

## INTRODUCTION

Hearing loss is the most common sensory deficit in the world, with both genetic and environmental factors causing dysfunction of the primary sensory cells of the inner ear, known as hair cells (1). Hair cells convert mechanical stimuli into electrical signals and are essential for normal auditory and balance functions. Unfortunately, hair cells lack the ability to regenerate; thus, hair cell damage or death is cumulative, causing progressive hearing loss. The current standards of care for hearing loss are hearing aids or cochlear implants, which provide incomplete restoration of function in a limited patient population. Pharmacologic, stem cell, and gene therapies are being explored as alternative therapies (1). Of these possible strategies, gene therapy may be best suited for restoration of hair cell function in genetic hearing loss (1–4). However, few studies have provided proof-of-principle evidence supporting gene therapy as a viable strategy for restoration of auditory function in mouse models of genetic hearing loss. One notable exception is the restoration of auditory function in mice lacking vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3), a glutamate transport protein expressed in auditory inner hair cells (IHCs), required for synaptic transmission from IHC to postsynaptic neurons of the 8th cranial nerve (5). The authors of that study used adeno-associated viral (AAV) vectors to deliver the coding sequence for VGLUT3 into IHCs of early postnatal *Vglut3* knockout mice. Although an important advancement, VGLUT3 mutations are not common in humans and, when present, are dominant, suggesting that the clinical utility of VGLUT3 augmentation may be limited.

To explore gene therapy for a common form of genetic hearing loss that affects hair cells, we used mice that carry mutations in transmembrane channel-like gene 1 (*Tmc1*). Mutations in human *TMC1* account for 4 to 8% of genetic deafness in some populations (6, 7). To date, 40 *TMC1* mutations have been identified that cause deafness in humans (8, 9). Most are recessive and cause prelingual deafness, whereas at least five are dominant and cause progressive hearing loss with onset during the mid-teen years (7), suggesting possible windows of opportunity for clinical intervention.

Although the precise molecular function of *TMC1* is unclear, there is agreement that *TMC1* and its closely related ortholog, *TMC2*, affect the permeation properties of sensory transduction channels in auditory hair cells (10–12) and are likely channel components (11). Mice deficient in *Tmc1* and *Tmc2* lack sensory transduction, are deaf, and suffer severe balance

## INTRODUCCIÓN

La pérdida de audición es el déficit sensorial más común en el mundo, debido tanto a factores genéticos como ambientales que provocan el fallo de las células sensoriales primarias del oído interno, conocidas como [células ciliadas](#) (1). Las células ciliadas convierten los estímulos mecánicos en señales eléctricas y son esenciales para las funciones auditivas y de equilibrio normales. Desafortunadamente, las células ciliadas carecen de la capacidad de regenerarse; por lo tanto, su daño celular o muerte es acumulativo, causando una pérdida progresiva de la audición. Los protocolos actuales para la pérdida de audición son los audífonos o implantes cocleares, que proporcionan una recuperación incompleta de la función en una población limitada de pacientes. Se están explorando terapias farmacológicas, el uso de células madre y terapias génicas como terapias alternativas (1). De estas posibles estrategias, la terapia génica puede ser la más adecuada para la recuperación de la función de las células ciliadas en la pérdida auditiva genética (1-4). Sin embargo, pocos estudios han aportado una prueba preliminar de eficacia que apoye la terapia génica como una estrategia viable para la recuperación de la función auditiva en modelos de ratón con pérdida de audición genética. Una excepción notable es la recuperación de la función auditiva en los ratones que carecen del transportador de glutamato vesicular 3 (VGLUT3), una proteína de transporte de glutamato que se expresa en las células ciliadas del oído interno ([IHCs](#)), necesarias para la transmisión sináptica desde las IHC a las neuronas postsinápticas del [octavo par craneal](#) (5). Los autores de ese estudio utilizaron [vectores virales adenoasociados](#) (AAV) para insertar la secuencia codificante para VGLUT3 en las IHC de ratones en los que se ha silenciado el gen *Vglut3* después de su nacimiento ([ratones knockout](#)). Aunque es un avance importante, las mutaciones VGLUT3 no son comunes en los seres humanos y, cuando están presentes, son dominantes, lo que sugiere que la utilidad clínica del [incremento de la expresión del gen](#)<sup>1</sup> VGLUT3 puede ser limitada.

Para explorar una terapia génica para una forma común de pérdida genética auditiva que afecta a las células ciliadas, hemos utilizado ratones que portan mutaciones en el gen coclear de la transmembrana 1 ([Tmc1](#)). Las mutaciones humanas en *TMC1* dan cuenta del 4 al 8% de los casos de sordera genética en algunas poblaciones (6, 7). Hasta la fecha, se han identificado 40 mutaciones en *TMC1* que causan sordera en humanos (8, 9). La mayoría son recesivas y provocan [sordera prelocutiva](#), mientras que al menos cinco son dominantes y causan

<sup>1</sup> *Augmentation* = incremento de la expresión.

<p>dysfunction despite the presence of normal hair cell morphology (10) and hair cells that survive into mature stages (13). Mice that carry the <i>Beethoven</i> (<i>Bth</i>) (14) point mutation p.M412K in <i>TMC1</i> retain sensory transduction but have reduced calcium permeability (11). <i>Beethoven</i> mice are an excellent model for dominant-progressive hearing loss (DFNA36) in humans who carry an identical substitution in the orthologous position (p.M418K) of the human <i>TMC1</i> gene (15). Mice that carry <i>Tmc1</i> deletions (10) are good models for recessive hearing loss (DFNB7/11) in humans with loss-of-function mutations in <i>TMC1</i>.</p> <p>Previously, adenoviral vectors were used in vitro to introduce the coding sequence for <i>Tmc1</i> or <i>Tmc2</i> into hair cells excised from mice deficient in <i>Tmc1</i> and <i>Tmc2</i> (10). These experiments demonstrated partial restoration of sensory transduction in cultured hair cells in vitro. To extend these studies to an in vivo setting and to develop gene therapy strategies to treat genetic deafness in humans, we designed AAV vectors that carried the coding sequence for <i>Tmc1</i> or <i>Tmc2</i> and injected them in the ears of <i>Tmc1</i> mutant mice. Here, we demonstrate that <i>Tmc1</i> and <i>Tmc2</i> are functionally redundant, and that either gene can restore sensory transduction and partial auditory function in vivo in mice that carry recessive <i>Tmc1</i> mutations. In addition, we used <i>Tmc2</i> gene therapy to preserve auditory function and hair cell survival in mice that carried dominant <i>Bth</i> mutations in <i>Tmc1</i>. Our results support continued development of gene therapy strategies for hearing restoration in humans with genetic deafness.</p>	<p>una pérdida de audición progresiva que se inicia durante los años de la adolescencia (7), lo que sugiere posibles ventanas de oportunidad para la intervención clínica. Aunque la función molecular precisa de <i>TMC1</i> no está clara, hay consenso en que <i>TMC1</i> y su <a href="#">ortólogo</a> estrechamente relacionado, <a href="#">TMC2</a>, afectan a las propiedades de permeabilidad de los canales de transducción sensorial en las células ciliadas auditivas (10-12) y es probable que sean parte de los canales (11). Los ratones deficientes en <i>Tmc1</i> y <i>Tmc2</i> carecen de transducción sensorial, son sordos, y sufren graves disfunciones en el equilibrio a pesar de la presencia de una morfología normal de las células ciliadas (10) y en las células ciliadas que sobreviven en etapas maduras (13). Los ratones que presentan el punto de mutación <i>Beethoven</i> (<i>Bth</i>) (14) p.M412K en <i>TMC1</i> retienen la transducción sensorial, pero ven reducida la permeabilidad del calcio (11). Los ratones <i>Beethoven</i> son un modelo excelente para la pérdida de audición dominante progresiva (<a href="#">DFNA36</a>) en los seres humanos que presentan una sustitución idéntica en la posición ortóloga (p.M418K) del gen <i>TMC1</i> humano (15). Los ratones que portan delecciones en <i>Tmc1</i> (10) son buenos modelos para la pérdida auditiva recesiva (<a href="#">DFNB7/11</a>) en los seres humanos con mutaciones de pérdida de función de <i>TMC1</i>.</p> <p>Anteriormente se han usado vectores adenovirales in vitro para introducir la secuencia de codificación para <i>Tmc1</i> o <i>Tmc2</i> en células ciliadas extirpadas de ratones deficientes en <i>Tmc1</i> y <i>Tmc2</i> (10). Estos experimentos demostraron una recuperación parcial de la transducción sensorial en las células ciliadas cultivadas in vitro. Para ampliar estos estudios a un entorno in vivo y desarrollar estrategias de terapia génica para tratar la sordera genética en los seres humanos, hemos diseñado vectores AAV que introducen la secuencia codificante para <i>Tmc1</i> o <i>Tmc2</i> y los hemos inyectado en los oídos de los ratones mutantes <i>Tmc1</i>. Aquí, demostramos que <i>Tmc1</i> y <i>Tmc2</i> son funcionalmente redundantes, y que cualquiera de los genes puede recuperar la transducción sensorial y la función auditiva parcial in vivo en ratones que portan mutaciones <i>Tmc1</i> recesivas. Además, hemos utilizado la terapia génica <i>Tmc2</i> para mantener la función auditiva y la supervivencia de las células ciliadas en ratones que portaban mutaciones <i>Bth</i> dominantes en <i>Tmc1</i>. Nuestros resultados apoyan el desarrollo continuo de estrategias de terapia génica para la recuperación de la audición en humanos con sordera genética.</p>

## DISCUSSION

To model gene therapy for DFNB7/11, we used mice deficient in *Tmc1* and engineered AAV2/1 vectors that carried the *Cba* promoter and the coding sequence for either *Tmc1* or *Tmc2*. Viral transduction with either AAV2/1-*Cba-Tmc1* or AAV2/1-*Cba-Tmc2* revealed localization of exogenous TMC1 and TMC2 at the tips of hair cell stereocilia, uptake of the transduction channel permeable dye FM1-43, and robust mechanosensory transduction currents in otherwise nonfunctional hair cells. The data provide compelling evidence that the vectors can restore function at the cellular level in vitro. In vivo injection, via the RWM, of either AAV2/1-*Cmv-eGFP* or AAV2/1-*Cba-eGFP* drove robust expression of eGFP in cochlear and vestibular hair cells, suggesting that the approach may be viable for the delivery of therapeutic reagents to target hair cells throughout the human inner ear. Normal mechanosensory responses and normal ABRs suggested that the injection technique, AAV2/1 vectors, and eGFP expression are safe for in vivo use, supporting further development of AAV gene therapy as a strategy for hearing restoration. Consistent with previous observations (5), when AAV2/1 vectors were injected via the RWM into the inner ears of deaf mice, restoration of cellular function was limited to IHCs. We found little evidence of exogenous gene expression in OHCs after injection of four different vectors. Because all vectors were capable of driving exogenous gene expression in OHCs in vitro, we suspect that the lack of viral transduction in OHCs in vivo resulted from limited viral access to the hair cell apical surface via RWM injection into perilymphatic spaces. Kilpatrick et al. (19) reported that introduction of AAV vectors into the scala media, which bathes hair cell apical membranes, yielded GFP expression in both IHCs and OHCs. The challenge of scala media injection is that it requires a more invasive surgical approach and can cause mixing of high  $K^+$  (~140 mM) endolymph and perilymph leading to hair cell depolarization and cell death. To target OHCs may require vectors that can enter via the basolateral membrane or delivery methods that target endolymphatic spaces without disrupting endolymph/perilymph barriers.

ABRs were recovered in >50% of *Tmc1*<sup>Δ/Δ</sup> deaf mice injected with AAV2/1-*Cba-Tmc1*, indicating successful transmission of auditory information from the cochlea to the auditory brainstem. The ABR thresholds were elevated relative to those of wildtype mice, indicating

## DISCUSIÓN

Para modelar la terapia génica para DFNB7/11, hemos utilizado ratones deficientes en *Tmc1* y diseñamos vectores AAV2/1 que introdujeran el promotor *Cba* y la secuencia codificante tanto para *Tmc1* como *Tmc2*. La [transducción](#) viral, ya sea con AAV2/1-*Cba-Tmc1* o AAV2/1-*Cba-Tmc2* reveló la localización de TMC1 y TMC2 exógenos en las puntas de los [estereocilios](#) de las células ciliadas, la captación del colorante FM1-43<sup>2</sup> del [canal de transducción](#) permeable, e intensas corrientes de transducción mecanosensorial en células ciliadas de otro modo no funcionales. Los datos proporcionan pruebas convincentes de que los vectores pueden restaurar la función a nivel celular in vitro.

Una inyección in vivo, a través de la [RWM](#)<sup>3</sup>, tanto de AAV2/1-*Cmv-eGFP* como AAV2/1-*Cba-eGFP* produjo una sólida [expresión de eGFP](#) en las células ciliadas cocleares y vestibulares, lo que sugiere que el enfoque puede ser viable para la transferencia de reactivos terapéuticos para alcanzar las células ciliadas a través del oído interno humano. Las respuestas mecanosensoriales y de ABR normales sugieren que la técnica de inyección, los vectores AAV2/1, y la expresión de eGFP son seguros para su uso in vivo, justificando un mayor desarrollo de la terapia génica AAV como una estrategia para la recuperación de la audición. De acuerdo con las observaciones anteriores (5), cuando los vectores AAV2/1 se inyectan a través de la RWM en el oído interno de ratones sordos, la recuperación de la función celular se limitó a las [IHCs](#). Encontramos poca evidencia de la expresión de genes exógenos en las [OHCs](#) después de la inyección de cuatro vectores diferentes. Debido a que todos los vectores eran capaces de impulsar la expresión del gen exógeno en las OHCs in vitro, sospechamos que la falta de transducción viral en las OHCs in vivo tiene que ver con un acceso viral limitado a la superficie apical de las células ciliadas mediante una inyección a través de la RWM en el [espacio perilinfático](#). Kilpatrick et al. (19) informaron de que la introducción de vectores AAV en la rampa media [o conducto coclear<sup>4</sup>], que baña las membranas apicales de las células ciliares, produjo la expresión de GFP tanto en las IHC como en las OHC. El reto de la inyección en la rampa media es que requiere un enfoque quirúrgico más invasivo y puede causar una mezcla alta de iones de potasio (~ 140 mM) de la endolinfa y perilinfa que conduce a la despolarización de las células ciliadas y a la muerte celular. Para alcanzar las OHCs se necesitan

<sup>2</sup> FM1-43 = molécula anfotérica capaz de incorporarse a la bicapa lipídica de las membranas biológicas sin llegar a difundirse a través de ellas, cualidad que le permite teñir exclusivamente la membrana externa de las células intactas.

<sup>3</sup> *Round window membrane* – membrana de la ventana redonda.

<sup>4</sup> El conducto coclear o rampa media termina como fondo de saco en el vértice del caracol; en su interior, lleno de endolinfa, residen los [órganos de Corti](#), encargados de captar las vibraciones sonoras y transformarlas en impulsos nerviosos.

incomplete recovery of auditory function. DPOAE responses did not recover, suggesting that the elevated ABR thresholds were due to lack of recovery of OHC function, in turn due to low viral transduction rates in OHCs. Functional OHCs are required for cochlear amplification, a process that provides mechanical feedback to the cochlea by increasing gain to soft sounds. OHC dysfunction is known to yield elevated ABR thresholds, shifted up to 60 dB higher than wild type. Thus, in *Tmc1*<sup>Δ/Δ</sup> mice, in which all cochlear hair cells lack sensory transduction, rescue of IHC but not OHC function yielded ABR thresholds ~60 dB higher than wild type, similar to thresholds in mice with OHC dysfunction (24). In *Vglut3* knockout mice, OHCs remain functional but the mice are deaf because of IHC dysfunction (5). After *Vglut3* gene augmentation, ABR thresholds recovered to near wild-type levels because restoration of function was only required in IHCs, which account for ~25% of the cochlear hair cell population. Our experiments revealed high viral transduction rates in IHCs and the transduced cells had mechanosensory currents equivalent to those of wild type, but the OHC dysfunction remained. Although the recovery was incomplete, the result was considered a success because normal mechanosensory function in IHCs is a prerequisite for auditory function. Had the outcome been the converse—restoration of OHC but not IHC function—the animals would still be deaf. We also found that AAV2/1-*Cba-Tmc2* vectors were capable of restoring sensory transduction and partial ABR responses in *Tmc1*<sup>Δ/Δ</sup> mice, which supports the hypothesis that *Tmc1* and *Tmc2* perform somewhat redundant functions and can substitute for each other, at least in IHCs. The AAV2/1-*Cba-Tmc2* transduction pattern was similar to AAV2/1-*Cba-Tmc1* and was restricted primarily to IHCs, resulting in similar recovery at elevated ABR thresholds. That hair cell survival rates were not altered in *Tmc1*<sup>Δ/Δ</sup> mice injected with either AAV2/1-*Cba-Tmc1* or AAV2/1-*Cba-Tmc2* was important for two reasons: (i) neither vector caused loss or decay of hair cells, and (ii) hair cells remained in uninjected *Tmc1*<sup>Δ/Δ</sup> mice up to P60, suggesting that there may be a window of opportunity for therapeutic intervention. Whether a similar window exists in humans with recessive *TMC1* mutations is unknown. If patients with *TMC1* mutations retain viable hair cells, they may present an opportunity for clinical intervention. Restoration of auditory function was limited in *Bth* mice injected with AAV2/1-*Cba-Tmc2*. There was significant preservation of IHCs in AAV2/1-*Cba-Tmc2*-injected *Bth*

vectores que entren a través de la membrana basolateral o métodos de transferencia que se dirijan a los espacios endolinfáticos sin interrumpir las barreras endolinfa/perilinfia.

Se recuperaron las **ABRs**<sup>5</sup> en >50% de los ratones *Tmc1* sordos inyectados con AAV21-*Cba-Tmc1*, lo que indica una transmisión satisfactoria de la información auditiva desde la cóclea hasta el tronco encefálico auditivo. Los **umbrales** de audición de la ABR se elevaron en relación con los de los ratones de tipo silvestre, lo que indica una recuperación incompleta de la función auditiva. Las respuestas **DPOAE**<sup>6</sup> no se recuperaron, lo que sugiere que los umbrales elevados de la ABR se debieron a la falta de recuperación de la función de las OHC, a su vez, debido a las bajas tasas de transducción viral en las OHC. Se requieren OHCs funcionales para la amplificación coclear, un proceso que proporciona una realimentación mecánica a la cóclea mediante el aumento de ganancia para los sonidos bajos. Se sabe que la disfunción de las OHC produce umbrales elevados de ABR, desplazándose hasta 60 dB más altos que en los ratones de tipo silvestre. Por lo tanto, en ratones *Tmc1*, en el que todas las células ciliadas cocleares carecen de la transducción sensorial, el rescate de las IHC pero no la función de las OHC produjo umbrales ABR de ~60 dB más que el tipo silvestre, similar a los umbrales en ratones con disfunción en las OHC (24). En ratones knockout *Vglut3*, las OHCs permanecen funcionales, pero los ratones son sordos a causa de la disfunción de las IHC (5). Después del incremento de la expresión del gen *Vglut3*, se recuperaron los umbrales ABR cerca de los niveles de tipo silvestre porque sólo se requería la recuperación de la función en las IHC, que representan ~25% de la población de células ciliadas cocleares. Nuestros experimentos revelaron altas tasas de transducción viral en las IHC y las células transducidas presentaron corrientes mecanosensoriales equivalentes a las de tipo silvestre, pero la disfunción de las OHC se mantuvo. Aunque la recuperación fue incompleta, el resultado se consideró un éxito porque la función mecanosensorial normal en las IHC es un requisito previo para la función auditiva. Si el resultado hubiera sido a la inversa —recuperación de las OHC pero no la función de las IHC— los animales seguirían siendo sordos.

También hemos descubierto que los vectores de AAV2/1-*Cba-Tmc2* eran capaces de recuperar la transducción sensorial y las respuestas parciales ABR en ratones *Tmc1*<sup>Δ/Δ</sup>, lo que apoya la hipótesis de que *Tmc1* y *Tmc2* realizan funciones en cierto modo redundantes y

<sup>5</sup> Auditory brainstem responses = respuesta auditiva provocada del tronco encefálico (BAER).

<sup>6</sup> Distortion product otoacoustic emissions = emisiones otoacústicas por productos de distorsión.

mice. The mechanism that promoted IHC survival is unknown. On the basis of the measurements of sensory transduction and calcium permeability in mice that expressed wild-type *Tmc2*, *Tmc1*, or *Tmc1-Bth*, Pan et al. (11) found a significant reduction in calcium entry in *Tmc1-Bth* IHCs, whereas *Tmc2* cells had high calcium entry. We hypothesize that appropriate levels of calcium entry are required for maintenance and survival of IHCs. Therefore, by introducing exogenous *Tmc2*, calcium homeostasis was restored, which enhanced hair cell survival in the *Bth* mice injected with AAV2/1-*Cba-Tmc2*. As a final test of auditory function, we measured acoustic startle reflexes in *Tmc1* mutant mice. The otherwise unresponsive *Tmc1<sup>Δ/Δ</sup>* mice recovered startle responses after injection of AAV2/1-*Cba-Tmc1*, and the responses persisted for up to 60 days, the latest time point tested. It was unclear why *Tmc1-Bth* mice injected with AAV2/1-*Cba-Tmc2* recovered partial ABR function but did not recover startle responses. The extent of the ABR recovery in *Tmc1-Bth* mice injected with AAV2/1-*Cba-Tmc2* was less than the ABR recovery in *Tmc1<sup>Δ/Δ</sup>* mice injected with AAV2/1-*Cba-Tmc2*, suggesting that there may be a minimal threshold required to drive behavioral responses to loud sounds. Therapies aimed at restoration of auditory function for dominant DFNA36 deafness may require development of alternate strategies, perhaps by suppression of the dominant allele.

In conclusion, the data provide compelling proof-of-principle evidence demonstrating that gene augmentation in a mouse model of DFNB7/11 is effective in restoring cellular function in vitro in both IHCs and OHCs, restoring IHC function in vivo, partial recovery of systems level function in vivo, and recovery of acoustic startle reflexes at the behavioral level. Recovery of ABR and startle responses was likely a direct result of recovery of IHC sensory transduction at the cellular level and suggests that *Tmc1* reexpression can restore auditory function at every level. Thirty-five *TMC1* mutations have been identified that cause recessive prelingual deafness in humans, which underscores the significance of *TMC1* for normal auditory function and the need for therapeutic reagents to remedy the disorder. Although our gene therapy strategy is not yet ready for clinical application, the challenges that remain are not insurmountable. Continued development of *Tmc* gene therapy will need to provide characterization of the long-term expression pattern of the exogenous constructs, including their ability to maintain recovery; improved design of vectors, promoters, and delivery techniques that drive exogenous gene expression in OHCs; and further evaluation of the therapeutic window of opportunity in

que se puede sustituir uno por el otro, al menos en las IHC. El patrón de transducción de AAV2/1-*Cba-Tmc2* fue similar al AAV2/1-*Cba-Tmc1* y se limitó principalmente a las IHC, lo que resulta en una recuperación similar de los umbrales elevados de la ABR. El que las tasas de supervivencia de las células ciliadas no se alteraran en ratones *Tmc1<sup>Δ/Δ</sup>* inyectados tanto con AAV2/1-*Cba-Tmc1* como con AAV2/1-*Cba-Tmc2* es importante por dos razones: (i) el vector no causó la pérdida o deterioro de las células ciliadas, y (ii) las células ciliadas de ratones *Tmc1<sup>Δ/Δ</sup>* no inyectados se mantuvieron hasta P60, lo que sugiere que puede haber una ventana de oportunidad para una intervención terapéutica. Se desconoce que exista una ventana similar en seres humanos con mutaciones recesivas *TMC1*. Si los pacientes con mutaciones *TMC1* conservan las células ciliadas viables, pueden presentar una oportunidad para la intervención clínica.

La recuperación de la función auditiva fue limitada en ratones *Bth* inyectados con AAV2/1-*Cba-Tmc2*. Hubo una conservación significativa de las IHC en ratones *Bth* inyectados con AAV2 /1-*Cba-Tmc2*. El mecanismo que promueve la supervivencia de las IHC se desconoce. Sobre la base de mediciones de la transducción sensorial y de la permeabilidad de calcio en ratones que expresaron de forma silvestre los genes *Tmc2*, *Tmc1*, o *Tmc1-Bth*, Pan et al. (11) descubrieron una reducción significativa de la entrada de calcio en las IHC *Tmc1-Bth*, mientras que las células *Tmc2* presentaron una entrada alta de calcio. Nuestra hipótesis es que se requieren niveles adecuados de entrada de calcio para el mantenimiento y la supervivencia de las IHC. Así, con la introducción exógena de *Tmc2*, se recuperó la homeostasis del calcio, lo que ha mejorado la supervivencia de las células ciliadas en ratones *Bth* inyectados con AAV2/1-*Cba-Tmc2*.

Como prueba final de la función auditiva, medimos los [reflejos de sobresalto](#) en ratones mutantes *Tmc1*. Los ratones *Tmc1<sup>Δ/Δ</sup>* que de otro lado no respondían recuperaron las respuestas de sobresalto después de la inyección de AAV2/1-*Cba-Tmc1*, y estas respuestas persistieron hasta 60 días, el último momento que se probó. No queda claro por qué los ratones *Tmc1-Bth* inyectados con AAV2/1-*Cba-Tmc2* recuperaron de forma parcial la función de la ABR, pero no recuperaron las respuestas de sobresalto. El alcance de la recuperación de la ABR en ratones *Tmc1-Bth* inyectados con AAV2/1-*Cba-Tmc2* fue menor que la recuperación de la ABR en ratones *Tmc1<sup>Δ/Δ</sup>* inyectados con AAV2/1-*Cba-Tmc2*, lo que sugiere que puede haber un umbral mínimo necesario para impulsar respuestas de comportamiento a sonidos fuertes. Las terapias dirigidas a la recuperación de la función auditiva en la sordera

humans with recessive *TMC1* mutations. Finally, we suggest that AAV-mediated gene augmentation in the inner ear may be a model that could be expanded to address some of the more than 70 forms of genetic deafness.

genética dominante DFNA36 pueden requerir el desarrollo de estrategias alternativas, quizás mediante la supresión del alelo dominante. En conclusión, los datos proporcionan una convincente prueba preliminar de eficacia que demuestra que el aumento de la expresión genética en un modelo murino de DFNB7/11 es eficaz en la recuperación de la función celular in vitro tanto en las IHC como en las OHC, la recuperación de la función de las IHC in vivo, la recuperación parcial de los niveles de función de los sistemas in vivo, y la recuperación de los reflejos de sobresalto acústicos a nivel de comportamiento. La recuperación de la ABR y las respuestas al sobresalto probablemente fue un resultado directo de la recuperación de la transducción sensorial de las IHC a nivel celular y sugiere que la reexpresión de *Tmc1* puede restaurar la función auditiva en todos los niveles. Se han identificado treinta y cinco mutaciones *TMC1* que causan una sordera prelocutiva recesiva en los seres humanos, lo que subraya la importancia de *TMC1* para la función auditiva normal y la necesidad de reactivos terapéuticos para remediar el trastorno. Aunque nuestra estrategia de terapia génica no está lista aún para su aplicación clínica, los retos que quedan no son insuperables. El desarrollo continuo de la terapia génica *Tmc* tendrá que proporcionar la caracterización del patrón de expresión a largo plazo de los constructos exógenos, incluyendo su capacidad para mantener la recuperación; la mejora del diseño de los vectores, promotores, y las técnicas de transferencia que conducen a la expresión del gen exógeno en las OHCs; y una nueva evaluación de la ventana terapéutica de oportunidades en los seres humanos con mutaciones recesivas en *TMC1*. Por último, sugerimos que el incremento de la expresión génica a través del AAV en el oído interno puede ser un modelo que podría ampliarse para hacer frente a algunas de las más de 70 formas de sordera genética.