diferenciación Condrogénica

Para la diferenciación condrogénica, se utilizaron dos sistemas de cultivo: en micromasa y en pellet. En el primero de ellos, se sembraron en una placa de cultivo 4 microgotas de 10 μ l conteniendo 100.000 células cada una, se incubó la placa con las microgotas durante 2 horas en la estufa gaseada a 37°C, y a continuación se agregó el medio de inducción condrogénico. En el segundo sistema, las hASC fueron ligeramente centrifugadas en un tubo cónico de 15 ml (Nunc) para formar pequeños pellets y cultivarlos 21 días en el medio condrogénico. Este medio consiste en medio estándar suplementado con 20 μ g/ml TGF- β 1 (Sigma-Aldrich), 40 μ g/ml L-prolina (Sigma-Aldrich), 50 μ g/ml ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), 100 nM dexametasona, 100 μ g/ml piruvato de sodio (Sigma-Aldrich), 6.25 mg/ml insulina, 6.25 mg/ml transferrina (Sigma-Aldrich) y 6.25 ng/ml selenito de sodio (Sigma-Aldrich). El medio de inducción fue renovado cada 3 días durante los 21 días de protocolo.

Los acúmulos o pellets condrogénicos fueron fijados en 4% de paraformaldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron incluidas en parafina, cortadas con micrótopo y las secciones teñidas con la solución de Azul de Toluidina (Biopack) al 1%.

Análisis estadístico

Para cada marcador evaluado por ICQ se contaron en 10 campos (40X) al azar la cantidad de células totales y el porcentaje de células positivas.

7.3 Resultados

Se procesaron 13 muestras de tejido adiposo humano, a partir de las cuales se obtuvo la fracción estromal vascular que contiene a las hASC. Se realizó el cultivo de las mismas hasta el pasaje VII. Se observó una población celular heterogénea en los primeros pasajes que se fue homogeneizando hasta la obtención de una población de células con morfología ahusada, tipo fibroblastoide fusiforme característica. Las células se adhirieron al plástico de la placa de cultivo y se autorreplicaron (Figura 14).

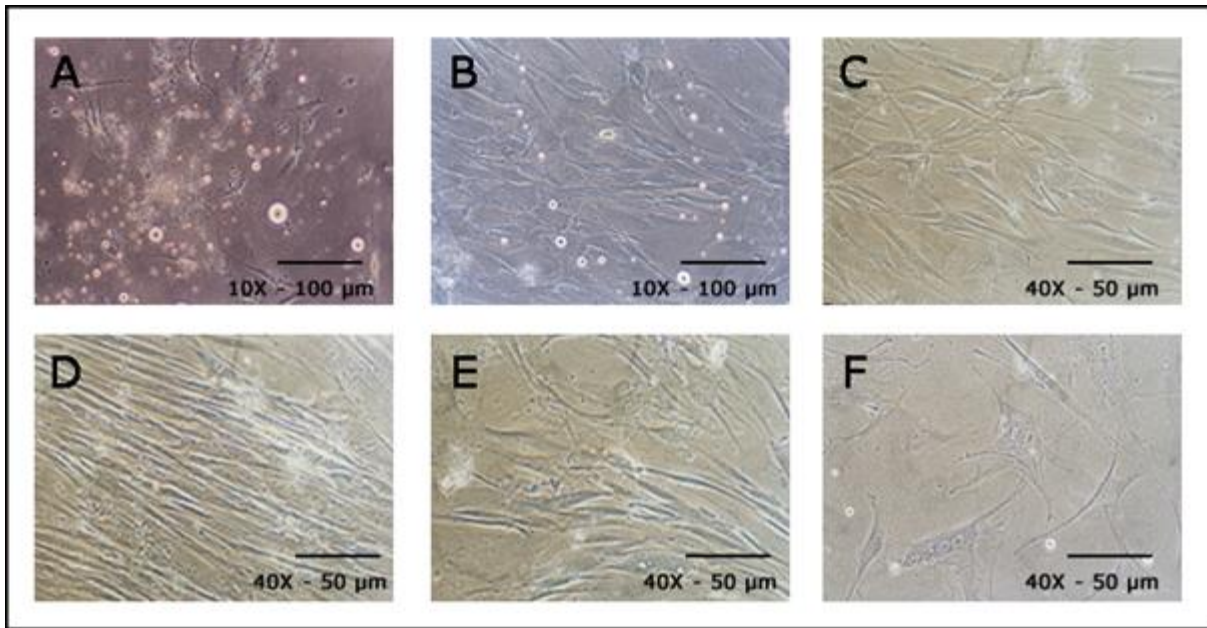


Figura 14: Morfología de las hASC. Fotografías microscópicas. A: pasaje 0 a 3 días de cultivo; B: pasaje I. Magnificación original 10X. C: pasaje II; D: pasaje III; E: pasaje IV; F: pasaje V. Magnificación original 40X. Barra 50 μm

Se realizó la caracterización por inmunocitoquímica de las hASC de los pasajes I a VII, las células expresaron CD90, CD29, CD73, CD105, Nestina y Stro1 (Figura 15). En la tabla 1 se puede observar la expresión génica de los marcadores característicos de estas células CD90, CD29, CD73, CD105 y Stro1 durante los sucesivos pasajes.

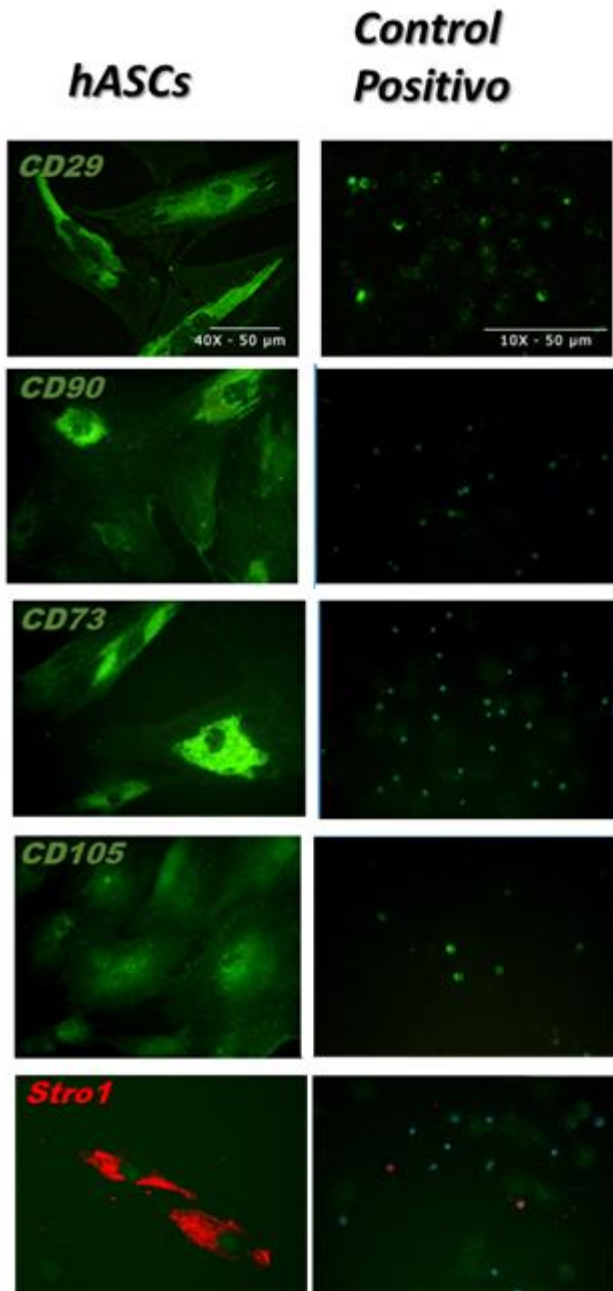


Figura 15: Caracterización de las hASC (pasaje V) por inmunocitoquímica. Fotomicrografías donde se observa la expresión de CD29, CD90, CD105, CD75 y Stro1. Magnificación original 60X. Controles positivos de CD29, CD90, CD105, CD73 y Stro1 médula ósea de ratón. Magnificación original 10X. Barra 50 μ

Tabla 1: Porcentaje de células positivas para los marcadores de hASC en los sucesivos pasajes.

Marcador	Repiques						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
CD29	23,74	32,5	30,89	48,1	45,21	55,67	64,58
CD73	17,42	16,46	28,04	36,31	48,15	53,26	54,46
CD90	18,38	32,26	38,77	44,64	56,5	63,32	51,24
CD105	6,2	18,94	41,67	38,49	33,97	44,84	61,25
Stro1	14,02	10,87	31,55	42,59	53,15	70,71	62,92

En contraste, y por el mismo método, se observó, en las hASC (pasaje I a VII) ausencia de los marcadores CD34 (Figura 16 A) y CD45 (Figura 16 B), asociados con células madre de médula ósea. Las marcaciones endoteliales con el factor de Von Willebrand y Actina resultaron también negativos (datos no mostrados).

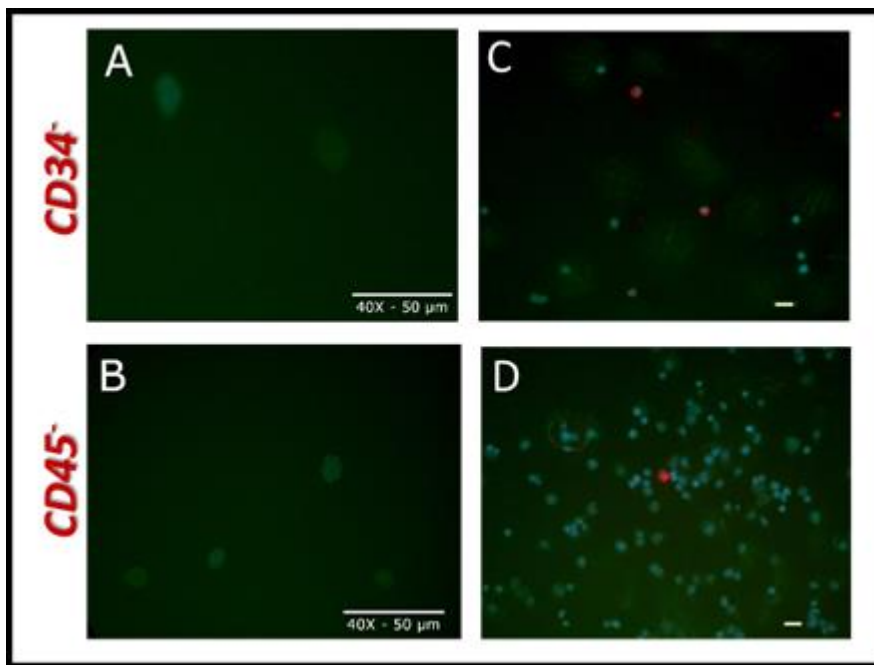
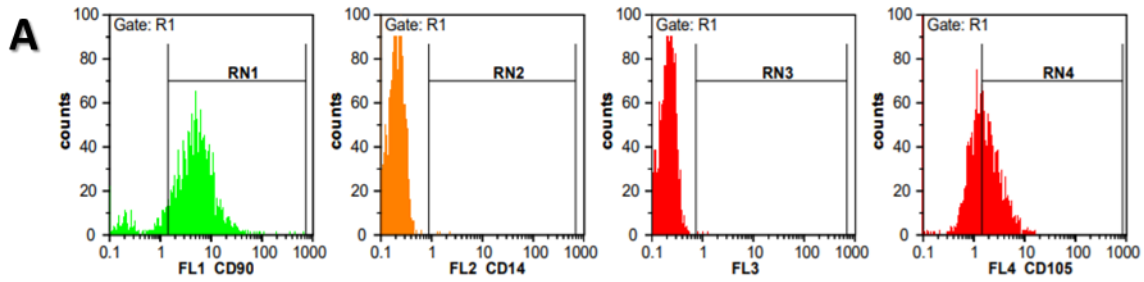


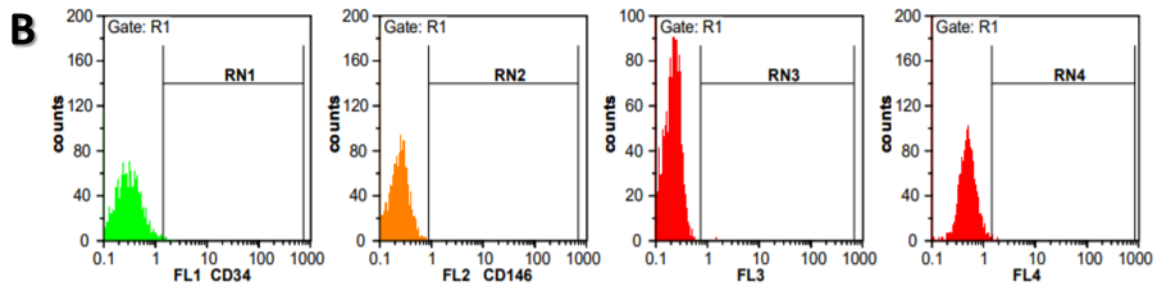
Figura 16: Caracterización de las hASC (pasaje V) por inmunocitoquímica. Fotografías de la microscopía. Se observó ausencia de expresión de los marcadores hematopoyéticos en las hASC (A: CD34 y B: CD45). Magnificación original 40X. Controles positivos C: CD34 (rojo) y D: CD45 (rojo) extendido de médula ósea de ratón. Magnificación original 10X. Barra 50 μ m.

También se caracterizaron las hASC en pasaje V por citometría de flujo utilizando el panel de anticuerpos como se describió en materiales y métodos de este capítulo. En esta población se observaron marcadores de superficie positivos para CD73 (37%) (Figura 17 B), CD90 (87%) y CD105 (49%) (Figura 17 A). El 48% de las células co-expresaban CD105 y CD90 (Figura 17 A). Los marcadores DC45 (Figura 17 B), CD34, CD146 (Figura 17 C) y CD14 (Figura 17 A) fueron negativos.

File: M2_003.FCS Date: 28-11-2017 Time: 15:36:37 Particles: 5000 Acq.-Time: 184 s



File: M3_004.FCS Date: 28-11-2017 Time: 15:41:36 Particles: 5000 Acq.-Time: 201 s



File: M4_005.FCS Date: 28-11-2017 Time: 15:47:34 Particles: 5000 Acq.-Time: 133 s Concentration: 17750 / ml

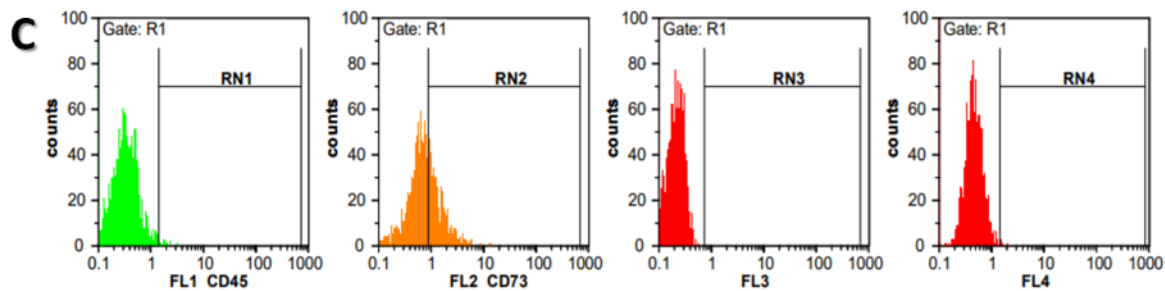


Figura 17: Caracterización de hASC por citometría de flujo. A: Ensayo con marcadores CD90, CD105 y CD14; B: Ensayo con marcadores CD45 y CD73 y C : Ensayo con marcadores CD34 y CD146.

Potencial multilínea

Al cultivar las hASC en los medios de diferenciación específicos para cada linaje éstas se diferenciaron al linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico.

Diferenciación Osteogénica

Posterior al tratamiento con el medio osteogénico, se observó la formación de acúmulos de células (Figura 18 B). La tinción positiva con el colorante Rojo Alizarina que detecta la formación de cristales de calcio, indicó su diferenciación al linaje osteogénico (Figura 18 D). Este comportamiento no se observó en las hASC sin tratar (Figura 18 C).

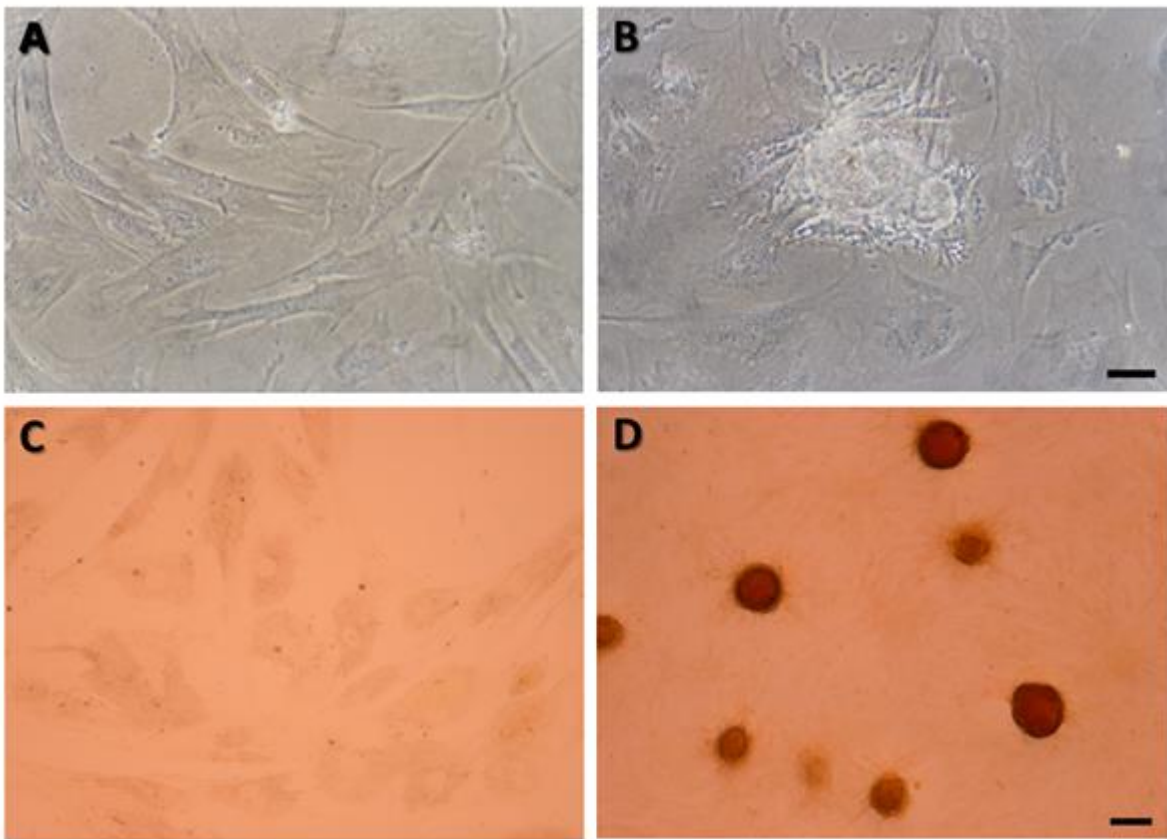


Figura 18: Diferenciación osteogénica. Fotografías microscópicas. Cambios morfológicos; A: Control células hASC y B: Células diferenciadas. Tinción con Rojo Alizarina; C: Control células hASC y D: Células diferenciadas. Magnificación original 40X. Barra: 100 μm .

Diferenciación Adipogénica

Al finalizar el protocolo de diferenciación adipogénica (21 días), se comprobaron cambios morfológicos (Figura 19 B y C) y la presencia de gotas lipídicas intracelulares coloreadas con Oil Red (Figura 19 E y F). No se observó tinción con el colorante en las hASC sin diferenciar (Figura 19 A y D).

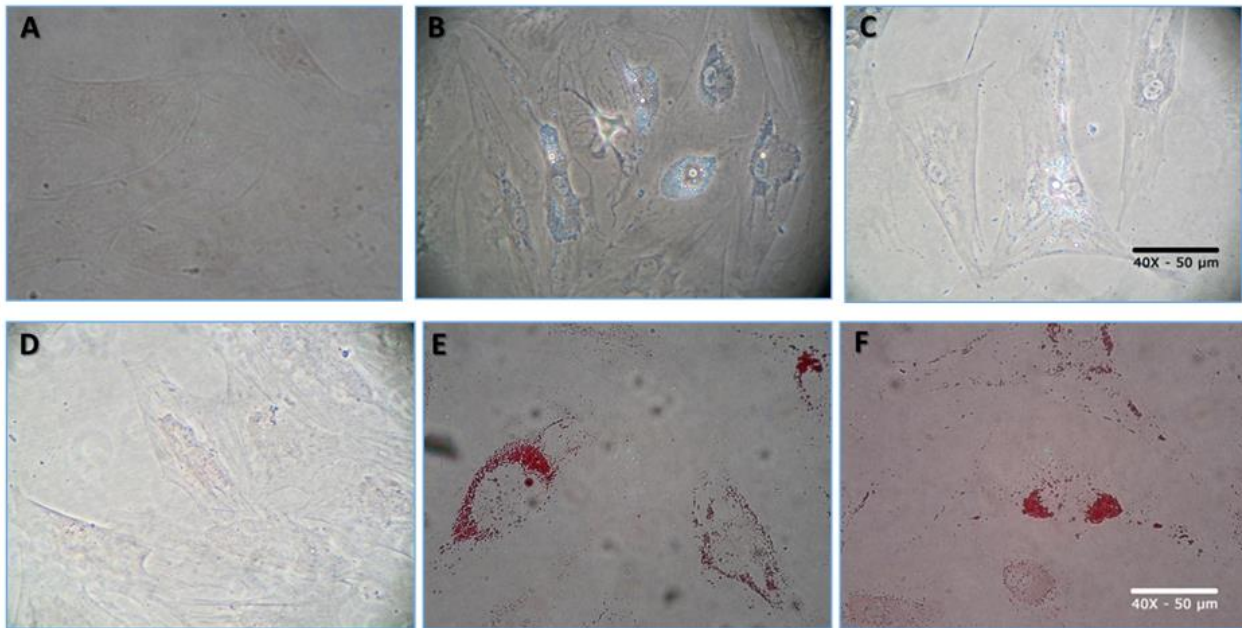


Figura 19: Diferenciación adipogénica. Fotografías microscópicas. Cambios morfológicos; A: Control células hASC, B y C: Células diferenciadas; D: control células hASC; E y F células diferenciadas teñidas con Oil Red. Magnificación original 40X. Barra 50 μm .

Diferenciación Condrogénica

Luego de la diferenciación condrogénica, las células formaron acúmulos y revelaron la secreción de una matriz de glicosaminoglicanos teñida de azul con el colorante Azul de Toluidina

característico del linaje condrogénico (Figura 20). En contraste, las hASC sin diferenciar no fueron capaces de formar acúmulos compactos y no se tiñeron con Azul de Toluidina (Figura 20).

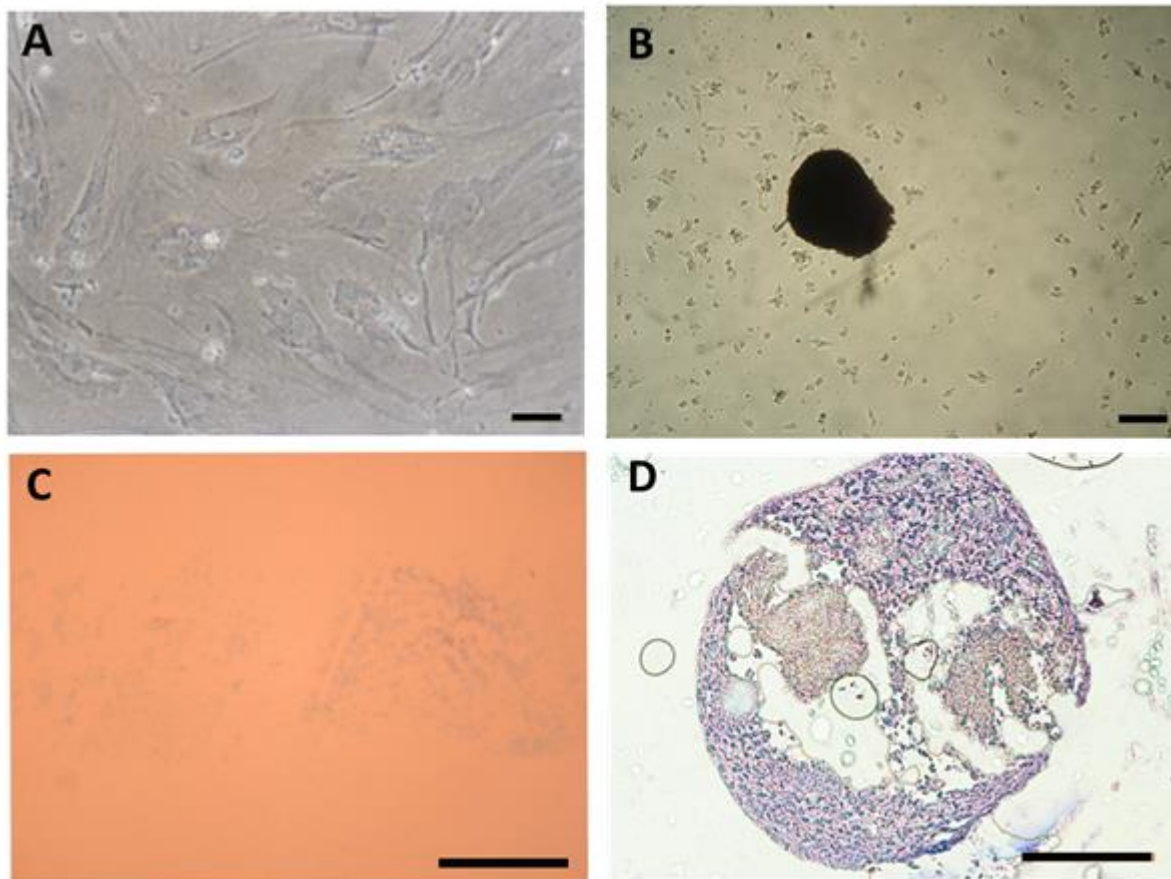


Figura 20: Diferenciación condrogénica. Fotografías microscópicas. Cambios morfológicos; A: Control células hASC y B: Células diferenciadas en acúmulos. Corte de acúmulos incluidos en parafina, C: Control células hASC y D: Células diferenciadas teñidas con Azul de Toluidina. Barra: 100 μ m.

7.4 Discusión

Las hASC aparecen como la población celular ideal para el uso en medicina regenerativa: son abundantes en suministro y fácilmente obtenibles desde tejido adiposo; podrían usarse en forma autóloga, no serían inmunogénicas; tienen una naturaleza multipotencial y fácilmente diferenciables en varias líneas celulares; tienen un potencial significativo de angiogénesis; se pueden cultivar fácilmente y tienen una gran afinidad por los andamios 3D (97,165–167). En este protocolo se tuvieron en cuenta estas características de las hASC al momento de elegir las como punto de partida para la diferenciación a células “tipo” ciliadas de oído interno.

Para la realización de este estudio hemos utilizado el método enzimático descrito por Zuk y col en el 2001 (168) Si bien se han reportado diferentes métodos para el aislamiento de hASC (165–167,169,170), el protocolo descrito en 2001 por Zuk y colaboradores es el método más utilizado para el aislamiento de ASC. Estos métodos enzimáticos, se encuentran destinados principalmente a fines experimentales, y se consideran menos adecuados en la práctica clínica ya que las enzimas proteolíticas pueden afectar la viabilidad celular y los antígenos de superficie (171). Sin embargo, se han publicado varios estudios clínicos que utilizaron SVF digerido con enzimas obteniendo excelentes resultados (172–174). Otros grupos han descrito el aislamiento de ASC utilizando métodos no enzimáticos (85,175–177), pero estos requieren grandes cantidades de lipoaspirado y tienen una menor eficiencia en la recuperación celular en comparación con los métodos enzimáticos (178).

Las células obtenidas de la SVF del tejido adiposo pueden utilizarse frescas, recién aisladas o cultivarlas antes de su uso. Las ASCs recién aisladas parecen ser una población más heterogéneas

en comparación con las células recolectadas y luego cultivadas (179). La forma del cultivo más utilizada es la monocapa (179–181). Con el objetivo de trabajar con un grupo celular más homogéneo, en este estudio se tomó la decisión de cultivar las células antes de someterlas a los diferentes protocolos de diferenciación.

La caracterización de las células obtenidas desde la SFV, siempre se realiza en estudios de ASC para confirmar la naturaleza mesenquimal de las células aisladas (182). En este trabajo se evaluaron los marcadores de las hASC entre los pasajes I a VII observándose un aumento de los mismos en los sucesivos pasajes. Las hASC utilizadas en los protocolos de diferenciación se encontraban entre el pasaje V y VII. El perfil de expresión de los antígenos de superficie de las hASC en este estudio se corresponde con los resultados publicados de otros grupos cuando se comparan los resultados cuantitativos (162,163,183). El inmunofenotipo en conjunto con los otros criterios funcionales (adhesión a la placa y diferenciación a los 3 linajes: osteogénico, adipogénico y condrogénico) son en la actualidad la mejor manera de identificar a las células madre mesenquimales (73). Quisimos comparar nuestros porcentajes de marcadores de hASC con los de otros autores que también utilizaron estas células en protocolos de diferenciación y encontramos que varios autores no informan los porcentajes de los marcadores obtenidos (184–190)

De acuerdo con los criterios definidos, para completar la caracterización de las ASCs, además de los marcadores moleculares, se debe comprobar su multipotencialidad y capacidad de diferenciarse a linajes osteoblásticos, condrocíticos y adipocíticos (191). En algunos casos, se proponen kits comerciales adecuados que contienen suplementos de medios especialmente formulados y soluciones de tinción citoquímica y / o un panel de anticuerpos para evaluar la

diferenciación que ocurre en los diferentes linajes celulares (179). En este estudio no se utilizaron kits comerciales y se llevaron a cabo los protocolos propuestos por tres trabajos de referencia (80,164,168), pudiendo comprobar por medio de tinciones citoquímicas la multipotencialidad de las hASC a los tres fenotipos esperados (adipogénico, condrogénico y osteogénico).

7.5 Conclusión

Los protocolos llevados a cabo en este trabajo demostraron ser eficientes para aislar y cultivar hASC desde la SVF del tejido adiposo. Las células obtenidas exhibieron la capacidad de autorrenovarse y expresar marcadores fenotípicos característicos de células madre mesenquimales por inmunocitoquímica y por citometría de flujo. Las hASC mostraron adhesión a la placa, se multiplicaron y demostraron su multipotencialidad al diferenciarse a diferentes linajes mesenquimales: adipogénico, condrogénico y osteogénico al ser sometidas a medios de cultivo específicos.

8.

Capítulo II

Reprogramación Celular por Métodos Químicos

8.1 Introducción

Se han realizado muchos esfuerzos para optimizar el sistema de reprogramación utilizando proteínas permeables a la membrana celular y compuestos de moléculas pequeñas (124). Se han identificado moléculas pequeñas para mejorar y permitir la reprogramación mediante la regulación de diversos mecanismos y proporcionar un enfoque altamente temporal para modular el destino y las funciones celulares (98).

Este capítulo tiene como objetivo diferenciar *in vitro* hASC en células “tipo” ciliadas de oído interno utilizando métodos químicos.

8.2 Materiales y Métodos

Diferenciación química de hASC a células “tipo” progenitores óticos (10 días) + células “tipo” ciliadas (38 días más)

Para este experimento se utilizaron hASC entre los pasajes V y VII de cultivo. Se realizó la puesta a punto del protocolo de diferenciación de progenitores óticos + células ciliadas, obteniéndose los resultados esperados empleando 10 días de diferenciación a progenitores óticos + 38 días de

diferenciación a células ciliadas (Figura 21) con cambio del 70% del medio cada 6 días. Los medios de cultivo, suplementos y factores de crecimiento utilizados fueron los siguientes:

- **Para la diferenciación a células “tipo” progenitoras óticas:**

DMEM Alta Glucosa: F12 (1:1) (Gibco) + suplemento B27 (2%) (Gibco)+ suplemento N2 (1%) (Gibco)+ 50 ng/ml FGF3 (R&D Systems Minneapolis, EEUU) + 50 ng/ml FGF10 (R&D Systems) + 50 ng/ml IGF-1(Invitrogen, Buenos Aires, Argentina).

- **Para la diferenciación a células “tipo” ciliadas:**

DMEM Alta Glucosa: F12 (1:1) + suplemento B27 (2%) + suplemento N2 (1%).

El B27 y el N2 son suplementos químicamente definidos, libres de suero que contienen vitaminas, proteínas y otros componentes que enriquecen el medio basal.

Al finalizar el protocolo se estudiaron los marcadores: PAX2, PAX8 y BMP7 (del inglés, *Bone morphogenetic protein 7*), *EYA1* y *p27^{kip1}* como marcadores de células “tipo” progenitoras óticas, y los genes *MYOVIa*, *POU4F3* y *ATOH1* como marcadores de células "tipo" ciliadas de oído interno. Además, se analizaron los marcadores *NESTINA* y *β III-TUBULINA* como marcadores neurales.

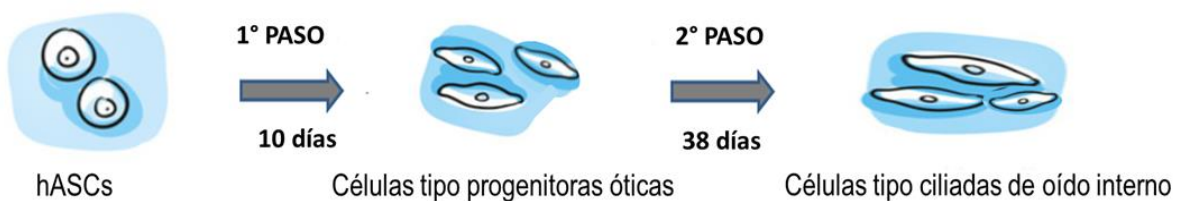


Figura 21: Esquema del protocolo de diferenciación química.

Ensayos de ICQ para la caracterización de hASC reprogramadas por métodos químicos

La determinación de marcadores de células ciliadas se realizó mediante ICQ según técnica descrita en materiales y métodos del Capítulo I. Los anticuerpos, las diluciones y los controles positivos utilizados en esta sección se especifican en la Tabla 2.

Tabla 2: Anticuerpos utilizados en la caracterización de células "tipo" progenitoras óticas y células "tipo" ciliadas de oído interno.

Anticuerpo primario utilizado	Dilución empleada	Proveedor	Control positivo
Anti-PAX2	1/500	Abcam	Cultivo de células HeLa
Anti-BMP-7	1/100	R&D Systems	Cultivo de células HeLa
Anti-PAX8	1/20	Abcam	Cultivo de células HeLa
Anti-ATOH1	1/10	Abcam	Cultivo de células HeLa
Anti-MYOSIN VIIa	1/200	Abcam	Testículo de rata adulta congelado
Anti-POU4F3	1/100	Abcam	Cultivo de células HeLa
Anti-βIII-TUBULINA	1/100	Chemicon	Cultivo de células HeLa
Anti-NESTINA	1/100	Abcam	Cultivo de células HeLa

Extracción de ARN total y tratamiento con DNasa

Para extraer ARN a partir de las hASC sin tratamiento y después de la diferenciación a células "tipo" progenitores óticos y a células "tipo" ciliadas de oído interno se empleó el kit de extracción RNeasy mini kit (Quiagen; Venlo, Netherlands). Previamente se obtuvo el pellet por centrifugación de las células y se procedió como lo indica el fabricante del kit.

El ARN obtenido fue cuantificado mediante lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm, esperando obtener una concentración mínima de 200 mg/ml. Posteriormente se procedió a tratar las muestras de ARN obtenidas con DNasa, para eliminar posible contaminación con ADN. Para ello se empleó 1-5 µg de ARN y se siguió el protocolo del kit de RQ1 DNasa (Promega, Estados Unidos), incubando los reactivos provistos en un baño a 37°C durante 30

minutos. Posteriormente se volvió a leer cada muestra en espectrofotómetro a 260 nm, y luego fueron guardadas a -80°C hasta su utilización.

Chequeo eliminación de ADN

Se realizó una PCR con un gen de control interno que amplifica ADN genómico además del cDNA (es decir, cuyos primers se encuentran dentro del mismo exón). La eliminación completa de ADN durante el tratamiento con DNasa mostró ausencia de banda en las muestras de ARN extraído. Se utilizó una muestra de ADN genómico como control positivo.

Retrotranscripción

A partir de cada ARN obtenido se realizó transcripción reversa (RT) para obtener el correspondiente ADN copia (ADNc). La reacción de RT se llevó a cabo empleando cantidades iguales de cada ARN (1 µg). En un primer paso se mezcló en un tubo de reacción, cada ARN, Oligo-dt como cebadores (0.5 µg/µl, Promega), Stop Solution (1 µg/µl DNasa utilizada) y se completó con agua hasta 20 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador, a 70°C durante 5 minutos. Luego se agregaron el resto de los reactivos: Buffer 5X, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10 mM y por último se agregó el Inhibidor de RNAsas-RIBOLOCK y la Enzima RT-Improm II (200U/µl, Promega) y se continuó la reacción a 25°C por 5 minutos, 1 h a 42°C y 15 minutos a 70°C. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystem Veriti (TermoFisher Scientific). El cDNA obtenido fue guardado a -20°C hasta su utilización.

PCR punto final

Luego de realizada la extracción de ARN y posterior RT, se determinó la expresión del ARNm de los genes *p27kip1*, *EYA1*, *ATOH1* y *β III-TUBULINA*. Para amplificar estos genes se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 3) utilizando el software Vector NTI Suite versión 6.0 (Infomax Inc., North Bethesda, MD, USA) y la herramienta online disponible de diseño de primers Primer-BLAST (NCBI). Los oligonucleótidos fueron probados y puestos a punto mediante reacciones de PCR punto final, confirmando la presencia de los productos por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 - 2%. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo siguiendo un protocolo estándar que consistió en ciclos (entre 30 y 40) de desnaturalización a 95°C (30 segundos), hibridación (30 segundos) a T° específica para cada primer y extensión a 72°C (30 segundos) (Tabla 3). Como gen de referencia se usó la determinación del ARNm del gen de Beta actina (Tabla 3). La temperatura de hibridación para cada amplicón se determinó mediante análisis *in silico* utilizando el software Vector NTI y Primer-Blast. Los controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación.

Tabla 3: Secuencia y condiciones de los oligonucleótidos empleados (Integrated DNA Technologies)

Primers	Secuencia 5' a 3'	Tamaño (pb)	T° hibridación
ATOH1	F: GTGAATGGGGTACAGAAGCA R: GGGTCTCATATTTGGACAGC	157	57°C
p27kip1	F: AGTACGAGTGGCAAGAGGTG R: GTTTGAGTAGAAGAATCGTCGGT	275	61°C
βIII-TUBULINA	F: GCCAAGTTCTGGAAGTCA R: TGGCCTCGTTAAGTAGCGC	110	56°C
EYA1	F: GTTTGGCAACTGGTGTACGG R: GTCAGGGCTTCAATTCGGC	169	61°C
B-ACTINA	F: CCCTTGCCATCCTAAAAGCC R: TGCTATCACCTCCCCTGTGT	86	60°C

Análisis estadístico

Para cada marcador evaluado por ICQ se contaron en 10 campos (40X) al azar la cantidad de células totales y el porcentaje de células positivas. Los resultados se expresan como la media \pm DE. El análisis de la expresión del ARNm de los genes evaluados por PCR se realizó de manera cualitativa mediante la visualización en geles de agarosa al 2%.

8.3 Resultados

Cambios morfológicos durante la reprogramación química

A lo largo de la reprogramación química las células sufrieron cambios morfológicos que fueron observados durante el primero y el segundo paso de diferenciación. Las hASC en las placas controles mantuvieron sus características: células grandes, con sus citoplasmas extendidos y su núcleo central. En las placas tratadas los citoplasmas se fueron retrayendo, hacia el núcleo, dando

lugar a cuerpos celulares más compactos con extensiones citoplasmáticas. Los cuerpos celulares se volvieron cada vez más esféricos y refringentes (Figura 22)

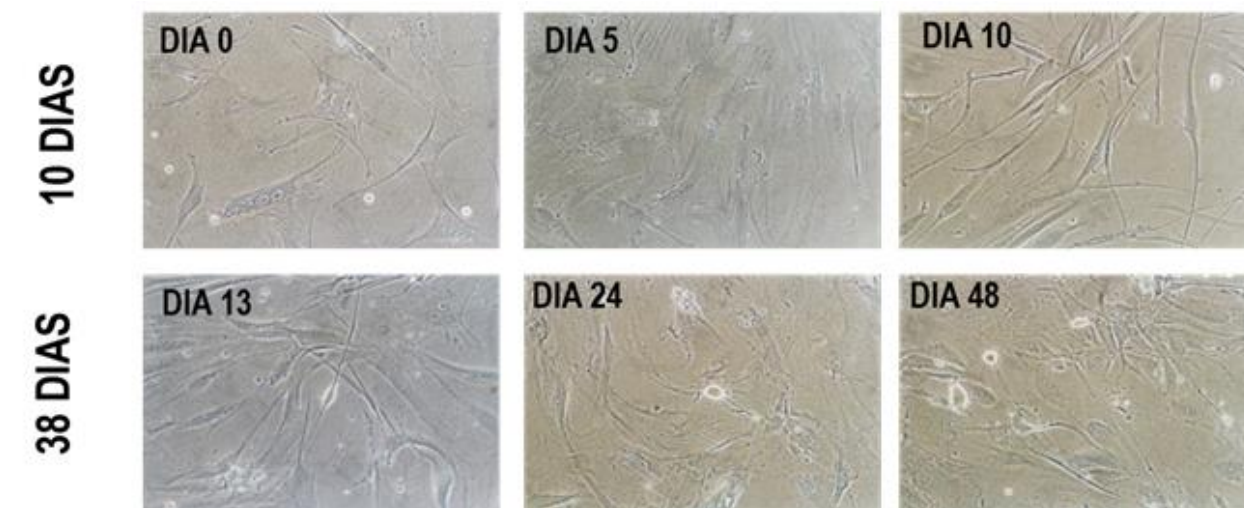


Figura 22: Microscopía. Cambios morfológicos de las hASC durante la reprogramación química a los 0, 5 y 10 días del primer paso (10 días) y a los 13, 24 y 48 días del segundo paso (38 días). Magnificación original 40X.

Diferenciación de hASC a células "tipo" progenitores óticos y a células "tipo" ciliadas de oído interno.

Se estudiaron 3 muestras siguiendo el protocolo de reprogramación química en 2 pasos. Se analizó la expresión de ARNm de *p27^{kip1}*, *EYA1*, *ATOH1* y *β III-TUBULINA* en las hASC y en las células sometidas a reprogramación química a los 10 y 48 días. Se observó ausencia del marcador neural *β III-TUBULINA* en los 3 casos. Otros genes marcadores de progenitores óticos como el *p27^{kip1}* y *Eya1* se encontraron en las células diferenciadas a "tipo" progenitores óticos (10 días), esta expresión disminuyó en las células "tipo" ciliadas de oído interno (48 días). No se observó la expresión de *ATOH1* en ninguna de las muestras (Figura 23).

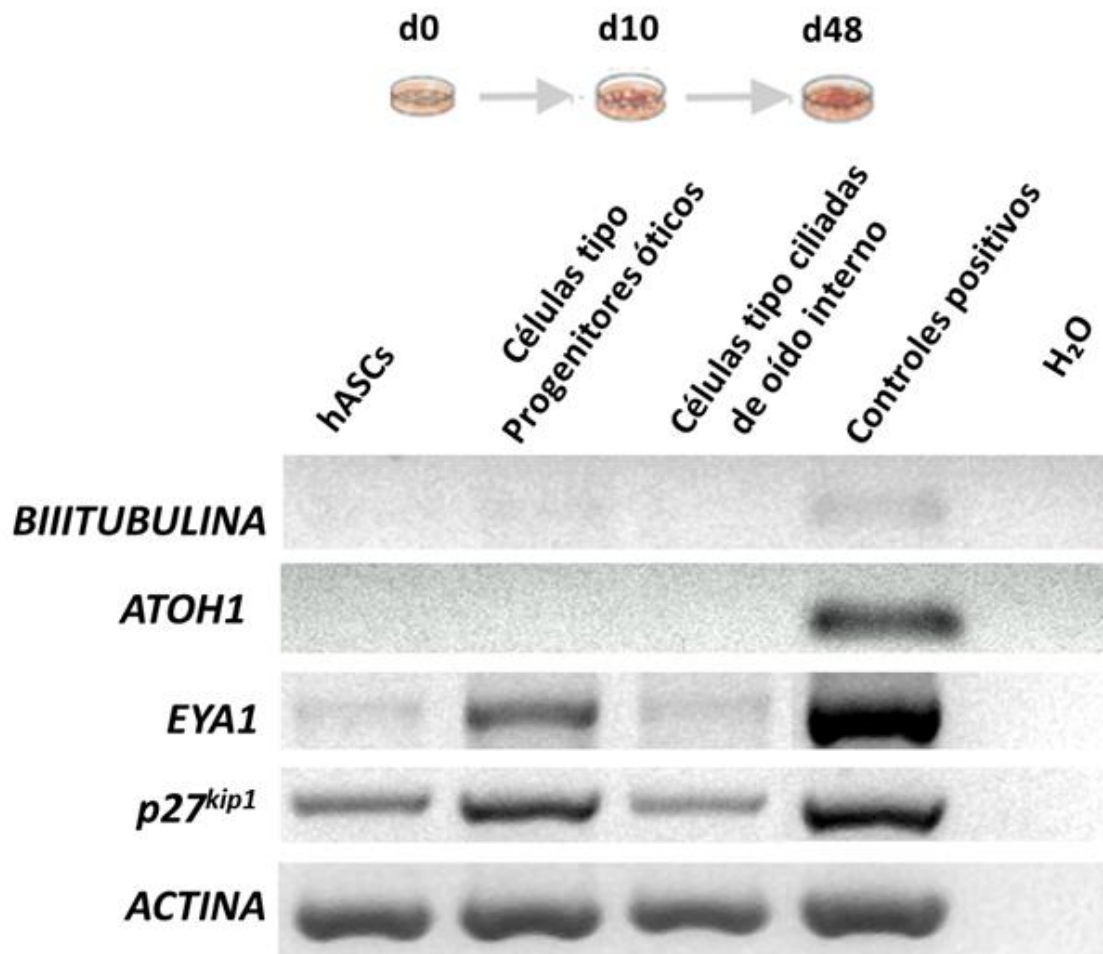


Figura 23: Expresión del ARNm de genes óticos y neurales en hASC y después de la diferenciación a células “tipo” progenitores óticos (10 días) y de la diferenciación a células “tipo” ciliadas (48 días). d: día.

Se estudió por inmunocitoquímica la presencia de los genes *PAX2*, *PAX8* y *BMP7*, como marcadores de células “tipo” progenitoras óticas, los genes *MYOVIa*, *POU4F3* y *ATOH1* como marcadores de células “tipo” ciliadas de oído interno y β III-tubulina como marcador neural al

finalizar ambas etapas del protocolo. Después de 10 días de diferenciación, se detectó la expresión de marcadores de células "tipo" progenitoras, presentes en la placoda ótica: *PAX2*, *PAX8* y *BMP7* (Tabla 4). Consistentemente con la presencia de progenitoras de células neurales y del oído interno, *POU4F3*, *MYOVIIa* (Tabla 4), *βIII-TUBULINA* ($28,8 \pm 0,37$ %) y *NESTINA* también fueron detectados. No se detectó la expresión de *ATOH1*. Las placas controles fueron negativas para la marcación de los anticuerpos mencionados a excepción de la *NESTINA* (Figura 24).

En el día 48, se observó un aumento en la expresión de los marcadores de células ciliadas del oído interno *MYOVIIa*, *POU4F3* y *ATOH1*, y una disminución de los marcadores de progenitoras óticas *PAX2* y *PAX8* (Tabla 4). Se observó también la ausencia del marcador neural *βIII-TUBULINA* y un menor número de células positivas para *NESTINA*. Las placas controles fueron negativas para la marcación de los anticuerpos mencionados (Figura 24).

Tabla 4: Marcadores de células "tipo" progenitoras óticas y células "tipo" ciliadas de oído interno en porcentajes, al día 0, día 10 y día 48 de tratamiento.

Anticuerpo	Día = 0	Día = 10	Día = 48
	hASCs %	Células tipo progenitoras óticas %	Células tipo ciliadas de oído interno %
PAX2	0	90,9 ± 0,16	46,2
PAX8	0	44,2 ± 0,03	15,9
MYOSIN VIIa	0	10,8 ± 0,05	33,2 ± 0,04
ATOH1	0	0	14,3
POU4F3	0	24,2 ± 0,05	33,9 ± 0,3

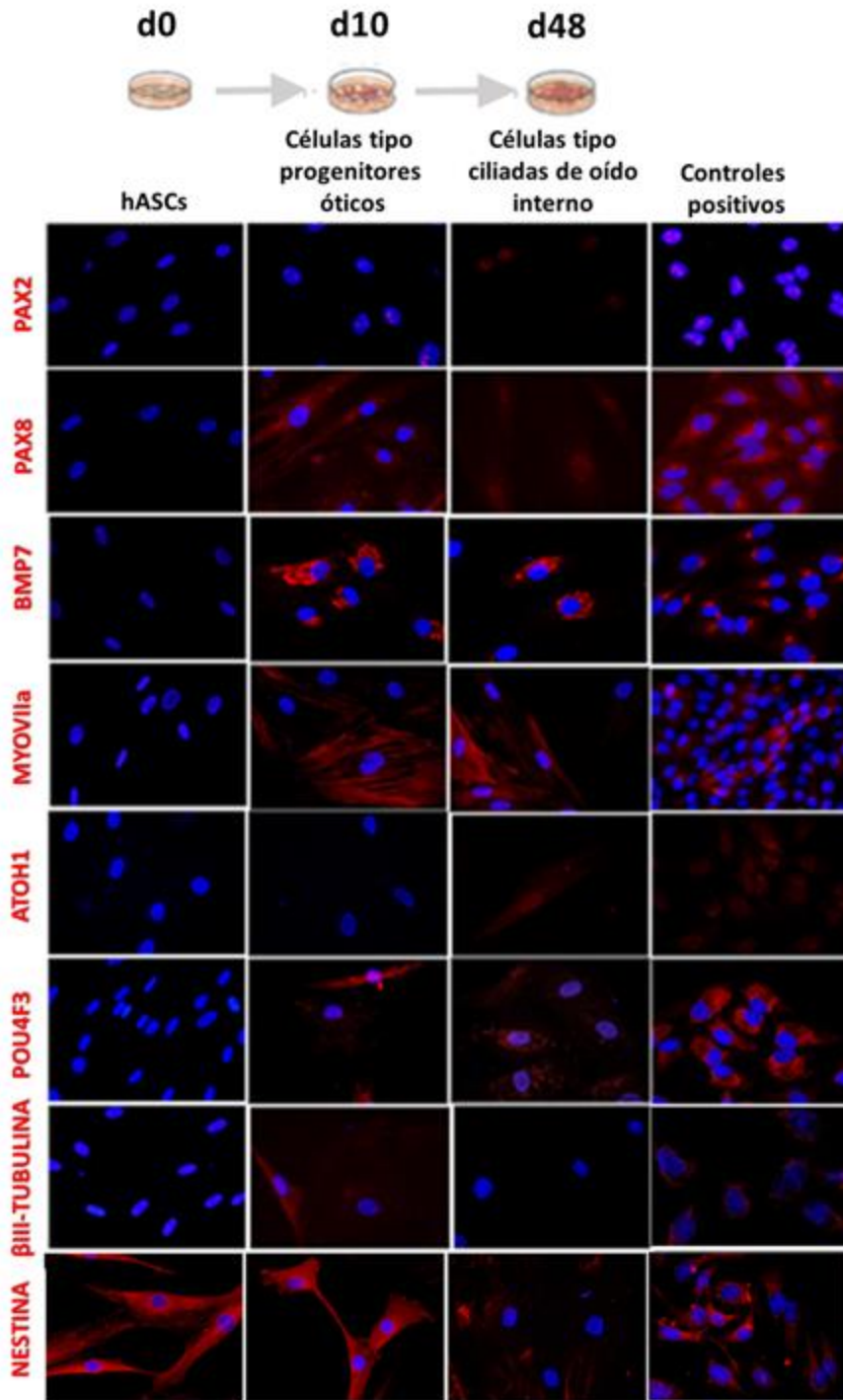


Figura 24: Fotografías microscópicas. Marcadores óticos y neurales en hASC (controles) y en las células "tipo" progenitoras óticas (10 días) Y en células "tipo" ciliadas de oído interno (38 días) a

48 días del comienzo de la inducción. d: día. En azul núcleos celulares teñidos con Hoechst. Magnificación original 40X.

8.4 Discusión

En este capítulo se utilizó un protocolo en dos pasos (115,125,130,135,136,138) para generar células “tipo” ciliadas de oído interno partiendo de células madre mesenquimales de tejido adiposo humanas. El primer paso consistió en la inducción de las hASC en células “tipo” progenitoras óticas, mientras que la diferenciación a células “tipo” ciliadas de oído interno se llevó a cabo en el segundo paso. Algunos autores usaron protocolos basados en la formación de cuerpos embrionarios para la obtención de progenitores óticos que expresaran *Pax2* y *Pax8* en ratones (125) y humanos (*PAX2* y *PAX8*) (127). Sin embargo, en nuestro trabajo utilizamos un método simplificado de cultivo en monocapa similar al descrito por Chen y col (6), pero sin el uso de laminina como sustrato ya que nuestros resultados fueron similares con y sin laminina (datos no mostrados).

Como parte del protocolo de diferenciación, las hASC se sembraron en un medio suplementado con IGF-1, FGF3 y FGF10. El IGF-1 es considerado un poderoso mitógeno para el oído interno, promoviendo la división de sus células (192,193). El IGF-1 pertenece a la familia de polipéptidos de insulina y desempeña un papel central en el desarrollo embrionario y la homeostasis del sistema nervioso adulto por mecanismos endocrinos, autocrinos y paracrinos (194,195). Es secretado por el otocisto de pollo y se expresa en el oído interno del ratón durante todo su desarrollo (196,197). Aburto y col sugirieron que el IGF-1 es un factor trófico clave durante la

fase progenitora neuronal ótica en el desarrollo temprano del oído interno (198) y que este orquesta la proliferación celular y la supervivencia en la vesícula ótica a través de diferentes vías de señalización, como ya ha sido descrito en otros contextos celulares (199,200). Asimismo, el IGF-1 promueve el destino del ectodermo anterior, de donde emerge el ectodermo pre-placoda, razón por la cual varios autores utilizan este factor en combinación con otros durante la inducción para la obtención de células progenitoras óticas (115,125,127,128,136).

La familia FGF está compuesta por una gran cantidad de ligandos y cuatro receptores implicados en la regulación de la diferenciación celular, la proliferación, el crecimiento, la motilidad y la supervivencia (201). La señalización de FGF juega un papel clave durante el desarrollo de vertebrados en el oído interno y participa en la inducción temprana del otocisto (202), en la especificación del pro-sensorio (203–205), y la neurogénesis ótica (206,207).

Se ha identificado al FGF como factor necesario y suficiente para la inducción *in vivo* de la placoda ótica, su inhibición bloquea la formación de la placoda ótica nativa (208,209) y su inhibición *in vitro* impide la expresión de *Pax2* en ratones (125,210). Los ligandos FGF3 y FGF10, fueron especialmente identificados en la cadena de señalización de la placoda ótica (26,211,212). Presumiblemente la exposición de las hASC expuestas a estos factores disparen su diferenciación hacia el linaje ótico.

En las células “tipo” progenitoras óticas, obtenidas luego de 10 días de inducción, se obtuvieron los siguientes marcadores: PAX2, PAX8, y BMP7 (ICQ), *EYA1* y *p27^{kip1}* (PCR). En coincidencia con la presencia de marcadores de células progenitoras óticas se detectaron POU4F3 y MYOVIa, marcadores de células “tipo” ciliadas. Otros autores, también utilizando el método de diferenciación por pasos han obtenido marcadores de células “tipo” progenitoras óticas y “tipo”

ciliadas entre los 8 y los 14 días de tratamiento (115,117,125). También, como en otros estudios, encontramos marcadores representativos de distintas etapas de la diferenciación del linaje neural (115,117,118). En este caso NESTINA, marcador de células progenitoras neurales y β III-TUBULINA marcador de células neurales. Duran Alonso y col. reportaron que una etapa progenitora neural intermedia es necesaria para obtener el linaje sensorial de oído interno partiendo de células madre mesenquimales (137).

Durante los siguientes 38 días, con el objetivo de obtener células “tipo” ciliadas del oído interno se utilizó el medio de cultivo base sin el agregado de otros factores. A lo largo del estudio descubrimos que al extender en días esta fase y con una reducción sucesiva del reemplazo del medio de cultivo (70% cada seis días) durante el período de diferenciación, resultó en una regulación positiva de los marcadores de células ciliadas. Otros autores han utilizado como medio de cultivo para la obtención de células “tipo” ciliadas de oído interno, el sobrenadante de cultivos cocleares (138) o de células auditivas fetales (117,137) o han co-cultivado las células con células estromales específicas (115,136).

Al finalizar el segundo paso del protocolo de diferenciación, y en concordancia con lo esperado, observamos que la expresión de los marcadores de células “tipo” progenitoras PAX2, PAX8, EYA1 y $p27^{kip1}$ disminuyeron, sin observarse expresión de marcadores neurales. Además, también observamos un aumento en el porcentaje de células que expresaron marcadores de células “tipo” ciliadas MYOVIa, POU4F3 y ATOH1, demostrando que las hASC fueron capaces de atravesar los estadios intermedios y lograr un fenotipo de célula “tipo” ciliada. Otros protocolos también han logrado obtener estos marcadores entre los días 15 y 72 de tratamiento (117,125,127,130,131,133–138). Cabe aclarar que la expresión de ATOH1 que se observó en las

células “tipo” ciliadas corresponde a la expresión proteica, mientras que en esas células no hubo correlación con la transcripción del ARNm de este gen. Se han reportado evidencias que sugieren mecanismos de regulación postranscripcional de ATOH1 durante el desarrollo del oído interno y en otros tejidos (213–215). Galvez y col (214) sugirieron que la expresión de ATOH1 en progenitores neurosensoriales del desarrollo neural estaría regulada por un mecanismo de aceleración de la degradación del ARNm. De esta manera, nuestros resultados podrían deberse a mecanismos similares, en los que el ARNm de ATOH1 pudiera ser rápidamente degradado, mientras que la vida media de la proteína sea mayor y por ende podamos detectarla con mayor facilidad.

La expresión de una combinación de marcadores tempranos e intermedios (PAX2, BMP7, *EYA1*, *p27^{kip1}*, ATOH1 y POU4F3), seguida por la expresión de marcadores de células ciliadas como MYOVI, acompañada por la expresión de ATOH1 y de POU4F3 son totalmente consistentes con una diferenciación progresiva de células madre a células “tipo” ciliadas, a través de progenitores (115). Al realizar el análisis de las células “tipo” progenitoras óticas (primer paso del protocolo) y de las células “tipo” ciliadas de oído interno (segundo paso del protocolo), se observa que el porcentaje de células positivas para marcadores de placoda (etapa temprana del desarrollo del oído interno) va disminuyendo a medida que se positivizan los marcadores de células maduras. Esto es coincidente con los resultados obtenidos por otros autores (117,118,125,127,133), donde obtuvieron células que respondieron a los diferentes factores a los que fueron expuestas pasando por los diferentes estadios de diferenciación.

8.5 Conclusión

Los resultados de este capítulo demuestran la capacidad de las hASC para diferenciarse en linaje ótico, al ser reprogramadas por métodos químicos, abriendo una puerta a una futura opción terapéutica para la pérdida auditiva neurosensorial. Según nuestro conocimiento, este es el primer reporte que muestra que se pueden obtener células “tipo” ciliadas de oído interno a partir de hASC *in vitro*, con un protocolo simplificado, bajo condiciones definidas de cultivo.

Los métodos de reprogramación actuales logran fenotipos con la mayoría de las características de las células fisiológicas. Sin embargo, aún no se ha logrado un método de reprogramación que logre células *bona-fide* (*maduras*).

La activación de genes endógenos claves de manera puntual podría complementar las actuales estrategias de reprogramación y lograr la obtención de fenotipos maduros. En el siguiente capítulo proponemos una solución para este problema utilizando la novedosa tecnología CRISPR-Cas.

Activación de genes específicos mediante CRISPR-on**9.1 Introducción**

El sistema CRISPR-on es una novedosa y poderosa herramienta para la activación de genes en forma puntual. Las posibilidades de que una herramienta simple tenga la capacidad de modular el estado transcripcional de un gen con alta especificidad han suscitado enormes expectativas en las estrategias de reprogramación y la medicina (106).

Este capítulo tiene como objetivo activar genes específicos de células ciliadas de oído interno, utilizando el sistema CRISPR-on. La activación de genes en forma específica puede suplementar la reprogramación química para lograr fenotipos maduros, que al día de hoy no se han conseguido con las actuales estrategias de reprogramación celular.

9.2 Materiales y Métodos**Diseño de sondas**

Se seleccionaron los genes *SOX2*, *ATOH1*, *POU4F3* y *GFI1* para realizar la activación por CRISPR-on. Para ello se diseñaron cuatro sgARN (Tabla 5) que reconocieran al promotor proximal de cada gen blanco, usando la herramienta de diseño CRISPR (Feng Zhang Lab, MIT). El algoritmo utilizado por este programa está basado en un análisis de especificidad, descrito previamente (216). Brevemente, se selecciona la región promotora del gen de interés (aproximadamente 300-500

pares de bases aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción). Las secuencias de los promotores génicos con la ubicación de las sondas se encuentran en material suplementario (Figura S1). Luego mediante un programa se diseñan las sondas, entre las cuales es importante escoger aquellas que no se solapen entre sí, las que tengan el mejor indicador de calidad, y un mínimo resultado fuera de rango (Figura 25). Las sondas elegidas (Tabla 5) fueron sintetizadas por GBT Oligos, y la posición correspondiente en el promotor proximal de cada gen blanco se muestran a continuación:

Tabla 5: Secuencia de sondas para CRISPR

ATOH1	Sonda 1: TTGCAGAAGAGACCCGGAA Sonda 2: TGTGTGATCTCCGAGTGGG Sonda 3: GCGCAGCGCCTTCAGCAAC Sonda 4: TGTCTTCTCAGCCAATGGA
SOX2	Sonda 1: CAAAACCCGGCAGCGAGGC Sonda 2: CCGGCCGCGCGGGGGAGGC Sonda 3: TATCCCCTCTCGCAGCAAC Sonda 4: CGGGAAGCAGCTAAGGTGC
POU4F3	Sonda 1: TACAAGCAGCCTGCCAGGAA Sonda 2: TGCTGTCTCTCCTCACCTCC Sonda 3: CTTTATACCCGGGCCTGGCC Sonda 4: TCTGGCGGGTTGGAGCCAG
GFI1:	Sonda 1: ACCACCGGAAATTAGTCGA Sonda 2: CAAAATTAAAGCCGCGCG Sonda 3: AGAGCGGGACCTCGCACGC Sonda 4: GCATACAGTCTAGCGTTGG

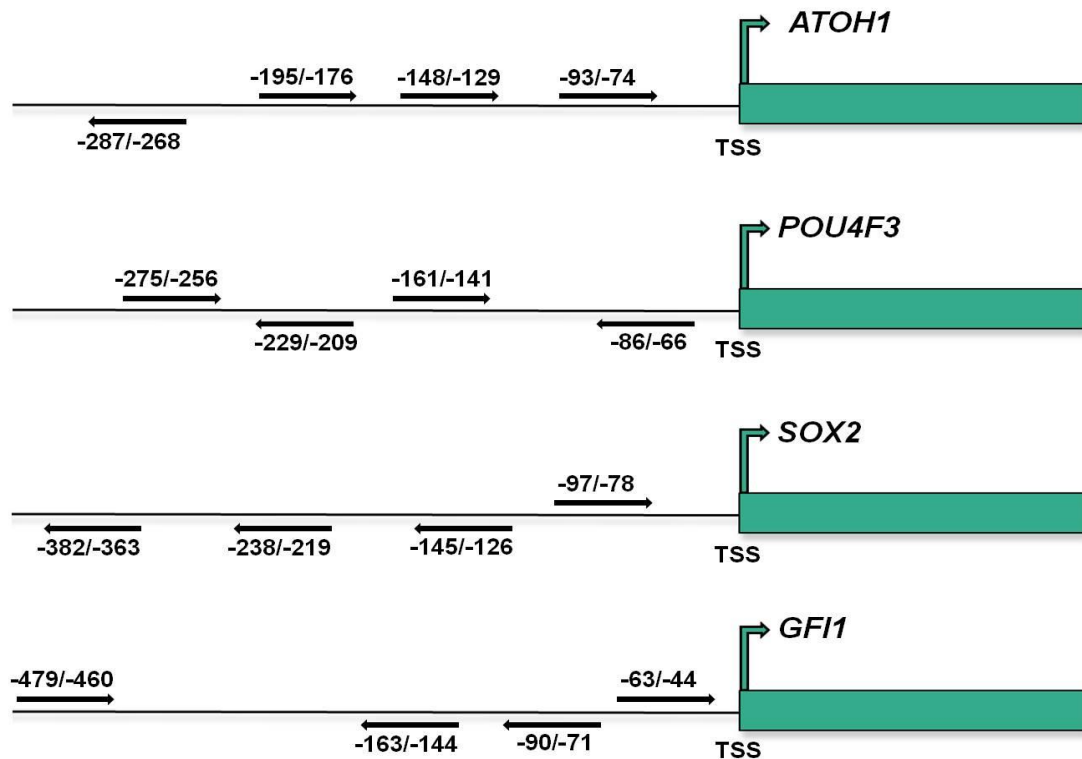


Figura 25: Representación esquemática de la región promotora proximal de ATOH1, POU4F3, SOX1 y GFI1. La ubicación y la orientación de los sgRNA se muestran mediante flechas. Los números indican la posición relativa al sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés).

Clonado de sondas en plásmidos

Los plásmidos de expresión de sgARN (pSPgARN) y el plásmido que codifica dCas9-VP160 (pAC94-pmax-dCas9-VP160-2A-puro) fueron solicitados a Addgene (plásmidos #47108 y #48226 respectivamente). Los oligonucleótidos conteniendo las secuencias objetivo fueron sintetizados, hibridados, fosforilados y clonados en el plásmido pSPgARN utilizando los sitios de clonado de la enzima de restricción *BbsI*, como describió Ran y col. 2013 (217).

Reconstitución y amplificación de los plásmidos por transformación química en bacterias competentes.

Los diferentes plásmidos se inocularon a razón de 1-10 µg en 50 µl de una suspensión de bacterias competentes. Se utilizaron bacterias TOP10. Se transformaron siguiendo el protocolo de método químico de transformación de bacterias. Brevemente, se incubaron las bacterias y los plásmidos en hielo 30 minutos, seguidos por una incubación a 37°C por 45 minutos y una recuperación en medio enriquecido. Posteriormente se inocularon 80-100 µl de suspensión en placas de cultivo con agar conteniendo el antibiótico de selección (en nuestro caso ampicilina). Luego de 48 hs de incubación a 37°C en estufa de cultivo bacteriano se picaron alrededor de 6 colonias por construcción.

Maxiprep

Se prepararon 3 mL de medio LB (Sigma) más ampicilina 50 µg/mL con bacterias y se dejó en agitación en estufa a 37°C durante toda la noche, este proceso recibe el nombre de minicultivo. Al día siguiente en 200 mL de medio LB se agregó el minicultivo de bacterias obtenido el día anterior (Figura 26). Se dejó durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se realizó la maxiprep utilizando el kit PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit siguiendo las instrucciones del fabricante.



Figura 26: Cultivo. Mecanismo de agitación a 37°

Transfección en células HEK293

Se cultivaron placas con células HEK293 hasta alcanzar una confluencia del 70-80%, momento en el cual se lipofectaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). En un primer experimento, analizamos la eficiencia de transfección de estas células, utilizando un plásmido de expresión de GFP (pCX-EGFP) (Figura 27). Una vez comprobada la eficiencia mediante microscopía de fluorescencia, procedimos a co-lipofectar con todos plásmidos guía (sgARN) y 1 μ g del plásmido dCas9-VP160 (Addgene # 48226), en una relación m \acute{a} sica de 1(dCas9-VP160):1(suma de todas las guías). Las células del grupo control fueron co-lipofectadas con el plásmido dCas9-VP160 y el plásmido guía vacío. Además, las células también fueron transfectadas con 0,2 μ g del plásmido de expresión pCX-EGFP como control de transfección. Los

resultados fueron analizados por RT-PCR en tiempo real (qPCR) al día 4 post-lipofección (Figura 27).

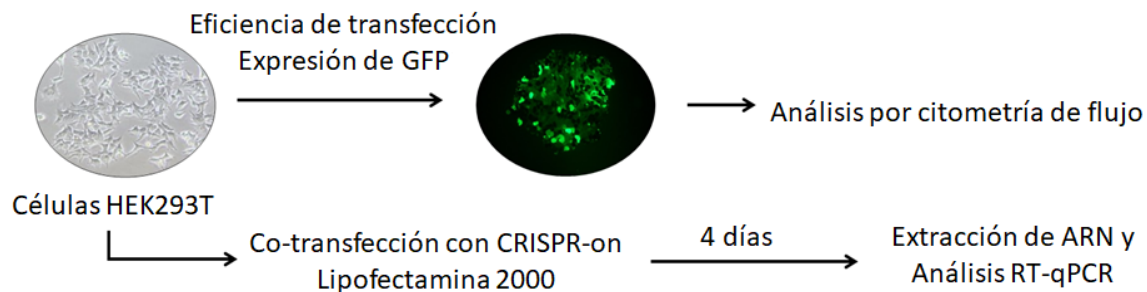


Figura 27: Esquema del ensayo CRISPR-on en células HEK293.

Prueba de eficiencia de transfección en células hASC

Se probó la eficiencia de transfección con el plásmido pCX-EGFP en hASC. Se transfectaron 3 muestras de hASC en pasaje V por duplicado. En cada placa de 30 mm se sembraron 100.000 células para lograr una confluencia del 70%. Se evaluó la eficiencia de transfección empleando 3 diferentes lipofectaminas: Lipo 2000 (Invitrogen), Escort Transfection Reagent (Sigma) y LTX (Invitrogen). A las 48 horas se observó fluorescencia bajo luz azul. Asimismo, se probó un reactivo alternativo, Polyethylenimine (PEI) 25kD (Polysciences). PEI es un polímero catiónico estable que condensa el ADN en partículas cargadas positivamente que se unen a las superficies celulares aniónicas (218). En los ensayos se utilizó una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de PEI para transfectar las células. Se ensayaron 3 condiciones: 3 μg de ADN (pCX-EGFP) y 9 μg de PEI, 3 μg de ADN y 15 μg de PEI y 5 μg de ADN y 9 μg de PEI. Los análisis se realizaron por citometría de flujo.

Experimento CRISPR-on en hASC con citometría de flujo acoplada a un separador de células.

Se realizó la lipofección en hASC en el pasaje VI con una confluencia del 80% con Lipofectamina Escort III. Se sembraron 12 placas p100 con 500.000 células cada una. En 9 placas se realizó la lipofección con todos los plásmidos guía (sgARN) conteniendo las secuencias de los genes a activar, 2µg del plásmido dCas9-VP160, en una relación molar de 1(dCas9-VP160):1(suma de todos los pGuía) y 0,4µg del plásmido de expresión pCX-EGFP. Se lipofectaron 3 placas con el plásmido guía vacío como control negativo de expresión. Una placa se dejó sin transfectar, como control para la citometría. Una vez transcurrido 4 días post-transfección, las células fueron tripsinizadas y llevadas al citómetro - separador celular de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Una vez obtenida la población enriquecida (GFP+), se realizó la extracción de ARN, RT y qPCR para *SOX2*, *ATOH1*, *POU4F3* y *GFI1* como se verá detallado más adelante en esta misma sección de materiales y métodos.

Evaluación de la eficiencia de transfección en células hASC diferenciadas a progenitores óticos

Debido a la dificultad que se experimentó para lipofectar las hASC, se planteó como alternativa probar en un estadio más diferenciado de las células, para ver si el cambio en morfología y tamaño podría tener un efecto positivo en la lipofección. Para ello llevamos a cabo el primer paso de diferenciación por métodos químicos descrita en el capítulo II y al finalizar la misma se transfectaron las células utilizando Escort III, LTX y Lipo 2000 como se describió más arriba. Se evaluó la eficiencia por citometría de flujo.

Extracción de ARN total y tratamiento con DNasa

Para extraer ARN a partir de las células HEK293 se empleó el kit de extracción RNeasy mini kit (Quiagen) y se procedió como lo indica el fabricante del kit. El ARN obtenido fue cuantificado y posteriormente tratado con DNasa, tal como se explicó en materiales y métodos del Capítulo II.

Retrotranscripción

A partir de cada ARN obtenido se realizó una RT para obtener el correspondiente ADN copia (ADNc) cómo se explicó en materiales y métodos del Capítulo II.

PCR punto final y PCR en tiempo real

Luego de realizada la extracción de ARN y posterior RT, se determinó la expresión del ARNm de los genes *ATOH1*, *POU4F3*, *SOX2* y *GFI1*. Para amplificar estos genes se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 6) utilizando el software Vector NTI Suite versión 6.0 (Infomax Inc.) y la herramienta online disponible de diseño de primers Primer-BLAST (NCBI). Los oligonucleótidos fueron probados y puestos a punto mediante reacciones de PCR punto final, confirmando la presencia de los productos por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 - 2%.

Una vez confirmada la especificidad de los productos, se cuantificó la expresión del ARNm mediante qPCR. Esta metodología se basa en la detección y cuantificación paso a paso de una molécula fluorescente (en este caso se empleó un kit que posee *Sybr green*) que se intercala en las hebras doble cadena de ADN. La fluorescencia es detectada y leída por un fluorómetro acoplado al termociclador a medida que transcurre la reacción de PCR.

Como gen de referencia se usó la determinación del ARNm del gen de Beta-actina (Tabla 6). La temperatura de hibridación para cada amplicón se determinó mediante análisis *in silico* utilizando el software Vector NTI y Primer-Blast.

Tabla 6: Secuencia y condiciones de los oligonucleótidos empleados

Primers	Secuencia 5' a 3'	Tamaño (pb)	T° hibridación
ATOH1	F: GTGAATGGGGTACAGAAGCA R: GGGTCTCATATTTGGACAGC	157	57°C
SOX2	F: CACAACCTCGGAGATCAGCAA R: TATAATCCGGGTGCTCCTTC	127	58°C
GFI1	F: TCATCCACACTGTCCACACA R: TCTGACTTCTGGTGG AACCT	92	54°C
POU4F3	F: TGGAAGCTTTGATGAGAGCC R: GGCTTGAACGGATGGTTCTT	90	56°C
B-ACTINA	F: CCCTTGCCATCCTAAAAGCC R: TGCTATCACCTCCCCTGTGT	86	60°C

Los tubos de reacción para la qPCR se constituyeron con 5µl de ADNc que se combinaron con LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche), 5 ng/µl de cada oligonucleótido y 3 mM de MgCl₂ en un volumen final de 10 µl. El protocolo general de ciclado se muestra en la tabla 7. La pureza de los productos fue cotejada mediante curvas de disociación. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación.

Tabla 7: Protocolo de qPCR. Min: minutos S: segundos

Paso	Temperatura (°C)	tiempo	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	15 s	40
Hibridación	Específica de cada amplicón	15 s	
Extensión	72	15 s	
Lectura	81	15 s	
Incubación final	10	10 min	1

El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra se realizó utilizando el método del ciclo umbral (Ct). El valor de Ct para cada muestra se calculó utilizando el software Light Cycler 2.0 (Roche) con un umbral de ajuste de fluorescencia automática. La eficiencia (Ef) de la reacción de PCR para cada gen estudiado y para el gen de referencia (B-actina) fue calculada mediante curvas estándar. Estas curvas se construyen a partir de la amplificación de cada gen en diluciones seriadas de los ADNc. Luego, graficando el logaritmo de las diluciones de los ADNc vs. su correspondiente Ct, se obtiene la fórmula de la recta por regresión lineal a partir de la cual se calcula la Ef ($Ef = 10^{(-1/pendiente)-1}$). Dependiendo de las condiciones específicas de PCR, la Ef varió entre 85% y 110%. El posterior cálculo de los niveles de expresión relativa de cada gen en las muestras tratadas con respecto a los controles se realizó utilizando el método de la curva estándar relativa. Para todas las muestras experimentales, la cantidad relativa del gen de interés y del gen B-actina fue determinada a partir de la curva estándar previamente realizada para cada gen. La cantidad obtenida correspondiente al gen de interés luego fue normalizada con la cantidad relativa del gen B-actina en cada grupo experimental.

Análisis Estadístico

Los resultados de las qPCR se analizaron mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney considerando significativa una diferencia de $p < 0.05$ con respecto al control.

9.3 Resultados

Obtención de plásmidos conteniendo las sondas 1 a 4 de los genes *SOX2*, *ATOH1*, *POU4F3* y *GFI1*

Se llevaron a cabo 4 MaxiPreps para amplificar los plásmidos conteniendo las sondas 1 a 4 de los genes *SOX2*, *ATOH1*, *POU4F3* y *GFI1*. Se Cuantificaron los plásmidos de cada una de las sondas para cada gen (Tabla 8)

Tabla 8. Cuantificación de plásmidos. S: sonda

SOX2	ATOH1	POU4F3	GFI1
S1: 0.02 µg/µL	S1: 0.05 µg/µL	S1: 0.1 µg/µL	S1: 0.2 µg/µL
S2: 0.09 µg/µL	S2: 0.1 µg/µL	S2: 0.2 µg/µL	S2: 0.08 µg/µL
S3: 0.1 µg/µL	S3: 0.07 µg/µL	S3: 0.2 µg/µL	S3: 0.05 µg/µL
S4: 0.07 µg/µL	S4: 0.05 µg/µL	S4: 0.2 µg/µL	S4: 0.08 µg/µL

Experimento CRISPR-HEK293

Ensayo de Transfección en células HEK293

Para poner a punto el sistema CRISPR-on decidimos realizar un primer ensayo con células HEK293, ya que existe mucha evidencia sobre la alta eficiencia de transfección que poseen, y se han utilizado en muchos experimentos con CRISPR-on (110,217,219). Para esta etapa co-transfectamos células HEK293 con un plásmido de expresión dCas9-VP160 y una mezcla de cantidades iguales de los diferentes plásmidos pSPgARNs. Además, se utilizó el plásmido de expresión pCX-EGFP como control de transfección. La eficiencia de transfección de las células HEK293 fue evaluada a través de la expresión de GFP mediante microscopía de fluorescencia, observándose una eficiencia mayor de 99% en todos los casos (Figura 28).

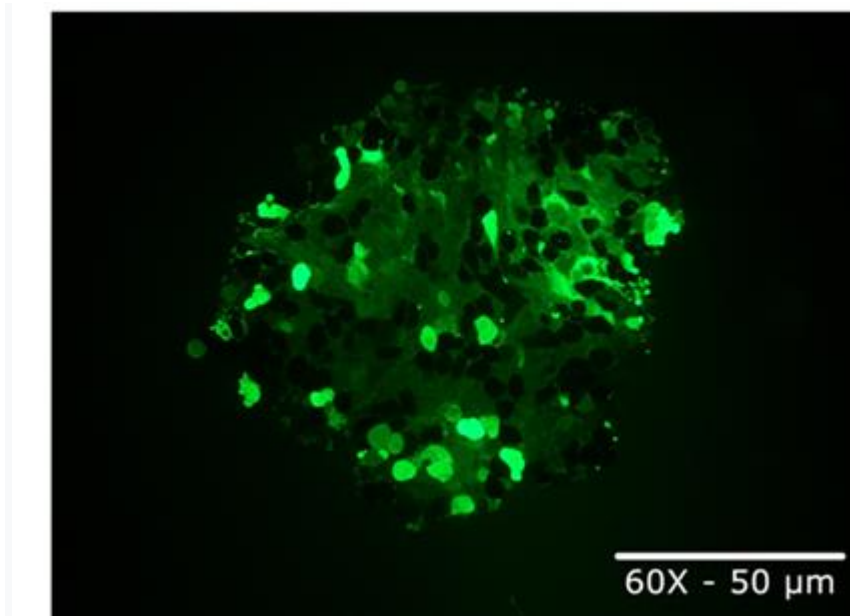


Figura 28: Eficiencia de transfección en células HEK293 transfectadas con el plásmido pCX-EGFP. Fotomicroscopía 60X. Barra 50 µm.

PCR en tiempo real en células HEK293

Para evaluar si el sistema CRISPR-on fue capaz de activar los genes *ATOH1*, *SOX2*, *POU4F3* y *GFI1* en las células HEK293 transfectadas, procedimos a estudiar la expresión del ARNm por qPCR. Los

resultados mostraron que efectivamente hubo un aumento significativo de la expresión de 3 de los 4 genes evaluados (Figura 29). Los genes *ATOH1*, *POU4F3* y *SOX2* mostraron un aumento significativo de su expresión en comparación con los controles. El gen *GFI1* no evidenció aumento de su expresión.

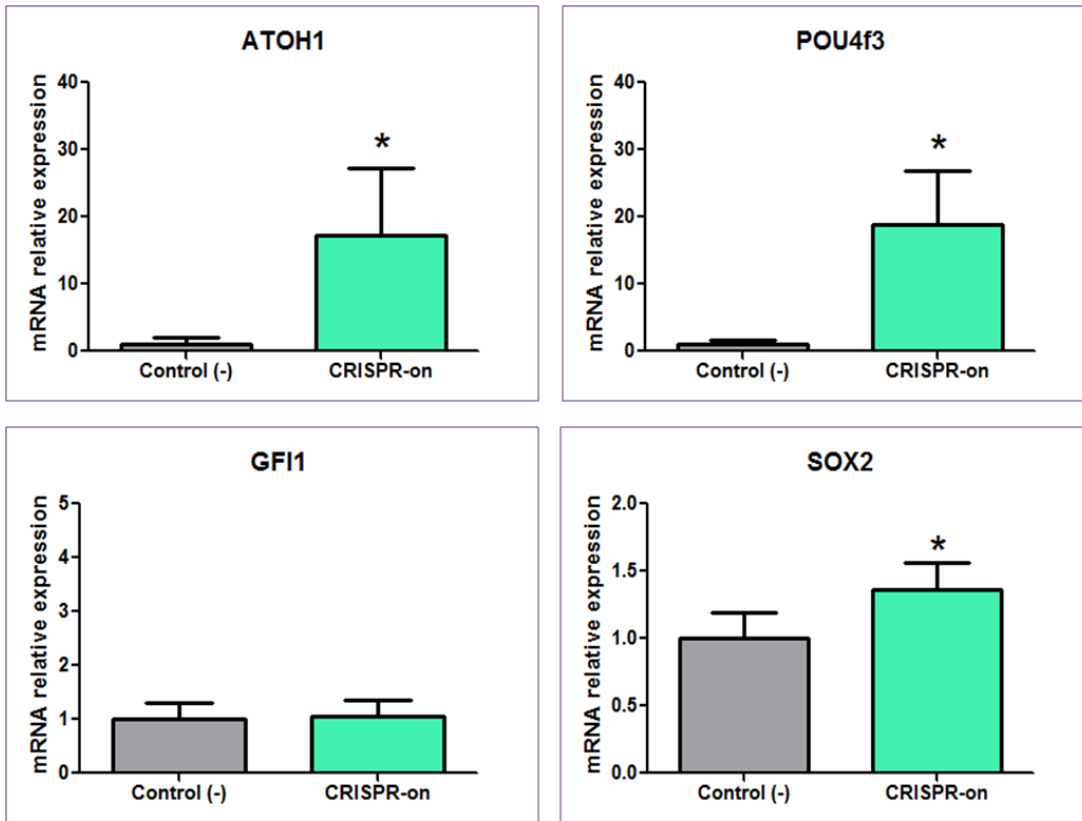


Figura 29: Expresión del ARNm por qPCR de *ATOH1*, *POU4F3*, *SOX2* y *GFI1* en células HEK293 transfectadas y controles. Los niveles de expresión se normalizaron a la expresión de ARNm de β -actina y se presentan como valores relativos frente a los del grupo de control. Las cantidades relativas de ARNm se calcularon utilizando el método de curva estándar. Cada columna representa la media \pm EE. *, $P < 0.05$ vs. el grupo de control (test U de Mann-Whitney).

Prueba de eficiencia de transfección en células hASC

Se probó la eficiencia de transfección con en las hASC con el plásmido pCX-EGFP. Se evaluó la eficiencia de transfección empleando 3 diferentes lipofectaminas (como se menciona en materiales y métodos). A las 48 horas se realizó una prueba de viabilidad, siendo para Lipo 2000: 80%, LTX: 98% y Escort III: 100%. Se evaluó la eficiencia de transfección por citometría de flujo, registrándose en todos los casos porcentajes menores al 1%, sin observar diferencias significativas entre las condiciones. Ante la baja tasa de transfección de las células hASC se probó transfectar con PEI (Polysciences). Los resultados fueron similares a los obtenidos anteriormente con las distintas lipofectaminas utilizadas, observándose un porcentaje menor al 1% de células transfectadas (Figura 30).

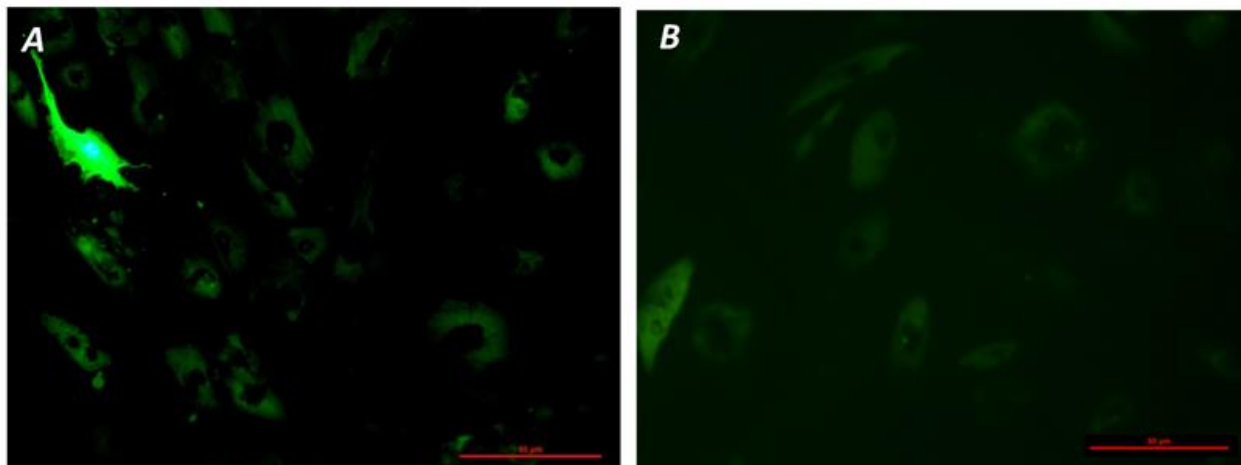


Figura 30: Imagen microscópica de las hASC transfectadas con el plásmido pCX-EGFP. (A) transfectadas con PEI y (B) sin transfectar. Magnificación original 40X. Barra 50 μm .

Evaluación de la eficiencia de transfección en hASC diferenciadas a progenitores óticos

Luego de realizar el primer paso de diferenciación descrito en el capítulo II (diferenciación a progenitores óticos) las células fueron transfectadas con las distintas lipofectaminas mencionadas en materiales y métodos. Se analizaron los resultados a las 48 horas post-transfección mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que empleando el reactivo de transfección Escort III se registraron 0,66% de 5000 eventos que detectó el citómetro, que se corresponde con el 4% de la población de ASCs (seleccionada manualmente); por su parte, el empleo de lipofectamina LTX mostró el 0,32% de 5000 eventos, que equivale al 2% de la población de ASCs; mientras que con Lipo 2000 se observó 0% de 5000 eventos analizados.

Experimento CRISPR-on en hASC con citometría de flujo acoplada a un separador de células.

Las hASC transfectadas fueron identificadas por la expresión de GFP y separadas en un citómetro acoplado a un separador celular. En la muestra transfectada con las sondas CRISPR se obtuvieron aproximadamente 300 células GFP+ (marcador de selección). De la muestra transfectada con el plásmido guía vacío, se obtuvieron aproximadamente 200 células GFP+ (marcador de selección).

Una vez obtenida la población enriquecida (GFP+), se realizó la extracción de ARN seguida por RT y qPCR. Al analizar la expresión de los genes candidatos, observamos un incremento significativo en la expresión de *ATOH1* (Figura 31), mientras que no encontramos modificaciones en la expresión de los demás genes. En las células controles GFP+, no se observó aumento de la expresión en ninguno de los 4 genes analizados.

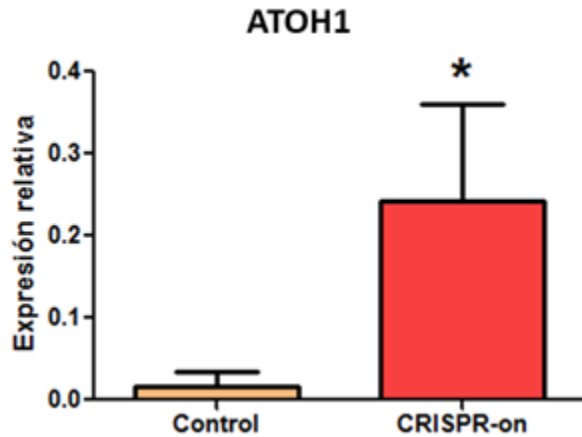


Figura 31: Expresión del ARNm por qPCR de *ATOH1*, en células hASC transfectadas y controles. Los niveles de expresión se normalizaron a la expresión de ARNm de β -actina y se presentan como valores relativos frente a los del grupo control. Las cantidades relativas de ARNm se calcularon utilizando el método de curva estándar. Cada columna representa la media \pm EE. *, $P < 0.05$ vs. el grupo de control (test U de Mann-Whitney)

9.4 Discusión

En este trabajo utilizando CRISPR-dCas9-VP160 logramos en forma inédita la expresión endógena de *SOX2*, *POU4F3* Y *ATOH1* en células HEK293 y *ATOH1* en células hASC.

En la utilización de esta tecnología, la selección de un diseño apropiado de las sgARN es el primer paso para evitar los efectos fuera del objetivo planteado. Muchas de las herramientas de diseño de sgARN están disponibles en línea. Estas proporcionan predicciones basados en algoritmos. Factores como la ubicación del sitio de corte dentro del gen, el contenido de guanina, la no concordancia entre la sgARN y la posición del protoespaciador y las secuencias del motivo adyacente de protoespaciador (del inglés *Protospacer adjacent motif*) (PAM) no canónicas son

tenidas en cuenta en los algoritmos de estos modelos (220). En este trabajo se utilizó la herramienta de diseño CRISPR (Feng Zhang Lab, MIT). Se diseñaron sgARN complementarios con el gen blanco, de una longitud de 20 nucleótidos basandonos en reportes de otros autores que han observado que sondas de mayor longitud suelen ser menos efectivas (221,222).

En esta parte del trabajo pudimos inducir la expresión del gen *SOX2* característico de progenitores óticos, y los genes *ATOH1* y *POU4F3* ambos marcadores de células ciliadas de oído interno, utilizando CRISPR-on. Como ya fue reportado anteriormente para otros genes, este complejo de puede activar eficientemente genes humanos involucrados en la pluripotencialidad y la diferenciación en varios tipos de células (110,158,161,223–225). Basándonos en la bibliografía, elegimos el diseño de cuatro sgARNs para dirigir la activación de cada gen, ya que las evidencias sugieren que, aumentando el número de sondas, se logra un efecto sinérgico, potenciando la activación génica (110,158,161,223–225).

Otro punto clave a la hora de diseñar el experimento fue la sincronización para la activación de cada gen. Hay evidencias que sugieren que la mejor estrategia es una activación de los genes en forma secuencial recapitulando la ontogenia durante el desarrollo (226). Sin embargo, existen también numerosas evidencias que muestran resultados positivos y potenciados empleando una activación en “multiplex” (224,227). En este trabajo, considerando que i) los experimentos no plantean una sincronización idéntica a la fisiológica, y ii) la exposición sucesiva de los cultivos a los procesos de transfección genera estrés para las células, decidimos optar por un diseño del tipo multiplex transfectando las sondas de los cuatro genes en simultáneo. Nuestros resultados mostraron que tres de los cuatro genes blanco (*ATOH1*, *SOX2* y *POU4F3*) fueron activados

significativamente en las células HEK293. Con respecto al gen *GFI1* no observamos diferencia significativa respecto al control. Una posible justificación a este resultado radica en que las células HEK293, en nuestras condiciones de cultivo, presentan expresión basal de *GFI1* (datos no mostrados). En trabajos de nuestro grupo se ha demostrado que cuando un gen se expresa de en las células blanco, la activación por CRISPR resulta más difícil de lograr, debido a regulaciones de la expresión endógena del gen (226).

Los métodos de transfección basados en químicos son económicos y alcanzan generalmente una alta eficiencia de transfección, sobre todo en líneas celulares como HEK293 o COS. Utilizando este método otros autores han logrado la activación endógena de diversos genes (110). Sin embargo, es sabido que los métodos de transfección tienen baja eficiencia en muchos tipos celulares, especialmente en cultivos primarios (228). En el caso de las células madre de varios orígenes, la transfección se vuelve más compleja, ya que éstas son menos sensibles a la transfección por estos métodos que las líneas celulares (229,230). En este trabajo probamos distintas estrategias de transfección en hASC, empleando distintas condiciones, distintos estadios celulares, así como también alternativas en lo que respecta a los reactivos (lipofección y PEI), pero al igual que lo reportado por otros autores, la tasa de transfección a través de liposomas en este tipo celular fue muy baja (228,231). Esto influye negativamente en las posibilidades de emplear esta técnica de transfección en las células hASC, siendo un gran obstáculo que dificulta su aplicación en la clínica. Como vemos, la eficiencia de la transfección es un aspecto limitante (230).

Por otro lado, la bibliografía reporta otros métodos de transfección más eficientes. Los lentivirus por ejemplo, son un vehículo de uso común para introducir sistemas de edición CRISPR-Cas9, son estables, eficientes y en teoría pueden infectar casi todos los tipos celulares tanto *in vitro* como *in vivo* con baja toxicidad celular (153,232,233). Sin embargo, y a pesar de sus múltiples ventajas, el hecho de emplear virus o derivados de virus, sumado a las probabilidades de integración al azar en el genoma huésped, continúan siendo importantes barreras que limitan la aceptación de los lentivirus para utilización clínica (234,235).

La electroporación ha sido reconocida como una herramienta poderosa para lograr el ingreso de plásmidos en las células difíciles de transfectar. La utilización de impulsos eléctricos sobre las células logrando poros de ingreso data de los años ochenta (236,237). Utilizando la electroporación, Gao y col fueron los primeros en demostrar el potencial de CRISPR-Cas9 mediante edición génica para el tratamiento de la pérdida auditiva autosómica dominante relacionada con la disfunción de las células ciliadas. Estos autores utilizaron sgARN dirigidas al alelo TMC1 mutante en ratones Beethoven P1 (modelo de hipoacusia neurosensorial progresiva de causa genética) (238). Asimismo, se ha observado que la mayoría de los tipos celulares, incluidas las células primarias, se pueden transfectar mediante electroporación. Sin embargo, en ensayos realizados por nuestro grupo, los resultados de transfección en células mesenquimales provenientes de ratas nunca superaron el 1% de eficiencia (datos no mostrados).

Dada la gran relevancia fisiológica de estos modelos, aplicables a la tecnología emergente CRISPR, se puede esperar que las mejoras y la implementación de la electroporación a gran escala aumente en los próximos años. Una de las áreas interesantes para observar será el desarrollo de dispositivos de electroporación de alto rendimiento y mayor eficiencia (239).

Durante el desarrollo de esta Tesis realizamos averiguaciones en otras instituciones que disponen de equipos de electroporación aptos para utilizar en cultivos primarios de tipo Nucleofector. Sin embargo, no logramos concretar un experimento. Esto fue debido principalmente a los altos costos y difícil disponibilidad de los reactivos y kits que emplea el equipo. Posteriormente la aparición de la pandemia producida por el virus SARS-CoV-2 (COVID-19) imposibilitó realizar nuevos ensayos hasta el día de de la fecha.

9.5 Conclusión

Los resultados de este capítulo demuestran que CRISPR-dCas9-VP160 puede activar los genes de desarrollo óptico *SOX2*, *ATOH1* y *POU4F3* en las células HEK293. No se detectó una activación significativa del gen *GFI1*. Asimismo, el sistema CRISPR-dCas9-VP160 pudo activar significativamente el gen *ATOH1* en hASC.

Nuestros resultados preliminares indican que el sistema CRISPR-dCas9-VP160 podría aplicarse para complementar la reprogramación química reforzando la activación de genes específicos. Sin embargo, como hemos mencionado a lo largo de este capítulo, serán necesarias mejoras y optimizaciones en las metodologías de transfección para lograr mejores resultados.

10.

Conclusiones Generales

- El protocolo utilizado en esta tesis permitió aislar y cultivar células madre mesenquimales extraídas de tejido adiposo humano.
- Las células madre mesenquimales de tejido adiposo humano obtenidas presentaron un inmunofenotipo característico y demostraron multipotencialidad al diferenciarse a los tres linajes.
- Las células madre mesenquimales de tejido adiposo humano son capaces de diferenciarse *in vitro* y exhibieron inmunofenotipos de células del "tipo" progenitoras y de células "tipo" ciliadas de oído interno utilizando métodos químicos.
- El sistema CRISPR-on puede activar los genes *SOX2*, *ATOH1* y *POU4F3* en células HEK293 y al gen *ATOH1* en células madre mesenquimales de tejido adiposo humano.
- Para activar genes específicos utilizando CRISPR-on en células madre mesenquimales de tejido adiposo humano debe mejorarse los sistemas de transfección.

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten concluir que es posible obtener *in vitro* células "tipo" ciliadas de oído interno a partir de la diferenciación de células madre mesenquimales humanas provenientes de tejido adiposo, aportando información de referencia para el desarrollo de nuevas terapias de reemplazo celular en hipoacúsicos.

11.

Perspectivas

En los últimos años, se han desarrollado varias técnicas para la reprogramación celular y se han generado varios fenotipos celulares específicos, con resultados alentadores. Asimismo, hay investigaciones en curso que apuntan a mejorar la eficiencia de reprogramación haciendo foco en varias de las limitaciones detectadas en esta tesis, como por ejemplo mejorar la eficiencia de transfección, mejorar la tasa de obtención de fenotipos maduros etc. La aparición de la herramienta biotecnológica CRISPR ha permitido realizar y proponer nuevas estrategias de reprogramación que han logrado mejoras sustanciales pero muchas veces no pueden superar las limitaciones técnicas actuales. Los siguientes pasos en nuestra línea de investigación estarán orientados a utilizar y/o desarrollar nuevos métodos de transfección para mejorar la activación de genes endógenos específicos mediante CRISPR-on para lograr una mejora en la reprogramación de las hASC hasta células “tipo” ciliadas de oído interno.

De a poco se va observando la transición de las hASC desde el laboratorio a la aplicación a través de los ensayos clínicos. Cuando estos ensayos demuestren seguridad y eficacia, se producirá naturalmente la aparición de una industria basada en hASC. Los inicios de dicha industria ya pueden identificarse en los 216 ensayos clínicos registrados en el clinicaltrials.gov como posibles terapias en diversas patologías (término de búsqueda "células madre adiposas") (240). Sin embargo, en el área de la hipoacusia y realizando la misma búsqueda, pero utilizando las palabras “células madre hipoacusia neurosensorial” dieron por resultado solo 4 ensayos clínicos (241). El camino será largo, pero no será sorprendente que estas células tengan un lugar en la medicina regenerativa personalizada y la ingeniería de tejidos en el futuro cercano.

Referencias

1. Deafness and hearing loss [Internet]. [citado 12 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>
2. Fligor BJ, Cox LC. Output levels of commercially available portable compact disc players and the potential risk to hearing. *Ear Hear.* diciembre de 2004;25(6):513-27.
3. Meddis R, Lopez-Poveda EA. Auditory Periphery: From Pinna to Auditory Nerve. En: Meddis R, Lopez-Poveda EA, Fay RR, Popper AN, editores. *Computational Models of the Auditory System.* Boston, MA: Springer US; 2010. p. 7-38. (Springer Handbook of Auditory Research; vol. 35).
4. Chen W, Johnson SL, Marcotti W, Andrews PW, Moore HD, Rivolta MN. Human Fetal Auditory Stem Cells Can Be Expanded In Vitro and Differentiate Into Functional Auditory Neurons and Hair Cell-Like Cells [Internet]. Vol. 27, *Stem Cells.* 2009. p. 1196-204. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.62>
5. Roehm PC, Hansen MR. Strategies to preserve or regenerate spiral ganglion neurons [Internet]. Vol. 13, *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery.* 2005. p. 294-300. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/01.moo.0000180919.68812.b9>
6. Chen W, Jongkamonwiwat N, Abbas L, Eshtan SJ, Johnson SL, Kuhn S, et al. Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors [Internet]. Vol. 490, *Nature.* 2012. p. 278-82. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11415>
7. Maxon AB, White KR, Vohr BR, Behrens TR. Using transient evoked otoacoustic emissions for neonatal hearing screening. *Br J Audiol.* abril de 1993;27(2):149-53.
8. Parving A. The need for universal neonatal hearing screening--some aspects of epidemiology and identification. *Acta Paediatr Suppl.* diciembre de 1999;88(432):69-72.
9. Forge A, Li L, Nevill G. Hair cell recovery in the vestibular sensory epithelia of mature guinea pigs. *J Comp Neurol.* 20 de julio de 1998;397(1):69-88.
10. Watters K, Corrales CE. Feasibility of treating hearing disorders with stem cells: update. *Ear Nose Throat J.* octubre de 2004;83(10):686, 688-9.
11. Lim HH, Lenarz T, Anderson DJ, Lenarz M. The auditory midbrain implant: effects of electrode location. *Hear Res.* agosto de 2008;242(1-2):74-85.
12. Lim HH, Lenarz T, Joseph G, Battmer R-D, Samii A, Samii M, et al. Electrical stimulation of the midbrain for hearing restoration: insight into the functional organization of the human central auditory system. *J Neurosci.* 5 de diciembre de 2007;27(49):13541-51.
13. Anatomía Sociedad Española de Otorrinolaringología [Internet]. [citado 12 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://seorl.net/PDF/Otologia/002%20-%20BASES%20ANAT%C3%93MICAS%20DEL%20O%C3%8DIDO%20Y%20EL%20HUESO%20TEMPORAL.pdf>

14. Moller AR. Hearing: Anatomy, Physiology, and Disorders of the Auditory System. Elsevier; 2006. 328 p.
15. Kelley MW. Hair cell development: commitment through differentiation. Brain Res. 26 de mayo de 2006;1091(1):172-85.
16. Roy S, Glueckert R, Johnston AH, Perrier T, Bitsche M, Newman TA, et al. Strategies for drug delivery to the human inner ear by multifunctional nanoparticles. Nanomedicine . enero de 2012;7(1):55-63.
17. Schimmang T, Maconochie M. Gene expression profiling of the inner ear. J Anat. febrero de 2016;228(2):255-69.
18. Fekete DM. Development of the Inner Ear. Springer Handbook of Auditory Research, Volume 26. Edited by Matthew W Kelley, Doris K Wu, Arthur N Popper, and , Richard R Fay. New York: Springer. \$129.00. xii 240 p 2 pl; ill.; index. ISBN: 0-387-25068-9. 2005 [Internet]. Vol. 81, The Quarterly Review of Biology. 2006. p. 400-400. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1086/511568>
19. Groves AK, LaBonne C. Setting appropriate boundaries: fate, patterning and competence at the neural plate border. Dev Biol. 1 de mayo de 2014;389(1):2-12.
20. Ohyama T, Groves AK, Martin K. The first steps towards hearing: mechanisms of otic placode induction. Int J Dev Biol. 2007;51(6-7):463-72.
21. Groves AK, Fekete DM. Shaping sound in space: the regulation of inner ear patterning. Development. enero de 2012;139(2):245-57.
22. Pfeffer PL, Gerster T, Lun K, Brand M, Busslinger M. Characterization of three novel members of the zebrafish Pax2/5/8 family: dependency of Pax5 and Pax8 expression on the Pax2.1 (noi) function. Development. agosto de 1998;125(16):3063-74.
23. Khatri SB, Edlund RK, Groves AK. Foxi3 is necessary for the induction of the chick otic placode in response to FGF signaling. Dev Biol. 15 de julio de 2014;391(2):158-69.
24. Haddon C, Lewis J. Early ear development in the embryo of the Zebrafish, Danio rerio [Internet]. Vol. 365, The Journal of Comparative Neurology. 1996. p. 113-28. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19960129\)365:1<113::aid-cne9>3.0.co;2-6](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19960129)365:1<113::aid-cne9>3.0.co;2-6)
25. Basch ML, Brown RM 2nd, Jen H-I, Groves AK. Where hearing starts: the development of the mammalian cochlea. J Anat. febrero de 2016;228(2):233-54.
26. Wright TJ, Mansour SL. Fgf3 and Fgf10 are required for mouse otic placode induction. Development. agosto de 2003;130(15):3379-90.
27. Wu DK, Kelley MW. Molecular mechanisms of inner ear development. Cold Spring Harb Perspect Biol. 1 de agosto de 2012;4(8):a008409.
28. Ohyama T, Basch ML, Mishina Y, Lyons KM, Segil N, Groves AK. BMP signaling is necessary for patterning the sensory and nonsensory regions of the developing mammalian cochlea. J Neurosci. 10 de noviembre de 2010;30(45):15044-51.

29. Ruben RJ. Development of the Inner Ear of the Mouse: A Radioautographic Study of Terminal Mitoses. 1967. 44 p.
30. Matei V, Pauley S, Kaing S, Rowitch D, Beisel KW, Morris K, et al. Smaller inner ear sensory epithelia in Neurog 1 null mice are related to earlier hair cell cycle exit. *Dev Dyn.* noviembre de 2005;234(3):633-50.
31. Doetzlhofer A, White P, Lee Y-S, Groves A, Segil N. Prospective identification and purification of hair cell and supporting cell progenitors from the embryonic cochlea. *Brain Res.* 26 de mayo de 2006;1091(1):282-8.
32. Lanford PJ, Lan Y, Jiang R, Lindsell C, Weinmaster G, Gridley T, et al. Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet.* marzo de 1999;21(3):289-92.
33. Morrison A, Hodgetts C, Gossler A, Hrabé de Angelis M, Lewis J. Expression of Delta1 and Serrate1 (Jagged1) in the mouse inner ear. *Mech Dev.* junio de 1999;84(1-2):169-72.
34. Eddison M, Le Roux I, Lewis J. Notch signaling in the development of the inner ear: lessons from *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24 de octubre de 2000;97(22):11692-9.
35. Daudet N, Lewis J. Two contrasting roles for Notch activity in chick inner ear development: specification of prosensory patches and lateral inhibition of hair-cell differentiation. *Development.* febrero de 2005;132(3):541-51.
36. Daudet N, Gibson R, Shang J, Bernard A, Lewis J, Stone J. Notch regulation of progenitor cell behavior in quiescent and regenerating auditory epithelium of mature birds. *Dev Biol.* 1 de febrero de 2009;326(1):86-100.
37. Wallis D, Hamblen M, Zhou Y, Venken KJT, Schumacher A, Grimes HL, et al. The zinc finger transcription factor *Gfi1*, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival. *Development.* enero de 2003;130(1):221-32.
38. Xiang M, Gao WQ, Hasson T, Shin JJ. Requirement for *Brn-3c* in maturation and survival, but not in fate determination of inner ear hair cells. *Development.* octubre de 1998;125(20):3935-46.
39. Costa A, Sanchez-Guardado L, Juniat S, Gale JE, Daudet N, Henrique D. Generation of sensory hair cells by genetic programming with a combination of transcription factors. *Development.* 1 de junio de 2015;142(11):1948-59.
40. Duran Alonso MB, Lopez Hernandez I, de la Fuente MA, Garcia-Sancho J, Giraldez F, Schimmang T. Transcription factor induced conversion of human fibroblasts towards the hair cell lineage. *PLoS One.* 6 de julio de 2018;13(7):e0200210.
41. Li S, Price SM, Cahill H, Ryugo DK, Shen MM, Xiang M. Hearing loss caused by progressive degeneration of cochlear hair cells in mice deficient for the *Barhl1* homeobox gene. *Development.* julio de 2002;129(14):3523-32.
42. Zhong C, Fu Y, Pan W, Yu J, Wang J. *Atoh1* and other related key regulators in the development of auditory sensory epithelium in the mammalian inner ear: function and interplay. *Dev Biol.* 15 de febrero de 2019;446(2):133-41.

43. Frolenkov GI, Belyantseva IA, Friedman TB, Griffith AJ. Genetic insights into the morphogenesis of inner ear hair cells. *Nat Rev Genet.* julio de 2004;5(7):489-98.
44. Manor U, Kachar B. Dynamic length regulation of sensory stereocilia [Internet]. Vol. 19, *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2008. p. 502-10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.006>
45. Bruska M, Woźniak W. The origin of cells of the cochlear ganglion in early human embryos. *Folia Morphol.* 2000;59(4):233-8.
46. Pechriggl EJ, Bitsche M, Glueckert R, Rask-Andersen H, Blumer MJF, Schrott-Fischer A, et al. Development of the innervation of the human inner ear. *Dev Neurobiol.* julio de 2015;75(7):683-702.
47. Roccio M, Senn P, Heller S. Novel insights into inner ear development and regeneration for targeted hearing loss therapies. *Hear Res.* 28 de noviembre de 2019;107859.
48. Corwin JT, Cotanche DA. Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma [Internet]. Vol. 240, *Science.* 1988. p. 1772-4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.3381100>
49. Ryals BM, Rubel EW. Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail [Internet]. Vol. 240, *Science.* 1988. p. 1774-6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.3381101>
50. Roberson DW, Rubel EW. Cell division in the gerbil cochlea after acoustic trauma. *Am J Otol.* enero de 1994;15(1):28-34.
51. Duncan LJ, Mangiardi DA, Matsui JI, Anderson JK, MCLAughlin-Williamson K, Cotanche DA. Differential expression of unconventional myosins in apoptotic and regenerating chick hair cells confirms two regeneration mechanisms [Internet]. Vol. 499, *The Journal of Comparative Neurology.* 2006. p. 691-701. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cne.21114>
52. Slattery EL, Warchol ME. Cisplatin ototoxicity blocks sensory regeneration in the avian inner ear. *J Neurosci.* 3 de marzo de 2010;30(9):3473-81.
53. Gao W-Q. Protection of Cochlear Hair Cells from Gentamicin Ototoxicity and Mechanisms of Mammalian Hair Cell Regeneration in Vitro [Internet]. *Cell and Molecular Biology of the Ear.* 2000. p. 183-97. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-4223-0_14
54. Kawamoto K, Izumikawa M, Beyer LA, Atkin GM, Raphael Y. Spontaneous hair cell regeneration in the mouse utricle following gentamicin ototoxicity. *Hear Res.* enero de 2009;247(1):17-26.
55. Kelley MW, Talreja DR, Corwin JT. Replacement of hair cells after laser microbeam irradiation in cultured organs of corti from embryonic and neonatal mice. *J Neurosci.* abril de 1995;15(4):3013-26.
56. Weissman IL. Stem Cells. *Cell.* enero de 2000;100(1):157-68.
57. Kooy D van der, van der Kooy D. Why Stem Cells? [Internet]. Vol. 287, *Science.* 2000. p. 1439-41. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.287.5457.1439>

58. Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science*. 25 de febrero de 2000;287(5457):1431-3.
59. Melton D. 'Stemness'. En: *Essentials of Stem Cell Biology*. Elsevier; 2014. p. 7-17.
60. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations [Internet]. Vol. 17, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2001. p. 387-403. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.387>
61. Hadjantonakis A, Papaioannou V. The stem cells of early embryos. *Differentiation*. octubre de 2001;68(4-5):159-66.
62. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*. 11 de diciembre de 1998;282(5396):2072-5.
63. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A STOCHASTIC MODEL OF STEM CELL PROLIFERATION, BASED ON THE GROWTH OF SPLEEN COLONY-FORMING CELLS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. enero de 1964;51:29-36.
64. Deslex S, Negrel R, Vannier C, Etienne J, Ailhaud G. Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes*. 1987;11(1):19-27.
65. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell*. septiembre de 2003;114(6):763-76.
66. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 27 de marzo de 1992;255(5052):1707-10.
67. Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol*. septiembre de 2004;22(9):1115-24.
68. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 15 de noviembre de 2003;102(10):3483-93.
69. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 4 de julio de 2002;418(6893):41-9.
70. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. agosto de 2000;164(2):247-56.
71. Petersen ED, Zenchak JR, Lossia OV, Hochgeschwender U. Neural Stem Cells Derived Directly from Adipose Tissue. *Stem Cells Dev*. 1 de mayo de 2018;27(9):637-47.
72. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 5 de marzo de 2004;116(5):639-48.
73. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

74. Mosna F, Sensebé L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev.* octubre de 2010;19(10):1449-70.
75. Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med.* mayo de 2009;4(3):423-33.
76. Crapnell K, Blaesus R, Hastings A, Lennon DP, Caplan AI, Bruder SP. Growth, differentiation capacity, and function of mesenchymal stem cells expanded in serum-free medium developed via combinatorial screening. *Exp Cell Res.* 10 de junio de 2013;319(10):1409-18.
77. Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med.* enero de 2013;19(1):35-42.
78. D'souza N, Rossignoli F, Golinelli G, Grisendi G, Spano C, Candini O, et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies. *BMC Med.* 12 de agosto de 2015;13:186.
79. Trohatou O, Roubelakis MG. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Past, Present, and Future. *Cell Reprogram.* agosto de 2017;19(4):217-24.
80. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy.* 2003;5(5):362-9.
81. Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell.* 17 de octubre de 2008;135(2):240-9.
82. Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science.* 24 de octubre de 2008;322(5901):583-6.
83. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 11 de septiembre de 2008;3(3):301-13.
84. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res.* 4 de enero de 2008;102(1):77-85.
85. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* julio de 2006;208(1):64-76.
86. Gomillion CT, Burg KJL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials.* diciembre de 2006;27(36):6052-63.
87. Vallée M, Côté J-F, Fradette J. Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathol Biol.* junio de 2009;57(4):309-17.
88. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization

of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. enero de 2018;93(1):19-31.

89. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology [Internet]. Vol. 24, *Trends in Biotechnology*. 2006. p. 150-4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.01.010>
90. Meyer J, Salamon A, Mispagel S, Kamp G, Peters K. Energy metabolic capacities of human adipose-derived mesenchymal stromal cells in vitro and their adaptations in osteogenic and adipogenic differentiation [Internet]. Vol. 370, *Experimental Cell Research*. 2018. p. 632-42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.07.028>
91. Bateman ME, Strong AL, Gimble JM, Bunnell BA. Concise Review: Using Fat to Fight Disease: A Systematic Review of Nonhomologous Adipose-Derived Stromal/Stem Cell Therapies. *Stem Cells*. septiembre de 2018;36(9):1311-28.
92. Nordberg RC, Lobo EG. Our Fat Future: Translating Adipose Stem Cell Therapy. *Stem Cells Transl Med*. septiembre de 2015;4(9):974-9.
93. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*. julio de 2007;46(1):219-28.
94. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006;8(2):166-77.
95. Balducci L, Alessandri G. Isolation, Expansion, and Immortalization of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Biopsies and Liposuction Specimens [Internet]. *Mesenchymal Stem Cells*. 2016. p. 259-74. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_15
96. Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. agosto de 2003;3(5):705-13.
97. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 11 de mayo de 2007;100(9):1249-60.
98. Yu C, Liu K, Tang S, Ding S. Chemical approaches to cell reprogramming. *Curr Opin Genet Dev*. octubre de 2014;28:50-6.
99. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors [Internet]. Vol. 126, *Cell*. 2006. p. 663-76. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
100. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors [Internet]. Vol. 131, *Cell*. 2007. p. 861-72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
101. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells [Internet]. Vol. 318, *Science*. 2007. p. 1917-20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1151526>

102. Morita R, Suzuki M, Kasahara H, Shimizu N, Shichita T, Sekiya T, et al. ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 de enero de 2015;112(1):160-5.
103. Patel M, Yang S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev Rep*. septiembre de 2010;6(3):367-80.
104. Meng F, Chen S, Miao Q, Zhou K, Lao Q, Zhang X, et al. Induction of fibroblasts to neurons through adenoviral gene delivery. *Cell Res*. febrero de 2012;22(2):436-40.
105. Ban H, Nishishita N, Fusaki N, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, et al. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 de agosto de 2011;108(34):14234-9.
106. Chakraborty S, Ji H, Kabadi AM, Gersbach CA, Christoforou N, Leong KW. A CRISPR/Cas9-based system for reprogramming cell lineage specification. *Stem Cell Reports*. 9 de diciembre de 2014;3(6):940-7.
107. Chen Z, Li S, Subramaniam S, Shyy JY-J, Chien S. Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. *Annu Rev Biomed Eng*. 21 de junio de 2017;19:195-219.
108. Rubio A, Luoni M, Giannelli SG, Radice I, Iannielli A, Cancellieri C, et al. Rapid and efficient CRISPR/Cas9 gene inactivation in human neurons during human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Sci Rep*. 18 de noviembre de 2016;6:37540.
109. Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, P R Iyer E, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*. abril de 2015;12(4):326-8.
110. Giménez CA, Ielpi M, Mutto A, Grosebacher L, Argibay P, Pereyra-Bonnet F. CRISPR-on system for the activation of the endogenous human INS gene. *Gene Ther*. junio de 2016;23(6):543-7.
111. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol*. 21 de octubre de 2008;6(10):e253.
112. Pereyra-Bonnet F, Gimeno ML, Argumedo NR, Ielpi M, Cardozo JA, Giménez CA, et al. Skin Fibroblasts from Patients with Type 1 Diabetes (T1D) Can Be Chemically Transdifferentiated into Insulin-Expressing Clusters: A Transgene-Free Approach [Internet]. Vol. 9, *PLoS ONE*. 2014. p. e100369. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100369>
113. Goonoo N, Bhaw-Luximon A. Mimicking growth factors: role of small molecule scaffold additives in promoting tissue regeneration and repair [Internet]. Vol. 9, *RSC Advances*. 2019. p. 18124-46. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/c9ra02765c>
114. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol*. septiembre de 1987;105(3):1039-45.
115. Li H, Roblin G, Liu H, Heller S. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 de noviembre de 2003;100(23):13495-500.
116. Shi F, Corrales CE, Liberman MC, Edge ASB. BMP4 induction of sensory neurons from human

embryonic stem cells and reinnervation of sensory epithelium. *Eur J Neurosci*. diciembre de 2007;26(11):3016-23.

117. Boddy SL, Chen W, Romero-Guevara R, Kottam L, Bellantuono I, Rivolta MN. Inner ear progenitor cells can be generated in vitro from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Regen Med*. noviembre de 2012;7(6):757-67.
118. Lahlou H, Lopez-Juarez A, Fontbonne A, Nivet E, Zine A. Modeling human early otic sensory cell development with induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 14 de junio de 2018;13(6):e0198954.
119. Lo KW-H, Ashe KM, Kan HM, Laurencin CT. The role of small molecules in musculoskeletal regeneration. *Regen Med*. julio de 2012;7(4):535-49.
120. De D, Halder D, Shin I, Kim KK. Small molecule-induced cellular conversion. *Chem Soc Rev*. 16 de octubre de 2017;46(20):6241-54.
121. Apostolou E, Hochedlinger K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature*. 24 de octubre de 2013;502(7472):462-71.
122. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 4 de septiembre de 2009;5(3):237-41.
123. Heng J-CD, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, Ng J-H, et al. The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell*. 5 de febrero de 2010;6(2):167-74.
124. Rackham OJL, Firas J, Fang H, Oates ME, Holmes ML, Knaupp AS, et al. A predictive computational framework for direct reprogramming between human cell types. *Nat Genet*. marzo de 2016;48(3):331-5.
125. Oshima K, Shin K, Diensthuber M, Peng AW, Ricci AJ, Heller S. Mechanosensitive Hair Cell-like Cells from Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells [Internet]. Vol. 141, *Cell*. 2010. p. 704-16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.035>
126. Koehler KR, Mikosz AM, Molosh AI, Patel D, Hashino E. Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature*. 8 de agosto de 2013;500(7461):217-21.
127. Ronaghi M, Nasr M, Ealy M, Durruthy-Durruthy R, Waldhaus J, Diaz GH, et al. Inner ear hair cell-like cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 1 de junio de 2014;23(11):1275-84.
128. Abboud N, Fontbonne A, Watabe I, Tonetto A, Brezun JM, Feron F, et al. Culture conditions have an impact on the maturation of traceable, transplantable mouse embryonic stem cell-derived otic progenitor cells. *J Tissue Eng Regen Med*. septiembre de 2017;11(9):2629-42.
129. Singh S, Groves AK. The molecular basis of craniofacial placode development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. mayo de 2016;5(3):363-76.
130. Uji Y, Ishizaka S, Nakamura-Uchiyama F, Yoshikawa M. In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cell-like cells using stromal cell conditioned medium. *Cell Death Dis*. 24 de mayo de 2012;3:e314.

131. Kojima K, Tamura S, Nishida AT, Ito J. Generation of inner ear hair cell immunophenotypes from neurospheres obtained from fetal rat central nervous system in vitro. *Acta Otolaryngol Suppl.* marzo de 2004;(551):26-30.
132. Tang P-C, Hashino E, Nelson RF. Progress in Modeling and Targeting Inner Ear Disorders with Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 9 de junio de 2020;14(6):996-1008.
133. Ohnishi H, Skerleva D, Kitajiri S-I, Sakamoto T, Yamamoto N, Ito J, et al. Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple stepwise method. *Neurosci Lett.* 10 de julio de 2015;599:49-54.
134. Ding J, Tang Z, Chen J, Shi H, Chen J, Wang C, et al. Induction of differentiation of human embryonic stem cells into functional hair-cell-like cells in the absence of stromal cells. *Int J Biochem Cell Biol.* diciembre de 2016;81(Pt A):208-22.
135. Qin H, Zhao L-D, Sun J-H, Ren L-L, Guo W-W, Liu H-Z, et al. The differentiation of mesenchymal stem cells into inner ear hair cell-like cells in vitro. *Acta Otolaryngol.* noviembre de 2011;131(11):1136-41.
136. Jeon S-J, Oshima K, Heller S, Edge ASB. Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors in vitro for inner ear hair cells. *Mol Cell Neurosci.* enero de 2007;34(1):59-68.
137. Durán Alonso MB, Feijoo-Redondo A, Conde de Felipe M, Carnicero E, García AS, García-Sancho J, et al. Generation of inner ear sensory cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Regen Med.* noviembre de 2012;7(6):769-83.
138. Doyle KL, Kazda A, Hort Y, McKay SM, Oleskevich S. Differentiation of adult mouse olfactory precursor cells into hair cells in vitro. *Stem Cells.* marzo de 2007;25(3):621-7.
139. Koehler KR, Nie J, Longworth-Mills E, Liu X-P, Lee J, Holt JR, et al. Generation of inner ear organoids containing functional hair cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* junio de 2017;35(6):583-9.
140. Munnamalai V, Fekete DM. Building the human inner ear in an organoid [Internet]. Vol. 35, *Nature Biotechnology.* 2017. p. 518-20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3899>
141. Roccio M, Edge ASB. Inner ear organoids: new tools to understand neurosensory cell development, degeneration and regeneration [Internet]. Vol. 146, *Development.* 2019. p. dev177188. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.177188>
142. McLean WJ, McLean DT, Eatock RA, Edge ASB. Distinct capacity for differentiation to inner ear cell types by progenitor cells of the cochlea and vestibular organs. *Development.* 1 de diciembre de 2016;143(23):4381-93.
143. Jeong M, O'Reilly M, Kirkwood NK, Al-Aama J, Lako M, Kros CJ, et al. Generating inner ear organoids containing putative cochlear hair cells from human pluripotent stem cells [Internet]. Vol. 9, *Cell Death & Disease.* 2018. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0967-1>
144. Nie J, Hashino E. Generation of inner ear organoids from human pluripotent stem cells [Internet]. *Methods in Cell Biology.* 2020. p. 303-21. Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.02.006>

145. Duroux-Richard I, Giovannangeli C, Apparailly F. CRISPR-Cas9: A revolution in genome editing in rheumatic diseases. *Joint Bone Spine*. enero de 2017;84(1):1-4.
146. Redman M, King A, Watson C, King D. What is CRISPR/Cas9? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. agosto de 2016;101(4):213-5.
147. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 28 de febrero de 2013;152(5):1173-83.
148. Jiang F, Doudna JA. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Struct Biol*. febrero de 2015;30:100-11.
149. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 de septiembre de 2012;109(39):E2579-86.
150. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 17 de agosto de 2012;337(6096):816-21.
151. Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. enero de 2016;17(1):5-15.
152. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 18 de julio de 2013;154(2):442-51.
153. Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li G-W, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*. 19 de diciembre de 2013;155(7):1479-91.
154. Kearns NA, Pham H, Tabak B, Genga RM, Silverstein NJ, Garber M, et al. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat Methods*. mayo de 2015;12(5):401-3.
155. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen Y, Whitehead EH, et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell*. 23 de octubre de 2014;159(3):647-61.
156. Chen M, Qi LS. Repurposing CRISPR System for Transcriptional Activation. En: Li L-C, editor. *RNA Activation*. Singapore: Springer Singapore; 2017. p. 147-57.
157. Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods*. octubre de 2013;10(10):973-6.
158. Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu Y, Ho QH, Joung JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*. octubre de 2013;10(10):977-9.

159. Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res.* octubre de 2013;23(10):1163-71.
160. Kearns NA, Genga RMJ, Enuameh MS, Garber M, Wolfe SA, Maehr R. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells. *Development.* enero de 2014;141(1):219-23.
161. Balboa D, Weltner J, Eurola S, Trokovic R, Wartiovaara K, Otonkoski T. Conditionally Stabilized dCas9 Activator for Controlling Gene Expression in Human Cell Reprogramming and Differentiation. *Stem Cell Reports.* 8 de septiembre de 2015;5(3):448-59.
162. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells.* marzo de 2005;23(3):412-23.
163. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol.* octubre de 2001;189(1):54-63.
164. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* septiembre de 2005;54(3):132-41.
165. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium [Internet]. Vol. 84, *Journal of Clinical Investigation.* 1989. p. 1663-70. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1172/jci114345>
166. Van RL, Bayliss CE, Roncari DA. Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest.* septiembre de 1976;58(3):699-704.
167. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem.* febrero de 1964;239:375-80.
168. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* abril de 2001;7(2):211-28.
169. Hassan WU, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing [Internet]. Vol. 22, *Wound Repair and Regeneration.* 2014. p. 313-25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/wrr.12173>
170. Raposio E, Bertozzi N. Isolation of Ready-to-Use Adipose-Derived Stem Cell (ASC) Pellet for Clinical Applications and a Comparative Overview of Alternate Methods for ASC Isolation [Internet]. Vol. 41, *Current Protocols in Stem Cell Biology.* 2017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cpsc.29>
171. Hendijani F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. *Cell Prolif* [Internet]. abril de 2017;50(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/cpr.12334>
172. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, et al. Cell-assisted lipotransfer:

supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng.* diciembre de 2006;12(12):3375-82.

173. Zielins ER, Brett EA, Longaker MT, Wan DC. Autologous Fat Grafting: The Science Behind the Surgery. *Aesthet Surg J.* abril de 2016;36(4):488-96.
174. Domenis R, Lazzaro L, Calabrese S, Mangoni D, Gallelli A, Bourkoula E, et al. Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques [Internet]. Vol. 6, *Stem Cell Research & Therapy*. 2015. p. 2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/scrt536>
175. Francis MP, Sachs PC, Elmore LW, Holt SE. Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction. *Organogenesis.* enero de 2010;6(1):11-4.
176. Shah FS, Wu X, Dietrich M, Rood J, Gimble JM. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. *Cytotherapy.* agosto de 2013;15(8):979-85.
177. Zeng G, Lai K, Li J, Zou Y, Huang H, Liang J, et al. A rapid and efficient method for primary culture of human adipose-derived stem cells. *Organogenesis.* 1 de octubre de 2013;9(4):287-95.
178. Tremolada C, Colombo V, Ventura C. Adipose Tissue and Mesenchymal Stem Cells: State of the Art and Lipogems® Technology Development. *Curr Stem Cell Rep.* 13 de julio de 2016;2:304-12.
179. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy.* junio de 2013;15(6):641-8.
180. Palumbo P, Miconi G, Cinque B, La Torre C, Lombardi F, Zoccali G, et al. In vitro evaluation of different methods of handling human liposuction aspirate and their effect on adipocytes and adipose derived stem cells. *J Cell Physiol.* agosto de 2015;230(8):1974-81.
181. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells.* mayo de 2012;30(5):804-10.
182. Varma MJO, Breuls RGM, Schouten TE, Jurgens WJFM, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, et al. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* febrero de 2007;16(1):91-104.
183. Cardozo A, Ielpi M, Gómez D, Argibay P. Differential expression of Shh and BMP signaling in the potential conversion of human adipose tissue stem cells into neuron-like cells in vitro. *Gene Expr.* 2010;14(6):307-19.
184. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen Y-DC, Wilkison WO, Gimble JM, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 7 de junio de 2002;294(2):371-9.
185. Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia

in rats. *Exp Neurol.* octubre de 2003;183(2):355-66.

186. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EKW. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg.* marzo de 2003;75(3):775-9.

187. Planat-Benard V, Menard C, André M. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circulation* [Internet]. 2004; Disponible en: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.res.0000109792.43271.47>

188. Rodriguez A-M, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne J-Y, Wdziekonski B, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med.* 2 de mayo de 2005;201(9):1397-405.

189. Cardozo AJ, Gómez DE, Argibay PF. Transcriptional characterization of Wnt and Notch signaling pathways in neuronal differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *J Mol Neurosci.* julio de 2011;44(3):186-94.

190. Cardozo AJ, Gómez DE, Argibay PF. Neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: relevance of different signaling molecules, transcription factors, and key marker genes. *Gene.* 15 de diciembre de 2012;511(2):427-36.

191. Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells [Internet]. Vol. 92, *Differentiation*. 2016. p. 41-51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2016.02.005>

192. León Y, Vazquez E, Sanz C, Vega JA, Mato JM, Giraldez F, et al. Insulin-like growth factor-I regulates cell proliferation in the developing inner ear, activating glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis and Fos expression. *Endocrinology.* agosto de 1995;136(8):3494-503.

193. Oesterle EC, Tsue TT, Rubel EW. Induction of cell proliferation in avian inner ear sensory epithelia by insulin-like growth factor-I and insulin [Internet]. Vol. 380, *The Journal of Comparative Neurology*. 1997. p. 262-74. Disponible en: [3.0.co;2-1">http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19970407\)380:2<262::aid-cne8>3.0.co;2-1](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19970407)380:2<262::aid-cne8>3.0.co;2-1)

194. Murillo-Cuesta S, Camarero G, González-Rodríguez A, De La Rosa LR, Burks DJ, Avendaño C, et al. Insulin receptor substrate 2 (IRS2)-deficient mice show sensorineural hearing loss that is delayed by concomitant protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) loss of function. *Mol Med.* 30 de marzo de 2012;18:260-9.

195. Murillo-Cuesta S, Rodríguez-de la Rosa L, Cediell R, Lassaletta L, Varela-Nieto I. The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing. *Front Mol Neurosci.* 25 de julio de 2011;4:11.

196. Camarero G, Villar MA, Contreras J, Fernández-Moreno C, Pichel JG, Avendaño C, et al. Cochlear abnormalities in insulin-like growth factor-1 mouse mutants. *Hear Res.* agosto de 2002;170(1-2):2-11.

197. Sanchez-Calderon H, Rodríguez-de la Rosa L, Milo M, Pichel JG, Holley M, Varela-Nieto I. RNA microarray analysis in prenatal mouse cochlea reveals novel IGF-I target genes: implication of MEF2 and FOXM1 transcription factors. *PLoS One.* 25 de enero de 2010;5(1):e8699.

198. Aburto MR, Magariños M, Leon Y, Varela-Nieto I, Sanchez-Calderon H. AKT signaling mediates IGF-I survival actions on otic neural progenitors. *PLoS One*. 23 de enero de 2012;7(1):e30790.
199. Moelling K, Schad K, Bosse M, Zimmermann S, Schwenecker M. Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem*. 23 de agosto de 2002;277(34):31099-106.
200. Magariños M, Aburto MR, Sánchez-Calderón H, Muñoz-Agudo C, Rapp UR, Varela-Nieto I. RAF kinase activity regulates neuroepithelial cell proliferation and neuronal progenitor cell differentiation during early inner ear development. *PLoS One*. 28 de diciembre de 2010;5(12):e14435.
201. Wright TJ, Mansour SL. FGF signaling in ear development and innervation. *Curr Top Dev Biol*. 2003;57:225-59.
202. Schimmang T. Expression and functions of FGF ligands during early otic development. *Int J Dev Biol*. 2007;51(6-7):473-81.
203. Pirvola U, Ylikoski J, Trokovic R, Hébert JM, McConnell SK, Partanen J. FGFR1 is required for the development of the auditory sensory epithelium. *Neuron*. 15 de agosto de 2002;35(4):671-80.
204. Sanchez-Calderon H, Milo M, Leon Y, Varela-Nieto I. A network of growth and transcription factors controls neuronal differentiation and survival in the developing ear. *Int J Dev Biol*. 2007;51(6-7):557-70.
205. Millimaki BB, Sweet EM, Dhasan MS, Riley BB. Zebrafish *atoh1* genes: classic proneural activity in the inner ear and regulation by Fgf and Notch. *Development*. enero de 2007;134(2):295-305.
206. Nicholl AJ, Kneebone A, Davies D, Cacciabue-Rivolta DI, Rivolta MN, Coffey P, et al. Differentiation of an auditory neuronal cell line suitable for cell transplantation. *Eur J Neurosci*. julio de 2005;22(2):343-53.
207. Wei D, Jin Z, Järlebark L, Scarfone E, Ulfendahl M. Survival, synaptogenesis, and regeneration of adult mouse spiral ganglion neurons in vitro. *Dev Neurobiol*. enero de 2007;67(1):108-22.
208. Freter S, Muta Y, Mak S-S, Rinkwitz S, Ladher RK. Progressive restriction of otic fate: the role of FGF and Wnt in resolving inner ear potential [Internet]. Vol. 135, *Development*. 2008. p. 3415-24. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.026674>
209. Martin K, Groves AK. Competence of cranial ectoderm to respond to Fgf signaling suggests a two-step model of otic placode induction. *Development*. marzo de 2006;133(5):877-87.
210. Oshima K, Suchert S, Blevins NH, Heller S. Curing hearing loss: Patient expectations, health care practitioners, and basic science. *J Commun Disord*. julio de 2010;43(4):311-8.
211. Alvarez Y, Alonso MT, Vendrell V, Zelarayan LC, Chamero P, Theil T, et al. Requirements for FGF3 and FGF10 during inner ear formation. *Development*. diciembre de 2003;130(25):6329-38.
212. Zelarayan LC, Vendrell V, Alvarez Y, Domínguez-Frutos E, Theil T, Alonso MT, et al. Differential requirements for FGF3, FGF8 and FGF10 during inner ear development. *Dev Biol*. 15 de agosto de 2007;308(2):379-91.

213. Zhao H, Ayrault O, Zindy F, Kim J-H, Roussel MF. Post-transcriptional down-regulation of Atoh1/Math1 by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development. *Genes Dev.* 15 de marzo de 2008;22(6):722-7.
214. Gálvez H, Tena JJ, Giraldez F, Abelló G. The Repression of Atoh1 by Neurogenin1 during Inner Ear Development. *Front Mol Neurosci.* 20 de octubre de 2017;10:321.
215. Cheng Y-F. Atoh1 regulation in the cochlea: more than just transcription. *J Zhejiang Univ Sci B.* febrero de 2019;20(2):146-55.
216. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* septiembre de 2013;31(9):827-32.
217. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* noviembre de 2013;8(11):2281-308.
218. Longo PA, Kavran JM, Kim M-S, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol.* 2013;529:227-40.
219. Brown A, Winter J, Gapinske M, Tague N, Woods WS, Perez-Pinera P. Multiplexed and tunable transcriptional activation by promoter insertion using nuclease-assisted vector integration. *Nucleic Acids Res.* 9 de julio de 2019;47(12):e67.
220. Cui Y, Xu J, Cheng M, Liao X, Peng S. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools [Internet]. Vol. 10, *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences.* 2018. p. 455-65. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s12539-018-0298-z>
221. Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin J-D, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods.* octubre de 2015;12(10):982-8.
222. Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim J-S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.* marzo de 2013;31(3):230-2.
223. Wu J, Hunt SD, Xue H, Liu Y, Darabi R. Generation and Characterization of a MYF5 Reporter Human iPS Cell Line Using CRISPR/Cas9 Mediated Homologous Recombination. *Sci Rep.* 5 de enero de 2016;6:18759.
224. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature.* 29 de enero de 2015;517(7536):583-8.
225. Perrin A, Rousseau J, Tremblay JP. Increased Expression of Laminin Subunit Alpha 1 Chain by dCas9-VP160. *Mol Ther Nucleic Acids.* 17 de marzo de 2017;6:68-79.
226. Alejandra GC, Lucia C, Ho HS, Luis G, Juan RP, Federico P-B. Activation of pancreatic β -cell genes by multiplex epigenetic CRISPR-editing. *Molecular Biology.* bioRxiv; 2020.
227. Zhou H, Liu J, Zhou C, Gao N, Rao Z, Li H, et al. In vivo simultaneous transcriptional activation of multiple genes in the brain using CRISPR-dCas9-activator transgenic mice. *Nat Neurosci.* 15 de

enero de 2018;21(3):440-6.

228. Luft C, Ketteler R. Electroporation Knows No Boundaries: The Use of Electrostimulation for siRNA Delivery in Cells and Tissues. *J Biomol Screen*. septiembre de 2015;20(8):932-42.
229. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 1985;315(6021):680-3.
230. Zhang Z, Zhang Y, Gao F, Han S, Cheah KS, Tse H-F, et al. CRISPR/Cas9 Genome-Editing System in Human Stem Cells: Current Status and Future Prospects. *Mol Ther Nucleic Acids*. 15 de diciembre de 2017;9:230-41.
231. Yin H, Song C-Q, Dorkin JR, Zhu LJ, Li Y, Wu Q, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo [Internet]. Vol. 34, *Nature Biotechnology*. 2016. p. 328-33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3471>
232. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, et al. Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery [Internet]. Vol. 72, *Journal of Virology*. 1998. p. 9873-80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.72.12.9873-9880.1998>
233. Buchschacher GL Jr, Wong-Staal F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*. 15 de abril de 2000;95(8):2499-504.
234. Kabadi AM, Ousterout DG, Hilton IB, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector. *Nucleic Acids Res*. 29 de octubre de 2014;42(19):e147-e147.
235. Yang L, Guell M, Byrne S, Yang JL, De Los Angeles A, Mali P, et al. Optimization of scarless human stem cell genome editing. *Nucleic Acids Res*. octubre de 2013;41(19):9049-61.
236. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*. 1982;1(7):841-5.
237. Potter H, Weir L, Leder P. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. noviembre de 1984;81(22):7161-5.
238. Gao X, Tao Y, Lamas V, Huang M, Yeh W-H, Pan B, et al. Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents. *Nature*. 11 de enero de 2018;553(7687):217-21.
239. Wei Z, Huang Y, Zhao D, Liang Z, Li Z. A parylene-based flexible electroporation chip applicable for in vivo gene and siRNA delivery [Internet]. 2011 16th International Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference. 2011. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1109/transducers.2011.5969380>
240. Search of: adipose stem cells - List Results - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 8 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=adipose+stem+cells&term=&cntry=&state=&city=&dist=>
241. Search of: stem cells | Hearing Loss, Sensorineural - List Results - ClinicalTrials.gov [Internet].

[citado 8 de marzo de 2020]. Disponible en:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Hearing+Loss%2C+Sensorineural&term=stem+cells&cntry=&state=&city=&dist=>

13.

Anexo I

Consentimiento informado para la obtención de tejido adiposo

Buenos Aires,..... de.....de

Sr/Sra. paciente:

A usted se le practicará una operación. Durante esa cirugía es común que se descarte tejido adiposo (grasa). Este material habitualmente se descarta junto con otros restos de la cirugía.

En este momento, estamos investigando si el tejido adiposo tiene células madres que pudieran reemplazar tejidos dañados. Estas investigaciones se deben llevar a cabo sobre tejido humano. En el momento de su cirugía, si se produce la liberación de tejido adiposo, el cirujano en lugar de descartarlo, lo reservará para utilizarlo en este protocolo de investigación.

La muestra será inmediatamente procesada, cultivada por tres meses y luego de este tiempo será destruida. Este proyecto no involucra investigación genética. Se guardará total confidencialidad con respecto a la identidad del donante. Esta información estará en custodia del investigador y del Comité de Ética del Hospital Italiano.

Esta toma de material, de ninguna manera afectará su salud, ni tendrá algún costo para usted, sus familiares o su cobertura social.

Lo invitamos a participar de este protocolo. Si usted está de acuerdo en que se utilicen estos tejidos normalmente desechables, tenga la amabilidad de firmar este consentimiento.

Nombre y Apellido.....

Tipo y número de documento

Firma del paciente

Firma del testigo

Material Suplementario

Tabla S1: Protocolo general de la técnica de ICQ e Inmunohistoquímica (IHQ) para analizar controles positivos.

<i>Fijación (para células en placa)</i>	
PAF 2-4 %	10 min
<i>Desparafinización e hidratación (para tejidos incluidos en parafina - controles +)</i>	
Xilol 1, 2 y 3 Alcohol 100º, 96º, 70º PBS	Pasajes de 3 min c/u Pasajes de 3 min c/u 5 min
<i>Recuperación Antigénica</i>	
Tejidos (controles positivos): Calentamiento en Horno microondas utilizando el buffer de recuperación elegido según cada caso: Buffer Citrato 0,01 M, pH 6 o Tritón Células en placa: Tris-EDTA pH 9 en microondas agregar a las células bien caliente (dejar unos minutos hasta que se enfríe) PBS	10 min a 100% de potencia, dejar 10 min y calentar otra vez 10 min a 100%. Dejar 20 min apagado. 5 min
<i>Permeabilización</i>	
Tritón 0.1% (15 min ó 30 min) ó Metanol Frío (10 min freezer)	
<i>Bloqueo de uniones no específicas:</i> Power block	5-10 min
<i>Anticuerpo Primario</i>	
Incubación con el anticuerpo específico PBS	overnight (en cámara húmeda) a 4ºC. 15 min

Sistema de Revelado	
Anticuerpo secundario Multilink 1/20 en PBS	45-60 min (en cámara húmeda a TA).
PBS	5 min
FITC (1/50) ó Texas Red (1/200) en PBS pH 8.2	45-60 min (en cámara húmeda a TA)
PBS pH 8.2	15 min
Contra-coloración nuclear con Hoechst 1/500	1 min
Montar y observar a MO	

Referencias: min: minutos; c/u: cada uno; TA: temperatura ambiente.

Tabla S2: Anticuerpos utilizados en los ensayos para caracterizar hASC por ICQ.

Anticuerpo primario utilizado	Dilución empleada	Proveedor	Control positivo
Anti-CD90	1/10	Santa Cruz Biotechnology, Inc	Médula ósea de ratón
Anti-CD105	1/100	Santa Cruz Biotechnology, Inc	Médula ósea de ratón
Anti-CD73	1/50	Santa Cruz Biotechnology, Inc	Médula ósea de ratón
Anti-CD29	1/100	Millipore	Médula ósea de ratón
Anti-CD45	1/100	Millipore™	Médula ósea de ratón
Anti-CD34	1/50	Dako Cytomation	Médula ósea de ratón
Anti-Stro I	1/100	R&D systems, Inc	Médula ósea de ratón
Anti-V. Willebrand	1/100	Novocastra	Cordón umbilical humano
Anti-Actina	1/100	Novocastra	Cordón umbilical humano

Figura S1: Secuencias de los promotores génicos con la ubicación de las sondas

Promotor proximal ATOH1

Cadena (+):

GCCTGCCCGCCCTCCATTGGCTGAGAAGACACGCGACCCGGCGCGAGGAGGGGGTTGGGAGAGGAGCGGGGGGAGACTG
 AGTGCGCGTGCCTTTTTAAAGGGGCGCAGCGCCTTCAGCAACCGGAGAAGCATAGTTGCACGCGACCTGGTGTGTGATC
 TCCGAGTGGGTGGGGGAGGGTCGAGGAGGGAAAAAATAAGACGTTCGAGAAGAGACCCGGAAAGGGCCTTTTTTTGG
 TTGAGCTGGTGTCCAGTGCTGCCTCCGATCCTGAGCCTCCGAGCCTTTCAGTGCAA

Cadena (-):

TTCGACTGCAAAGGCTCGGAGGCTCAGGATCGGAGGCAGCACTGGGACACCAGCTCAACCAAAAAAAGGCCCTTCCGGGT
 CTCTTGCACAGTCTTATTTTTTTTCCCTCCTCGACCCTCCCCACCACTCGGAGATCACACACCAGGTGCGGTGCAACTATG
 CTCTCCGTTGCTGAAGGCGCTGCGCCCTTTAAAAAGCGGCACGCGCCACTCAGTCTCCCCCGCTCCTCTCCAACCCCTC
 CTCGCGCCGGTTCGCTGCTCTCAGCCAATGGAGGGCGCGGGCAGGC

Promotor proximal SOX2

Cadena (+):

TGTGCCCTGCCCCACCCCGCACCTTAGCTGCTTCCCGCGTCCCATCCTCATTTAAGTACCCTGCACCAAAAAGTAAATCAATAT
TAAGTTTAAAGAAAAAACCACGTAAGTCTTAGTGTGTTACCCACTTCTTCGAAAAGGCGTGTGGTGTGACCTGTTGCT
GCGAGAGGGGATACAAAGTTTCTCAGTGGCTGGCAGGCTGGCTCTGGGAGCCTCCTCCCTCCTCGCTGCCCTCCTCC
CCCGGCTCCCCGCGCGGCCGGCGGCGCGGGAGGCCCGCCCTTTTCATGCAAAACCCGGCAGCGAGGCTGGGCTCGAGT
GGAGGAGCCGCGCGCTGATTGGTCGCTAGAAACCCATTTATTCCCTGACAGCCCCCGTCACATG

Cadena (-):

CATGTGACGGGGCTGTCAGGGAATAAATGGGTTTCTAGCGACCAATCAGCGCGGGCGGCTCCTCCACTCGAGCCAGCT
CGCTGCCGGGTTTTCATGAAAGGGGGCGGGCCTCCCGCGCCGCGGGCCGCGGGGGAGGCCGGGGGAGGAGGGGGCA
GGCGAGGAGGGGAGGAGGCTCCAGAGCCAGCCTGCCAGCCACTGAGAAACCTTTGTATCCCTCTCGCAGCAACAGGTCA
CACCACACGCTTTTTCGAAGGAAGTGGGTAAACAGCACTAAGACTACGTGGGTTTTTTTTTTTAACTTAATATTGATTACT
TTTTGGTGCAGGGTACTTAAATGAGGATGGGACGCGGGAAGCAGCTAAGGTGCGGGGTGGGGCAGGGCACA

Promotor proximal POU4F3

Cadena (+):

CCACGAAGAAGAAAGTTCGAAAGGCTCTGGCGGGTTGGAGCCAGCGGGGCGGGGCGGACTGGGAGAGGCCAGGCCAGG
CCCGGTATAAAGGCTGTGGAGGGGGCGGCCCGCGGGCGCAGAAAGGCGCGCCGCTAGCTGCTGTCTCTCTCACCTCC
GGCCGCCCTTTCGAGTCCCCGCGCGTGTAGCACGCTGCGCGCCCCGGGCCCTTCTGGCAGGCTGCTTGAAGATGAGT
GAAGAAGCAGGTGGGGGAGAGGGGAGGCAGCGAGCGAGAGGGCGAGGGGAGCGCGGGC

Cadena (-):

GCCCGCTCCCCTCGCCTCTCGCTCGCTGCCTCCCCTCTCCCCACCTGCTTCTCACTCATTTACAAGCAGCCTGCCAGGAA
GGCCCCGGGCGCGCAGGCGTGTACGCGCCGGGACTCGCAGGGGCGGCCGGGAGGTGAGGAGAGACAGCAGCTAG
CGCGCGCCTTTTCGCCCCGCGCGGCCGCCCTCCACAGCCTTATACCCGGGCTGGCCTGGCCTCTCCAGTCCGCCCC
GCCCGCTGGCTCCAACCCGCCAGACCTTCCGATTCTTCTTCTCGTG

Promotor proximal GFI1

Cadena (+):

AGGCCACACTATGGGTCATGGCATACTAGCTAGCGTTGGAGGTTGCTGCATTTGTTTCATGTATCTATGAGTTAGGTTTAAAG
TTTTTCCCCTGTTCTATTAATAAATAAATTAGTTAATTAACCCACTCATTACTTACTCAGTCCACAGCCTTTTGTAAAGAGC
CCGCTAGGACATAAAGATGAAGATCCAGTGCCTACCCTCATGAAACATAGAATCCGAGCGAAGAAGGCTTACTTTGCAATAG
TCATCCAAGTGGTGTCTTTATGGCGTTTACTGCTCCCGCAACACCCAGTGCCTGGGTATGACCTCAGGCGGTGGCAGAGCCC
GCGTGCAGAGTCCCCTGCTCCCTGGCTTCCCCGGCAGGGCGGAGTCAAGCCTAGCAGCCGCGGCGCTGCCCTCCGCGGCC
TTAATTTGAGCTCCGACCACCGAAATTAGTCGAGGCTGAGCGGACCCGGTCGAGAGCCGGCGAGCTCCGCGCAGGG

Cadena (-):

CCTGCGCGGAGCTCGCCGGCTCTGACCGGGTCCGCTCAGCCTTCTGACTAATTTCCGGTGGTGGGAGCTGCAAAATTAAGG
CCGCGCGGGGGCAGCGCCGGCGGCTGCTAGGCTGACTCCGCCCTGCCGGGCAAGCCAGGGAGAGCGGGACCTCGCACGCG
GGCTCTGCCACCGCTGAGGTCATACCCAGGCACTGGGTGTTGGCGGGAGCAGTAAAGCGCCATAAAAGCACCCTTGATG
ACTATTGCAAAGTAAGCCTTCTCGCTCGGATTCTATGTTTCATGAGGGTAGGCA

Referencias:

"N": comienzo TSS (+1)

"NNNNNNNNN": sonda diseñada en cadena +

"NNNNNNNNN": sonda diseñada en cadena –

"NGG": Secuencia PAM necesaria para CRISPR. Se debe posicionar después de la sonda (extremo 3')