

Células madre en el tratamiento de la sordera

M. Pellicer^a, F. Giráldez^b, F. Pumarola^a, J. Barquinero^c

^aSección de ORL Pediátrica, Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. ^bDCEXS. Universitat Pompeu Fabra. Barcelona. ^cUnidad de Terapia Celular del CTBT. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.

Resumen: Uno de los mayores retos en el tratamiento de las enfermedades del oído interno es conseguir un tratamiento para la sordera causada por pérdida de células ciliadas cocleares o de neuronas del ganglio espiral. El reciente descubrimiento de células madre (CM) en el oído interno adulto que son capaces de diferenciarse en células ciliadas, así como el hallazgo que las células madre embrionarias pueden convertirse en células ciliadas, han levantado esperanzas para el desarrollo futuro de tratamientos basados en células madre.

Palabras clave: Células madre. Sordera. Oído interno. Terapia. Revisión.

Stem cells for the treatment of hearing loss

Abstract: One of the greatest challenges in the treatment of inner ear disorders is to find a cure for the hearing loss caused by the loss of cochlear hair cells or spiral ganglion neurons. The recent discovery of stem cells in the adult inner ear that are capable of differentiating into hair cells, as well as the finding that embryonic stem cells can be converted into hair cells, raise hope for the future development of stem-cell-based treatments.

Key words: Stem cells. Hearing loss. Inner ear. Therapy. Review.

La curación de la sordera causada por la pérdida de células ciliadas cocleares o de neuronas del ganglio espiral constituye uno de los mayores retos en el tratamiento de la patología del oído interno.

La incidencia de la sordera congénita es alta (1:1000 nacimientos), y otro 1:1000 desarrolla sordera durante la infancia (sordera hereditaria la más prevalente en ambos grupos). La prevalencia de la sordera adquirida aumenta, esti-

mándose que uno de cada tres adultos de más de 65 años presenta una hipoacusia invalidante, por lo que la sordera constituye uno de los trastornos crónicos más frecuentes con más de 250 millones de afectados en todo el mundo <http://www.who.org>.

El oído interno adulto es una estructura altamente diferenciada responsable de la audición (cóclea) y del sentido del equilibrio (vestíbulo). La transmisión del sonido se realiza mediante las células ciliadas que son los transductores mecano-sensoriales del órgano de Corti. Este epitelio sensorial está inervado por las neuronas del ganglio coclear que transmiten las señales al sistema nervioso central.

Subyacente a la irreversibilidad de la sordera en los mamíferos está la incapacidad de reemplazar las células ciliadas perdidas. La sordera humana es, en la mayoría de casos, una consecuencia de la pérdida de células ciliadas. Clínicamente, la funcionalidad de las células ciliadas perdidas puede restaurarse parcialmente mediante la estimulación eléctrica del nervio auditivo, lo que se consigue mediante la implantación de aparatos electrónicos (léase implantes cocleares).

Las células madre (CM, SC, *stem-cells*) poseen la propiedad de autoperpetuarse y diferenciarse en una variedad de tipos celulares^{1,2}. Recientemente, esta potencialidad ha sido explorada para buscar la regeneración de las células ciliadas en los mamíferos^{3,4}. Un avance importante en las perspectivas de utilizar células madre para reemplazar células del oído interno ha venido del descubrimiento de que se pueden generar células ciliadas *in vivo* a partir de células madre embrionarias (ES), a partir de células madre del oído interno adulto, y a partir de células madre neurales⁴⁻⁶. Estas células madre son pluripotentes, de tal modo que, en teoría, todos los tipos celulares del oído interno pueden regenerarse a partir de estas células. Además, se ha demostrado que una vez implantadas pueden integrarse en el oído interno en fases tempranas del desarrollo⁴. De esta manera se abre la posibilidad de que los tratamientos basados en el trasplante de células madre puedan aplicarse al oído interno lesionado como parte de aplicaciones clínicas futuras en el tratamiento de la sordera³.

La terapia de substitución celular con células madre tiene el potencial para tener un impacto muy importante en la salud humana en las próximas décadas, aunque aún queda mucha investigación básica por desarrollar en torno a los

Correspondencia: Marc Pellicer.

Sección de ORL Pediátrica.

Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Passeig Vall d'Hebron, 119-129

08035 Barcelona

E-mail: mpellicer@vhebron.net

Fecha de recepción: 23-12-2004

Fecha de aceptación: 25-4-2005

problemas fundamentales de la diferenciación celular, la integración de las células en los entornos tisulares y regeneración. Las principales enfermedades diana para la aplicación terapéutica de las células madre son los procesos degenerativos como la diabetes, la patología miocárdica, la enfermedad de Parkinson y otros procesos neurodegenerativos². Los resultados iniciales indican que las células madre pueden diferenciarse en tipos celulares muy especializados, y que estas nuevas células pueden funcionar en modelos animales, restaurando o mejorando incluso la función del órgano subyacente⁷⁻¹⁰.

Las fuentes principales de células madre que se han utilizado para (re-)generar tipos celulares órgano-específicos son: células ES (embrionarias), células madre aisladas del órgano que debe ser generado, y células obtenidas de otros órganos. En un principio, la regeneración de células ciliadas perdidas puede, teóricamente, conseguirse a partir de células ES, células madre del oído interno, o células madre del cerebro, piel o médula ósea.

CÉLULAS CILIADAS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS (ES)

Las células ES derivan de la masa de células interna del blastocisto. Estas células son precursores de todas las demás células embrionarias, de manera que las células ES tienen la capacidad de diferenciación en multitud de tipos celulares, por lo que se denominan células pluripotentes. Las células ES tienen además la capacidad de autorrenovación y pueden ser expandidas hasta obtener grandes números de células. La generación de tipos celulares específicos dirigiendo la diferenciación de las células ES ofrece, teóricamente, un recurso extenso para desarrollar aplicaciones clínicas para reemplazar células lesionadas o enfermas. La aplicación con éxito de esta estrategia ha llevado a la generación de neuronas dopamínergicas para la enfermedad de Parkinson⁷⁻⁹, motoneuronas para lesiones de la médula espinal¹⁰, y, aparentemente, células secretoras de insulina⁸ (pero ver¹²). Recientemente se han generado también progenitores del oído interno *in vitro*⁵ a partir de células ES murinas. Estos progenitores expresan un conjunto de genes marcadores que los identifican como células del linaje de las células ciliadas, combinación de marcadores que sólo puede encontrarse en el oído interno en desarrollo. Tras la diferenciación *in vitro*, una subpoblación de los progenitores derivados-de-células-ES mostraron un fenotipo de célula ciliada, consistente en la expresión de Math1 y Brn3. Estos factores de transcripción son marcadores característicos y moléculas críticas para la generación y el mantenimiento de la diferenciación las células ciliadas^{13,14}. La expresión de estos reguladores transcripcionales se acompaña de una mayor producción de proteínas estructurales de las células ciliadas como la miosina VIIA^{15,16}, parvalbúmina 3^{17,18} y espina^{19,20}.

La implantación de progenitores del oído interno derivados-de-células-ES, marcados genéticamente, en el oído in-

terno del embrión de pollo, y su seguimiento durante el desarrollo temprano del oído, muestra que las células injertadas inician la expresión de marcadores de células ciliada cuando se sitúan en el epitelio sensorial durante el desarrollo embrionario, mientras las células progenitoras que se encuentren en otros lugares del oído interno no desarrollaran marcadores de célula ciliada. Por consiguiente se ha hipotetizado que las células progenitoras derivadas-de-células-ES murinas injertadas pueden responder a factores locales que controlan la especificación del tipo celular en el oído interno de pollo en desarrollo⁵. Aunque el epitelio sensorial del oído interno en desarrollo de pollo es diferente del órgano de Corti o del epitelio vestibular enfermo de mamífero, estos resultados han sido el primer éxito en la generación de células ciliadas *in vivo* usando células ES.

CÉLULAS CILIADAS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE ADULTAS

Al día de hoy, se han aislado y propagado células madre de muchos órganos adultos: cerebro, médula ósea, músculo, corazón, piel, ojo y, recientemente, del oído interno^{4,10,21-24}. Las células madre neurales tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos de células neuronales y gliales, y han sido injertadas con éxito en el oído interno de ratón lesionado farmacológicamente. Las células trasplantadas sobrevivieron durante varias semanas y expresaron marcadores neurales de tipos celulares maduros como marcadores de glia, neuronas y células ciliadas^{6,25}. La comparación del potencial *in vitro* de las células madre neurales con las células madre del oído interno del ratón adulto ha revelado dos diferencias sustanciales en el potencial de las células de diferenciarse hacia células ciliadas: 1) Se diferencian más células ciliadas maduras a partir de las células-madre-de-oído-interno que de las neurales (10% contra 0,1%), y 2) las células madre-de-oído-interno se diferencian más completamente en células ciliadas que las células-madre-neurales⁴. Las células-derivadas-de-células-madre-de-oído-interno *in vitro*, cuando son trasplantadas al oído interno en desarrollo de pollo, aumentan la expresión de marcadores específicos de célula ciliada de un modo similar a como lo hacen las células injertadas derivadas de células ES.

Las células madre del oído interno adulto residen, en el ratón, en el epitelio sensorial del utrículo⁴ y es plausible que sean la fuente de la regeneración de células ciliadas que tiene lugar en el epitelio sensorial utricular murino cuando es lesionado²⁶⁻³⁰. Las células madre del oído interno son pluripotentes y pueden diferenciarse, además de en células del oído interno, en muchos otros tipos celulares pertenecientes a las tres capas germinales del embrión: ectodermo, mesodermo, endodermo. Además, cumplen la característica definitoria de autoperpetuarse mediante la actividad proliferativa. Las células madre del oído interno poseen una alta capacidad de proliferación y pueden aislarse en forma de colonias clonales flotantes no adherentes o "esferas"^{14,5}. Este potencial de proliferación es crucial para desarrollar estrate-

gias terapéuticas para la sordera, porque la propagación de estas células podría sentar las bases para la sustitución de las células lesionadas.

¿LAS CÉLULAS CILIADAS DERIVADAS DE CÉLULAS MADRE SIGUEN EL PROGRAMA DE DESARROLLO NATIVO?

La audición está determinada por la correcta diferenciación e inervación de las células ciliadas en las etapas tempranas del desarrollo. En la década pasada se ha realizado un avance considerable en el conocimiento de las moléculas responsables del desarrollo del oído interno y del mantenimiento de su función^{31,33}. Contamos actualmente con marcadores moleculares para diferentes regiones y subpopulaciones celulares del esbozo auditivo de manera que es posible seguir su comportamiento proliferativo, su diferenciación y supervivencia^{34,35}.

El aparato sensorial del oído, con el complejo sistema de detección de los sonidos y percepción del equilibrio, se inicia por la inducción en el ectodermo embrionario de la placoda ótica, a lo que sucede la formación de la vesícula ótica. Uno de los primeros marcadores que aparecen durante el desarrollo del oído es Pax2, un factor de transcripción que se expresa en todas las células de la placoda ótica^{36,37}. Pax2 también se expresa en las células progenitoras generadas a partir de células madre del oído interno y en células-tipo-placoda obtenidas a partir de células ES mediante selección con una combinación de EGF e IGF-1^{4,5}.

Los epitelios sensoriales del oído expresan a lo largo del desarrollo embrionario una combinación de BMP4, BMP7, Jagged-1 y p27^{Kip1} que caracteriza el estado de determinación de estos epitelios³⁸⁻⁴³. Más tarde, las células ciliadas diferenciadas expresan Math1, Brn3.1, Miosina VIIA y espina. Este patrón temporal de expresión sucede también en las células progenitoras del oído interno derivadas de células madre. En consecuencia, en una primera aproximación, las células madre recapitulan *in vitro* el programa de diferenciación de las células ciliadas durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, la diferenciación de las células ciliadas en el embrión (así como en las especies que son capaces de regenerarlas) requiere de la presencia de células de soporte⁴, pero estas últimas no aparecen cuando se generan células ciliadas *in vitro*, a partir de células madre. Por lo tanto, es probable que la generación *in vitro* de células ciliadas morfológica y funcionalmente maduras requiera la co-generación de tipos celulares accesorios³.

¿ES POSIBLE LA REPARACIÓN DE LA LESIÓN COCLEAR?

El siguiente paso tras la generación de progenitores que se pueden diferenciar en células ciliadas *in vitro*, es comprobar si éstos van a ser capaces de reemplazar las células ciliadas perdidas en la cóclea de mamífero. Dicho es-

tudio requiere un modelo animal apropiado, como cepas de ratones con alguna mutación que produzca sordera a edad temprana, o animales con una pérdida de células ciliadas inducida mediante fármacos o traumatismo acústico. Las técnicas quirúrgicas para implantar células progenitoras en la cóclea lesionada sin causar daño adicional constituyen un importante reto adicional.

Modelos animales de sordera para estudios de regeneración

Dada la dificultad de estudiar los cambios degenerativos en la cóclea humana, se han utilizado diferentes modelos animales que reproducen total o parcialmente aspectos de la sordera asociada a la lesión de las células ciliadas. El descubrimiento de mutaciones genéticas responsables de sordera en humanos ha permitido crear modelos animales que replican estas mutaciones. Además se han descrito modelos de ratón portadores de mutaciones conocidas que han permitido conocer los fenotipos asociados a la expresión aberrante de un gen. Por otra parte, también puede generarse una pérdida selectiva de células ciliadas internas y externas en animales normales mediante el tratamiento con fármacos ototóxicos como los aminoglucósidos o el cisplatino^{44,45}. La aplicación local de ouabaína en la ventana redonda produce la degeneración de las neuronas del ganglio espiral y del nervio acústico⁴⁶. El trauma acústico también se ha usado para la creación de modelos animales de sordera. Todos estos modelos y sus cambios degenerativos cocleares inducidos podrían ser candidatos para explorar las posibilidades terapéuticas utilizando células madre.

Resultados potenciales y posibles obstáculos

¿Es necesaria la creación de los subtipos específicos de células ciliadas para conseguir la reparación funcional de la cóclea lesionada? Li et al³ sugieren que la recuperación de la función podría ser posible sin necesidad de generar la arquitectura coclear completa. Cualquier célula capaz de transducir de modo eficiente un estímulo mecánico y de activar una neurona aferente podría funcionar, en principio, como sustituto eficaz de una cóclea lesionada. Los posibles beneficios de una restitución limitada de la función de las células ciliadas se desconocen por el momento, pero el éxito de los implantes cocleares es esperanzador y sugiere que cualquier generación de una señal eléctrica en respuesta a un estímulo mecánico podría restaurar al menos parcialmente la percepción básica del sonido⁴⁷. La sustitución de las células ciliadas perdidas con células ciliadas derivadas de células madre a lo largo del mapa tonotópico de la cóclea podría ser suficiente para restaurar una función coclear básica incluso sin coincidir el fenotipo de célula ciliada con su localización (recuérdese que las propiedades de las células ciliadas no son idénticas a lo largo de la longitud de la membrana basilar). Pero, probablemente no sea posible pensar en la actualidad en regenerar la compleja y delicada

estructura del órgano de Corti una vez dañado. Una posible solución sería remplazar el órgano de Corti perdido por una hoja continua de células ciliadas "genéricas" similar a la organización de la papila auditiva de las aves. Un aspecto importante de esta hoja de células ciliadas, es que podría contener el necesario estímulo trófico para las neuronas auditivas. La diferenciación y el mantenimiento de las sinápsis entre las células ciliadas y las neuronas cocleares requiere la interacción entre las neurotropinas y los receptores trk, por tanto, el mantenimiento de las neuronas cocleares, podría mejorar a su vez los resultados de un implante coclear co-implantado. En consecuencia, cabe pensar que la regeneración coclear podría restaurar la función sin seguir estrictamente el programa de desarrollo que controla la embriogénesis del órgano de Corti. Es plausible que las nuevas células sean reinervadas si cuentan con la maquinaria bioquímica intacta y una capacidad de sintetizar factores neurotróficos⁴⁸⁻⁵⁰. Se desconoce si las células ciliadas generadas *de novo* localizadas en un ambiente micromecánico menos favorable pueden mejorar la audición, ni si la transferencia de genes a las células de un órgano de Corti lesionado puede llevar a una reaparición local de células ciliadas. Tampoco sabemos si un epitelio sensorial derivado de células madre se puede acoplar a la membrana tectorial, estructura que cuando se encuentra ausente o despegada de las células ciliadas produce defectos en la audición y un aumento significativo en el umbral auditivo^{51,52}.

Células madre para terapia del oído interno humano

Es difícil predecir como la terapia basada en células madre se trasladará a la práctica clínica. Además de células del oído interno derivadas de células ES⁵, de células madre neurales⁶, y de células madre del oído interno adulto⁴, también se pueden obtener células de donantes o de animales. Se han usado donantes para la terapia celular de la diabetes⁵³ combinada con una inmunosupresión. También se han utilizado células dopaminérgicas de cerdo para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson⁵⁴. Si bien, en principio, puede tratarse de una vía para el tratamiento de estas patologías, el xenotrasplante debe traspasar las barreras inmunológicas (anticuerpos naturales y células natural killer) y conlleva siempre una dificultad adicional^{55,56}.

De estar disponibles, las células humanas evitarían los problemas de rechazo entre especies diferentes, así como las posibles diferencias moleculares interespecíficas más sutiles. Podrían emplearse tanto células madre embrionarias como células madre de adulto, cada una con sus ventajas e inconvenientes³. Sobre las células ES se puede realizar ingeniería genética *in vitro*, introduciendo genes en líneas celulares antes de su trasplante a modelos animales para mejorar la eficacia de la inserción y de la función. Un problema que se debe tener muy presente es que en varios modelos animales los implantes de células madre desarrollan crecimientos tumorales, lo que es una barrera para una inmediata aplicación clínica. Además, la administración terapéutica de célu-

las ES, debe realizarse asociada a una inmunosupresión, por las diferencias en el complejo mayor de histocompatibilidad entre las células ES y el receptor (aunque menos intensa que la respuesta a un xenotrasplante). Este problema podría obviarse mediante la transferencia nuclear⁵⁷ (ver más abajo). Por otra parte, debe determinarse cuidadosamente el grado de inmunosupresión necesario para el trasplante de células al oído interno porque éste podría tener un privilegio inmunitario parecido al cerebro⁵⁸.

Otras opciones para la regeneración celular son las células derivadas de la médula ósea, que pueden diferenciarse en neuronas y en células pancreáticas^{59,60} entre otros tipos celulares. La introducción de células estromales derivadas de la médula ósea en el oído interno, aunque sin preselección de progenitores para el oído interno, resultó en un aumento de los marcadores neuronales y gliales⁶¹. La médula ósea del propio receptor podría obtenerse por biopsia, permitiendo un trasplante autólogo que no requeriría inmunosupresión, una técnica ya usada con mioblastos para trasplantes celulares en el corazón⁶². Además las células madre derivadas de la médula ósea son completamente renovables y podrían proporcionar un número de células adecuado para trasplante. Una alternativa para el trasplante autólogo podría ser la transferencia nuclear de una célula somática a un oocito encuclulado para generar células ES a partir de un blastocisto generado *in vitro*⁵⁷.

Regeneración por células madre o progenitoras endógenas

Con el descubrimiento de células madre en el oído interno del ratón adulto, se ha abierto la posibilidad de regenerar el oído interno lesionado estimulando células madre quiescentes a proliferar y generar nuevas células ciliadas⁴⁸⁻⁵⁰. El primer paso para investigar la posibilidad de utilizar células cocleares endógenas sería demostrar la presencia de células madre adultas en la cóclea. Se han aislado, recientemente, células formadoras de esferas, con el potencial de diferenciarse en células ciliadas de la cóclea de ratas recién nacidas⁶³. La demostración de estas células en el órgano de Corti adulto planteará nuevas preguntas: 1) Qué genes controlan las capacidades de autorenovación y pluripotencia, 2) Qué controla la quiescencia de las células madre en el oído interno de mamífero, 3) Cómo se puede estimular la proliferación y diferenciación de estas células en la dirección deseada.

CONCLUSIÓN

Retardar o revertir la sordera es uno de los mayores retos de la medicina moderna. A pesar de los fascinantes avances en la biotecnología de las *stem cells* y de la terapia génica, su aplicación clínica es muy limitada actualmente. Las ventajas de su posible uso terapéutico no deben ser sobrevaloradas. Pero el constante desarrollo de nuevas técnicas puede abrir futuras estrategias de tratamiento para enfermedades que tienen un abordaje terapéutico muy limitado.

Es posible que la terapia basada en células madre no pueda, por sí sola, ser la solución definitiva al problema de la sordera, y que la futura terapia combine terapia con células madre, terapia génica y tratamientos farmacológicos junto a aparatos electrónicos, de forma, además, individualizada para cada paciente.

Referencias

1. Thomson JA, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147.
2. Daley GQ, Goodell MA, et al. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003;398-418. Review.
3. Li H, Corrales CE, Edge A, Heller S. Stem cells as therapy for hearing loss. *Trends Mol Med* 2004 10(7):309-15.
4. Li H, et al. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 2003;9:1293-1299.
5. Li H, et al. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:13495-13500.
6. Tateya I, et al. Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. *Neuroreport* 2003;14:1677-1681.
7. Kim JH, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002;418:50-56.
8. Lumelsky N, et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001;292:1389-1394.
9. Bjorklund LM, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:2344-2349.
10. Beltrami AP, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763-776.
11. Wichterle H, et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 2002;110:385-397.
12. Rajgopal J, et al. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* 2003;299:363.
13. Bermingham NA, et al. Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 1999;284:1837-1841.
14. Xiang M, et al. Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9445-9450.
15. Sahly I, et al. Expression of myosin VIIA during mouse embryogenesis. *Anal Embryol (Berl)* 1997;196:159-170.
16. Hasson T, et al. Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9815-9819.
17. Heller S, et al. Parvalbumin 3 is an abundant Ca++ buffer in hair cells. *J Assoc Res Otolaryngol* 2002;3:488-489.
18. Thalmann R, et al. Specific proteins of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol* 1997;117:265-268.
19. Zheng L, et al. The deaf jerker mouse has a mutation in the gene encoding the espin actin-bundling proteins of hair cell stereocilia and lacks espins. *Cell* 2000;102:377-385.
20. Li H, et al. Correlation of expression of the actin filament-bundling protein espin with stereociliary bundle formation in the developing inner ear. *J Comp Neurol* 2004;468:125-134.
21. Gritti A, et al. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 1996;16:1091-1100.
22. Rietze RL, et al. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 2001;412:736-739.
23. Toma JG, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001;3:778-784.
24. Tropepe V, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2002;287:2032-2036.
25. Iguchi F, et al. Trophic support of mouse inner ear by neural stem cell transplantation. *Neuroreport* 2003;14:77-80.
26. Forge A, et al. Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science* 1993;259:1616-1619.
27. Warchol ME, et al. Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans. *Science* 1993;259:1619-1922.
28. Rubel EW, et al. Mammalian vestibular hair cell regeneration. *Science* 1995;267:701-707.
29. Corwin JT, et al. Fish n' chicks: model recipes for hair cell regeneration? *Neuron* 1997;19:951-954.
30. Kelley MW, et al. Exposing the roots of hair cell regeneration in the ear. *Nat Med* 2003;9:1257-1259.
31. Zine A, et al. Molecular mechanisms that regulate auditory hair cell differentiation in the mammalian cochlea. *Mol Neurobiol* 2003;27:223-238.
32. Birmingham-McDonogh O, et al. Hair cell regeneration: winging our way towards a sound future. *Curr Opin Neurobiol*. 13, 119-126.
33. Bryant J, et al. Sensory organ development in the inner ear:molecular and cellular mechanisms. *Br Med Bull* 2002;63:39-57.
34. Lang H, et al. Cell proliferation and cell death in the developing chick inner ear:spatial and temporal patterns. *J Comp Neurol* 2000;417:205-220.
35. Li H, et al. Correlation of Pax-2 expression with cell proliferation in the developing chicken inner ear. *J Neurobiol*. 2004; 10.1002/neu.20013 (www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/jhome/31737).
36. Hutson MR, et al. Expression of Pax-2 and patterning of the chick inner ear. *J Neurocytol* 1999;28:795-807.
37. Lawoko-Kerali G, et al. Expression of the transcription factors GATA3 and Pax2 during development of the mammalian inner ear. *J Comp Neurol* 2002;442:378-391.
38. Morsli H, et al. Otx1 and Otx2 activities are required for the normal development of the mouse inner ear. *Development* 1999;126:2335-2343.
39. Oh SH, et al. Differential expression of bone morphogenetic proteins in the developing vestibular and auditory sensory organs. *J Neurosci* 1996;16:6463-6475.
40. Lowenheim H, et al. Gene disruption of p27Kip1 allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of Corti. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4084-4088.
41. Chen P, Seguil N. p27Kip1 links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development* 1999;126:1581-1590.
42. Morrison A, et al. Expression of Delta1 and Serrate1 (Jagged1) in the mouse inner ear. *Mech Dev* 1999;84:169-172.
43. Lanford PJ, et al. Notch signaling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet* 1999;21:289-292.
44. Rybak LP, Kelly T. Ototoxicity: bioprotective mechanisms. *Cur Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;11:328-333.
45. Lefebvre PP, et al. Mechanisms of cell death in the injured auditory system: otoprotective strategies. *Audiol Neurotol* 2002;7:165-170.
46. Schmiedt RA, et al. Ouabain application to the round window of the gerbil cochlea: a model of auditory neuropathy and apoptosis. *J Assoc Res Otolaryngol* 2002;3:223-233.
47. Clark GM. Electrical stimulation of the auditory nerve: the coding of frequency, the perception of pitch and the development of cochlear implant speech processing strategies for profoundly deaf people. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996;23:766-776.
48. Kawamoto K, et al. Math 1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. *J Neurosci* 2003;23:4395-4400.
49. Zheng JL and Gao WQ. Overexpression of Math1 induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nat Neurosci* 2000;3:580-586.
50. Shou J, et al. Robust generation of new hair cells in the mature mammalian inner ear by adenoviral expression of Math1. *Mol Cell Neurosci* 2003;23:169-179.
51. Verhoeven K, et al. Mutations in the human a-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet* 1998;19:60-62.
52. Legan PK, et al. A targeted deletion in a-tectorin reveals that the tectorial membrane is required for the gain and timing of cochlear feedback. *Neuron* 2000;28:273-285.

53. Ryan EA, et al. Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 2002;51:2148-2157.
54. Deacon T, et al. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat Med* 1997;3:350-353.
55. Edge AS, et al. Xenogeneic cell therapy: current progress and future developments in porcine cell transplantation. *Cell Transplant* 1998;7:525-539.
56. Donnelly CE, et al. Human natural killer cells account for non-MHC class I-restricted cytolysis of porcine cells. *Cell Immunol* 1997;175:171-178.
57. Hochedlinger K and Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Eng J Med* 2003;349:275-286.
58. Ferguson TA, et al. Cell death and immune privilege. *Int Rev Immunol* 2002;21:153-172.
59. Hess D, et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 2003;21:763-770.
60. Mezey E, et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290:1779-1782.
61. Nayto Y, et al. Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport* 2004;15:1-4.
62. Pagani FD, et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Cell Cardiol* 2003;41:879-888.
63. Malgrange B, et al. Proliferative generation of mammalian auditory hair cells in culture. *Mech Dev* 2002;112:79-88.