

Regeneración de las células ciliadas auditivas: Un tratamiento potencial para los problemas de oído en el horizonte

Rebecca M. Lewis, Edwin W. Rubel, Jennifer S. Stone
Departamento de Otorrinolaringología / Cirugía de cabeza y cuello
Virginia Merrill Bloedel, Hearing Research Center,
Universidad de Washington, Seattle, Washington, Estados Unidos de América
becky103@uw.edu, rubel@uw.edu, stoner@uw.edu

ABSTRACT

Hearing requires good health of the hair cells to ensure that the sound is detected and processed correctly. They degenerate and die due to age or exposition to high intensity sound, among other causes, and usually they do not regenerate. Some research results about possible regeneration of cochlear hair cells that suggest the possibility of treatment for hearing impairment due to this disease are presented in this paper..

KEYWORDS

Cochlea, Organ of Corti, regeneration, hair cells.

RESUMEN

La audición requiere de la buena salud de las células ciliadas (vello) para garantizar que el sonido se detecte y procese correctamente. Éstas se degeneran y mueren con la edad o por la exposición a sonido intenso, entre otras causas, y normalmente no se regeneran. Se presentan algunos resultados de la investigación sobre la posible regeneración de las células ciliadas cocleares que sugieren que existe la posibilidad de un tratamiento para la discapacidad auditiva debida a esta enfermedad.

PALABRAS CLAVE

Cóclea, órgano de Corti, regeneración, células ciliadas.

INTRODUCCIÓN

El proceso de oír implica una compleja cadena de eventos, y cada uno de ellos es importante para garantizar la detección y procesamiento adecuado de los sonidos. En el primer paso, las ondas sonoras que viajan a través del ambiente entran en el canal auditivo y hacen vibrar el tímpano. Esta energía se transmite a través de los tres huesos del oído medio al oído interno. Dentro del oído interno, la energía derivada de las ondas sonoras se transmite a la membrana basilar de la cóclea (caracol), en la que se encuentra el órgano sensorial para la audición, el órgano de Corti (figuras 1 y 2a).

“Regeneration of auditory hair cells: A potential treatment for hearing loss on the horizon-rebeca-m-lewis/ Vol. 12, Summer 2016, pp. 40-47”.
<https://acousticstoday.org/regeneration-of-auditory-hair-cells-a-potential-treatment-for-hearing-loss-on-the-horizon-rebeca-m-lewis/>
Reproduced with permission from Acoustics Today (www.acousticstoday.org). Copyright 2016, Acoustical Society of America.

Traducción al español con la colaboración de Leonardo Treviño Arrambide y Daniela Alejandra Gutiérrez Dimas.

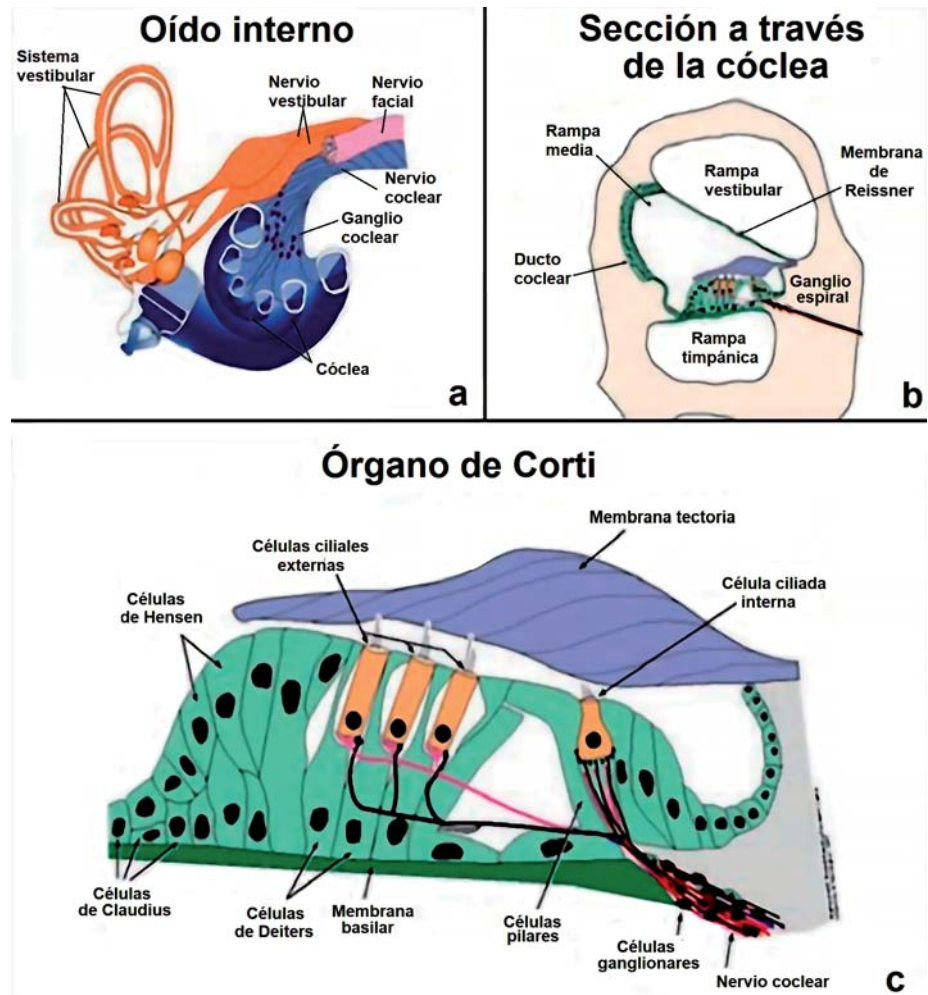


Fig. 1. Esquemas de las principales estructuras de los tejidos del oído interno a), un corte a través de una vuelta de la cóclea b) y el órgano de Corti c). Tenga en cuenta que en el órgano de Corti una sola célula ciliar interna y tres células ciliadas exteriores se muestran junto con las células de soporte. Este patrón se repite unas 3,000 veces a lo largo de la cóclea espiral en humanos.

El órgano de Corti se compone de células ciliadas sensoriales (vello sensoriales), así como un grupo de células especializadas, llamadas colectivamente células de apoyo, y los procesos periféricos de las neuronas auditivas. Las células ciliadas son receptores sensoriales. En respuesta a las señales mecánicas derivadas de las ondas sonoras, las células ciliadas convierten esa energía a señales eléctricas que se transmiten al cerebro a través del nervio auditivo. En el oído humano normal, hay alrededor de 3,000 células ciliadas internas y 12,000 células ciliadas externas.¹ Las células ciliadas internas (figura 2b) son los verdaderos receptores sensoriales. En la estimulación, las células ciliadas internas activan las fibras nerviosas auditivas que a su vez activan los núcleos cerebrales auditivos. La función principal de las células ciliadas exteriores (figura 2c) es modular la función del órgano de Corti mejorando el procesamiento de señales auditivas de baja intensidad. Estos dos tipos de células ciliadas trabajan juntas de tal manera que el nervio auditivo transmite al cerebro información altamente selectiva sobre

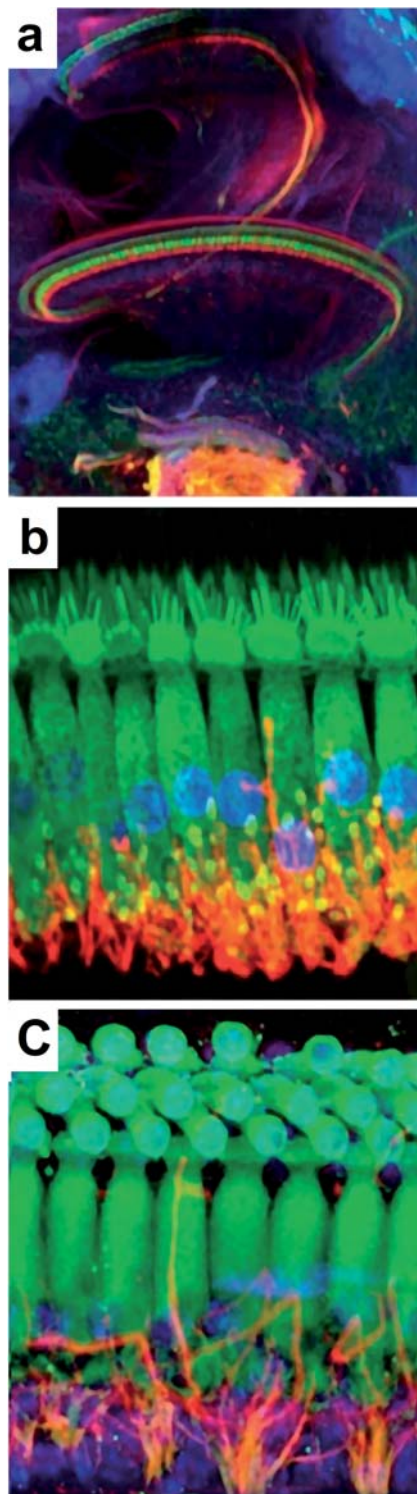


Fig. 2. a) Cóclea de mamífero con células ciliadas (verde), nervios (rojo) y neuronas ganglionares espirales (amarillo/naranja). b) Células ciliadas internas y estereocilios (verdes), con núcleos (azules) y fibras nerviosas de neuronas que transmiten información al cerebro (rojo);². c) Parte superior de las tres filas de células ciliadas exteriores (puntos verdes en la parte superior) y la fila tubular única de células ciliadas internas inervadas por el proceso neural (rojo/ naranja).

la frecuencia, el momento y la intensidad de los sonidos. Las células de soporte son células no sensoriales vecinas que aíslan a las células ciliadas entre sí. Estas células no sensoriales trabajan con las estructuras circundantes para proporcionar apoyo físico y molecular a este elaborado epitelio sensorial.

La pérdida del oído puede ser el resultado de una falla de las señales acústicas para llegar al oído interno (pérdida auditiva conductiva) o del daño a cualquier parte del oído interno o las vías auditivas centrales en el cerebro (pérdida auditiva sensorineural (SNHL, *SensorNeural Hearing Loss* por sus siglas en inglés). La pérdida auditiva conductiva generalmente se trata por medios médicos o quirúrgicos. La forma más común de SNHL resulta de daño o disfunción de las células ciliadas en el órgano de Corti. Cuando las células ciliadas de la cóclea de los mamíferos mueren, no se regeneran; esta forma de SNHL es permanente (figura 3). Si la pérdida auditiva es moderada, los pacientes pueden estar sin auxiliares auditivos que amplifican los sonidos para mejorar la audición. Si es grave, los pacientes pueden recibir implantes cocleares para evitar las células ciliadas lesionadas y estimular directamente el nervio auditivo. Ninguna forma de tratamiento restaura la audición normal o aborda la causa de la pérdida auditiva por pérdida de células ciliadas.

Hace unos 30 años, el descubrimiento de que las células ciliadas se regeneran en las aves planteó la posibilidad de que algún día pudiéramos encontrar la manera

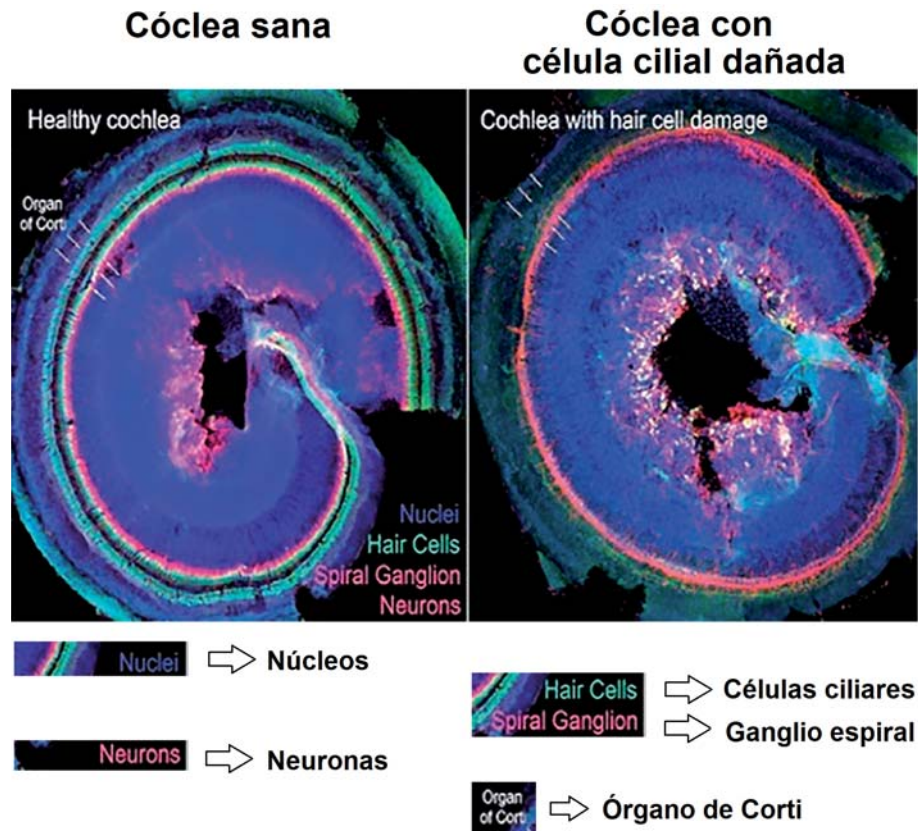


Fig. 3. Izquierda: Vista superficial de una cóclea sana con células pilosas (verde), procesos neurales (rojo) y núcleos (azul). Derecha: Una cóclea dañada que ya no contiene células ciliadas pero ha preservado los procesos neuronales y los núcleos. Flechas blancas: Límite del órgano de Corti.

de reemplazar las células ciliadas en los mamíferos, incluidos los humanos. Desde entonces, se han logrado muchos avances en nuestra comprensión de la regeneración de células ciliadas en aves, peces y mamíferos. Este artículo revisa el estado actual de la investigación en el campo de la regeneración de células ciliadas. Debido a las limitaciones de espacio, hemos eliminado todas las citas a excepción de las más esenciales. Para más detalles y citas relevantes, animamos a los lectores a examinar los muchos documentos de revisión relacionados con este campo.³⁻⁵

PROCESOS CELULARES DE DAÑO CELULAR Y REGENERACIÓN

El epitelio sensorial de la cóclea es una estructura citoarquitectónicamente elegante y delicada (figura 1). Las células ciliadas son dañadas comúnmente por una variedad de eventos ambientales, algunos de los cuales son conocidos, incluyendo la sobreestimulación acústica de ruido fuerte o prolongado o estímulos de conmoción cerebral. Varios tipos de medicamentos matan las células ciliadas cuando se administran en dosis altas o por períodos prolongados. Estos incluyen, pero no se limitan a, antibióticos aminoglicósidos como gentamicina y medicamentos anticancerosos de metales pesados como cisplatino. Las células ciliadas también mueren a medida que envejecemos; en la mayoría de los casos, esto se debe a causas desconocidas. Finalmente, existen mutaciones genéticas que hacen que las células ciliadas mueran durante el desarrollo embrionario o en etapas posteriores de la vida.

Hasta 1985, se creía que la regeneración de las células ciliadas del oído interno no era posible en los vertebrados. Sin embargo, al estudiar los procesos de daño de las células ciliadas en el epitelio auditivo de los pollos, los investigadores observaron una reaparición de células ciliadas en el área de daño. La morfología inmadura de estas células pareció similar a la de las células ciliadas embrionarias en la cóclea de los pollos.⁶⁻⁷ Durante este mismo período, también se descubrió que la regeneración de las células ciliadas se produce fácilmente en las porciones vestibulares del oído interno aviar.⁸ Pronto, los investigadores aprendieron que las células ciliadas del oído interno y el sistema de línea lateral de peces, ranas y salamandras también se regeneran fácilmente después de daño, lo que llevó a la conclusión de que la regeneración se produce en epitelias de células ciliadas de todos los vertebrados excepto mamíferos. Un análisis posterior reveló que las células de soporte que normalmente rodean a las células ciliadas son la fuente de estas células ciliadas de nueva diferenciación. Las células de soporte pueden dividirse mitóticamente para lograr la diferenciación de las células ciliadas o fenotípicamente convertirse a una célula pilosa en un proceso llamado transdiferenciación directa (figura 4).⁹⁻¹¹ Con estos dos métodos de sustitución de células ciliadas, los vertebrados que no son mamíferos proporcionan modelos valiosos para estudiar estos procesos y su capacidad para restaurar la audición después de SNHL sostenido.

En los mamíferos, la situación es bastante diferente. Cuando las células ciliadas mueren en el órgano de Corti de los mamíferos maduros, las células de soporte llenan los huecos donde se localizaban las células ciliadas para formar cicatrices permanentes, y no se forman nuevas células ciliadas. Además, las células de soporte no se dividen ni se convierten en células ciliadas después del daño.¹²⁻¹³

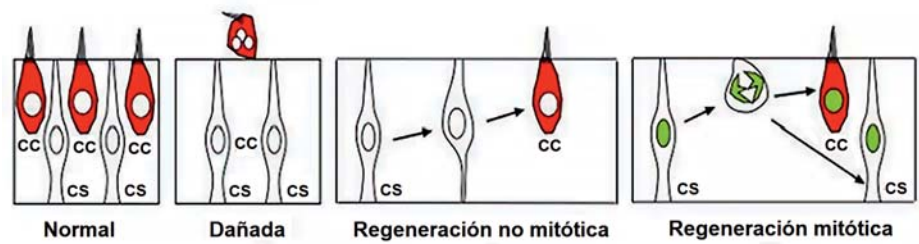


Fig. 4. El epitelio auditivo intacto del ave contiene células ciliadas (CC; rojo) interdigitadas con células de soporte (CS; blanco). En caso de daño, las células ciliadas se eliminan del epitelio y las células de apoyo se activan para regenerar las células ciliadas. La regeneración no mitótica permite a una célula de soporte cambiar su forma y perfil genético a la de una célula pilosa. La regeneración mitótica requiere una célula de soporte para dividir y diferenciar en dos células hijas, una célula pilosa y una célula de soporte.

A diferencia del órgano de Corti, los mamíferos adultos pueden reemplazar espontáneamente un pequeño número de células ciliadas en los órganos vestibulares del oído interno. Las nuevas células ciliadas están formadas en gran medida por la regeneración no mitótica.¹⁴⁻¹⁶ Parece haber un pequeño grado de división celular de apoyo desencadenado en respuesta a la pérdida de células ciliadas,¹⁷⁻¹⁸ pero ninguna célula recién formada se convierte en células ciliadas de reemplazo.¹⁹

El gran desafío que enfrentan los investigadores hoy en día es determinar por qué las células ciliadas no se regeneran fácilmente en los mamíferos. La regeneración podría fallar en la cóclea adulta porque el órgano auditivo pierde la población de células progenitoras capaces de formar nuevas células ciliadas durante el desarrollo. Alternativamente, las células con potencial para reemplazar las células ciliadas pueden existir en la cóclea, pero son incapaces de responder al daño debido a la inhibición activa o la falta de señales estimulantes.

ESTIMULANDO A LOS PROGENITORES NATIVOS A FORMAR NUEVAS CÉLULAS CILIADAS EN LA CÓCLEA ADULTA

Los investigadores han examinado si las células capaces de formar nuevas células ciliadas todavía existen en la cóclea de mamíferos maduros. Muchos tejidos de nuestro cuerpo experimentan una renovación continua. Una característica común de estos tejidos es que contienen células madre que se dividen y forman nuevas células especializadas a lo largo de la vida. Varias líneas de evidencia muestran que la cóclea y los órganos vestibulares poseen progenitores a las células ciliadas durante el desarrollo temprano, pero las pierden a medida que los órganos maduran.²⁰ Consecuentemente con esto, se pueden formar nuevas células ciliadas apoyando células del órgano de Corti de mamíferos neonatales,^{21, 22} pero no en mamíferos adultos, por ejemplo,^{12, 14}

Los investigadores están utilizando tres estrategias generales para identificar maneras de engañar a las células de apoyo en el oído interno mamífero maduro para regenerar las células ciliadas. Primero, estamos encontrando pistas en el desarrollo coclear. Las células ciliadas del órgano de Corti se forman durante el período embrionario a través de una serie compleja de pasos celulares controlados

por una cascada de interacciones moleculares. Algunos investigadores han postulado que, antes de que cualquier célula en la cóclea madura pueda formar una nueva célula capilar, tendrá que revivir estas mismas etapas de desarrollo.

Segundo, buscamos otros tejidos regenerativos. Muchos tejidos en el cuerpo son reemplazados continuamente bajo condiciones normales y/o después de daño, incluyendo células en la piel, intestino, y algunas regiones del cerebro. Creemos que muchas de las cascadas moleculares que conducen a la regeneración en estos otros tejidos podrían ser cooptadas para desencadenar la regeneración en la cóclea.

En tercer lugar, utilizando las nuevas herramientas de la genética molecular, podemos consultar directamente las cascadas moleculares que se activan en el epitelio sensorial de vertebrados no mamíferos que regeneran células ciliadas, como aves y peces. En la sección siguiente, describimos varios genes y vías de señalización que cumplieron uno o más de estos criterios y fueron evaluados por su capacidad para estimular la regeneración de células ciliadas en mamíferos. Estos análisis revelaron moléculas de señalización que son importantes para facilitar la regeneración.

Expresión forzada de Atoh1: Provocando que las células maduras de soporte se transdiferencien a células ciliadas

Un factor de transcripción proneural llamado *atonal homolog 1* (Atoh1) es un agente terapéutico potencial para promover la regeneración de células ciliadas. Atoh1 ayuda a dirigir la generación de proteínas específicas de las células ciliadas que les dan su identidad morfológica y fisiológica.²³ Cuando se elimina el gen que codifica Atoh1, no se forman células ciliadas en el órgano de Corti.²⁴ Por lo tanto, Atoh1 es un activador muy potente de las características de las células ciliadas y podría desencadenar células para transdiferenciarse en células ciliadas.

En los tejidos que regeneran las células ciliadas, la expresión de Atoh1 se activa en las células de soporte poco después del daño de las células ciliadas.²⁵⁻²⁷ En los órganos auditivos cultivados de pollos, la expresión forzada de Atoh1 influye en las células de apoyo para formar nuevas células ciliadas al promover la división y la transdiferenciación directa.²⁸ En roedores, la expresión forzada de Atoh1 por inyección viral en el órgano de Corti o regiones cercanas de ratones en desarrollo obliga a más células a diferenciarse como células ciliadas.^{29, 30} Estos hallazgos sugieren que la expresión anómala de Atoh1 podría ser suficiente para desencadenar células de soporte para transdiferenciarse en células ciliadas después de daño en la cóclea de mamíferos adultos. De hecho, algunos estudios sugieren que Atoh1 puede impulsar la producción de nuevas células ciliadas en los órganos auditivos³¹ y vestibulares,³² lo que podría resultar en pequeñas mejoras en la función auditiva y de equilibrio.

Sin embargo, los estudios recientes son menos alentadores. La expresión errónea de Atoh1 en células pilar y de Deiters, dos subtipos de células de soporte (figura 1), en la cóclea madura del ratón estimula las etapas tempranas de la transdiferenciación en células ciliadas, pero este proceso no se ha completado y muchas células “forzadas” mueren.³³ De hecho,³⁴ no observaron ninguna mejora significativa en la audición después de la expresión errónea de Atoh1 inducida viralmente en los órganos de Corti de los cobayas. Por lo tanto, un desafío actual

importante es determinar qué factores limitan la capacidad de Atoh1 para impulsar la regeneración de células ciliadas en la cóclea madura. Actualmente está en marcha un ensayo clínico en humanos que evalúa la capacidad de la infección viral de Atoh1 para mejorar la audición. Los resultados no están disponibles en este momento (año 2016).

Supresión de la señalización de Notch: ¿Puede mejorar los efectos proregenerativos de Atoh1?

Como se mencionó anteriormente, es evidente que, aunque Atoh1 en expresión anómala promueve de manera fiable células de apoyo y otras células alrededor del órgano de Corti para convertirse en células ciliadas en mamíferos neonatales, factores no identificados parecen obstaculizar los efectos de Atoh1 en el órgano maduro de Corti. Un sospechoso probable es que el factor señalando a través del receptor Notch.³⁵

Notch es un receptor en la superficie de las células que es activado por moléculas en las células adyacentes (figura 5). Notch tiene muchas funciones en una variedad de células, pero su papel más pertinente con respecto a la regeneración de células ciliadas es la inhibición de la formación de células ciliadas.

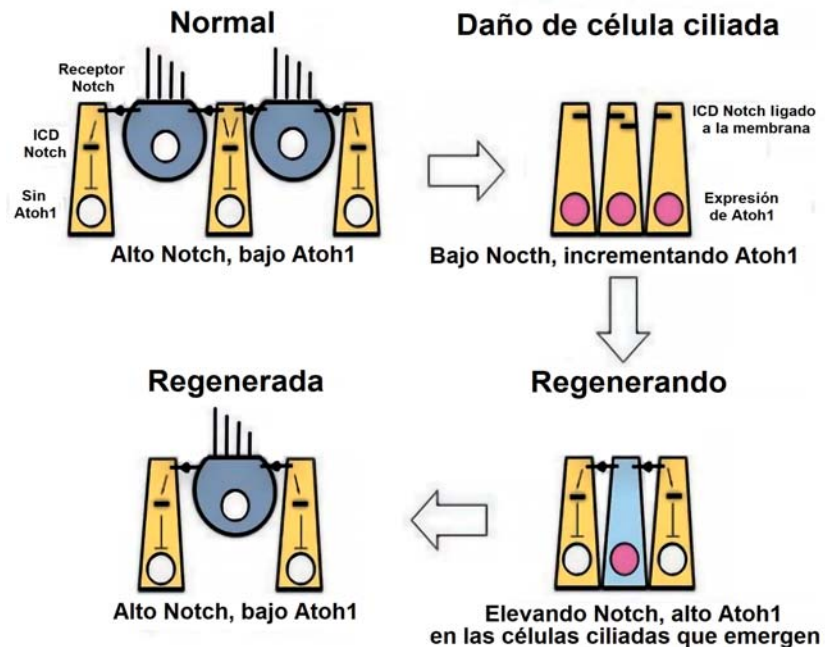


Fig. 5. Patrones de expresión del receptor Notch y el factor de transcripción de Atoh1 en células de soporte (amarillas) y células ciliadas (azules) bajo condiciones normales, dañadas y regeneradoras. En las células de apoyo en epitelias no dañadas, hay alta actividad del receptor de Notch y el dominio intracelular de Notch (ICD Notch) viaja al núcleo, inhibiendo la expresión de Atoh1. En las células de apoyo después de daño de células ciliales, la actividad del receptor Notch se reduce, Notch ICD permanece en la membrana, y los niveles de Atoh1 aumentan, haciendo que la célula de soporte se transdiferencie en una célula cilial. Una vez que la nueva célula cilial madura, la actividad de Notch se incrementa de nuevo y la transcripción de Atoh1 se reduce a niveles normales.

Durante el desarrollo, los ligandos Notch se manifiestan en células ciliadas jóvenes e influyen en las células de soporte para mantener su identidad en lugar de diferenciarse en células ciliadas (revisado por Kelley ³⁶) La señalización de Notch ejecuta esta función, al menos en parte, bloqueando la síntesis de Atoh1. ³⁷ En la cóclea en desarrollo, la inhibición de la señalización Notch resulta en un aumento significativo del número de células ciliadas. ^{38,39} Se han documentado efectos similares de la inhibición de Notch durante la regeneración de células ciliadas en peces, ⁴⁰ aves, ⁴¹ y órganos vestibulares de ratón. ²⁷ Un estudio sugiere que la infusión de inhibidores de Notch en ratones vivos puede promover que las células de soporte se conviertan en células ciliadas en el órgano de Corti de ratones adultos después de daño de células ciliadas. ⁴² Sin embargo, otro estudio describe claramente una pérdida precipitada de la eficacia de los inhibidores de Notch para estimular la regeneración de células ciliadas. ⁴³ Es de esperar que estas interpretaciones aparentemente contradictorias de la inhibición de Notch se resuelvan en estudios futuros.

Levantamiento del bloqueo en la división de células de apoyo en progenitores nativos

Como se ha comentado anteriormente, las células de soporte en el órgano maduro de Corti se inhiben fuertemente de la división incluso después de que las células ciliadas han sido matadas. Aunque la expresión anómala de Atoh1 y/o la inhibición de Notch parecen alentar a las células de soporte a formar células ciliadas en animales maduros, ninguno de los tratamientos tiene un efecto significativo en la división celular de apoyo. Por lo tanto, como terapia sola, cualquier manipulación probablemente agotaría las células de apoyo, lo que casi con seguridad reduciría la función del órgano de Corti. Los investigadores están tratando de determinar cómo promover las células de apoyo para dividir mitóticamente y reemplazarse o formar nuevas células ciliadas. En este punto, no hay manipulaciones conocidas que tengan estos efectos en el órgano maduro de Corti. Sin embargo, sabemos algunas maneras en que la división celular de apoyo puede ser promovida en la cóclea joven.

Para que las células de soporte cocleares se dividan, deben salir de su estado normal de inactividad mitótica y entrar en el ciclo celular. La p27^{Kip1} es una molécula que bloquea las células progenitoras (o células de soporte) en el órgano de Corti de ratones de dividirse durante el desarrollo embrionario y postnatal. La delección embrionaria del gen que codifica la p27^{Kip1} provoca la formación de un exceso de células en el órgano de Corti, incluidas las células ciliadas. ^{44,45} En ratones maduros, el bloqueo de la síntesis de la p27^{Kip1} provoca un aumento pequeño pero significativo de la división celular en algunos tipos de células de apoyo en el órgano de Corti. ⁴⁶ La inhibición de la p27^{Kip1} y moléculas similares está bajo investigación como una manera de promover la regeneración de células ciliadas de mamíferos. Es particularmente importante en esta etapa que los investigadores determinen si la eliminación de la p27^{Kip1} en roedores adultos conduce a la producción de células ciliadas funcionales y estables.

La actividad de la p27^{Kip1} y otros reguladores de la división celular es controlada por moléculas de señalización extracelular. Un conjunto de moléculas que impulsa la división celular en muchos tejidos es Wnts, que se une a los

receptores en la superficie de las células y activa un coactivador transcripcional llamado β -catenina, (revisado por Jansson *et al.* ⁴⁷) La señalización Wnt/ β -catenina es necesaria para la división de células progenitoras durante el desarrollo coclear; cuando se inhibe, se forman significativamente menos células ciliadas. ⁴⁸ La sobreexpresión forzada de Wnt promueve que las células de soporte en el órgano de Corti se dividan en ratones muy jóvenes pero no en ratones maduros. ^{49, 50} Por lo tanto, la activación de Wnt por sí sola no puede superar otras señales inhibitorias presentes en el órgano de mamíferos maduros de Corti. En contraste, la activación farmacológica de Wnt promueve la regeneración de células ciliadas en los neuromastos funcionales de línea lateral de las larvas del pez cebra. ^{51, 52}

El factor de crecimiento epidérmico (FEAG) es otra molécula que impulsa la división celular de apoyo en las células de soporte en el órgano de Corti de ratones neonatales, así como en células de apoyo en el epitelio auditivo regenerador de pollos maduros. ⁵³ El tratamiento de los órganos cultivados de Corti con FEAG en ratas recién nacidas aumenta la formación de células ciliadas supernumerarias. ⁵⁴ Una vez más, este efecto disminuye rápidamente con la edad. ⁵⁵

¿Podrían tratamientos transitorios o combinatorios mejorar la regeneración de células ciliadas?

Como se mencionó anteriormente, ahora conocemos varios genes poderosos o vías de señalización que, cuando se manipulan en roedores muy jóvenes, hacen que las células de apoyo se dividan y formen nuevas células ciliadas. Pero estas mismas manipulaciones tienen muy poco efecto o incluso efectos perjudiciales en roedores maduros. Estos hallazgos nos dicen que la promoción de la regeneración de células ciliadas en humanos maduros será más difícil de lo que se pensaba originalmente. Una estrategia que los científicos están probando es si la activación transitoria o la supresión de la actividad génica tiene un mejor resultado que las alteraciones sostenidas. Durante el desarrollo, las señales se encienden y apagan en las células, mientras que muchas de las manipulaciones mencionadas anteriormente son permanentes y por lo tanto no naturales. Las técnicas modernas para silenciar genes transitorios, como el Arnm siRA, podrían mejorar los efectos del tratamiento al recapitular mejor la naturaleza. Otra hipótesis que se está probando es si las manipulaciones combinatorias de genes y vías pueden promover más eficazmente la regeneración que las manipulaciones individuales. Esto ha demostrado ser fructífero en la cóclea de roedores neonatales en experimentos que activan Atoh1 e inhiben Notch simultáneamente ⁵⁶ o activan Atoh1 y Wnt simultáneamente. ⁵⁷ Estos enfoques duales reconocen la complejidad de la regulación del crecimiento en los tejidos maduros, así como las interacciones críticas que ocurren entre las vías.

TRASPLANTE PARA REEMPLAZAR LAS CÉLULAS CILIADAS

En la sección anterior, discutimos estrategias para promover las células nativas en el órgano dañado de Corti para dividirse o transdiferenciarse directamente para reemplazar las células ciliadas perdidas. Sin embargo, es posible que una población sensible para responder no persista en la cóclea adulta. Por otra parte, es posible que no podamos encontrar tratamientos adecuados para estimular las células residentes para regenerar las células ciliadas. En cualquier caso, será

necesario adoptar un enfoque alternativo y trasplantar células al oído interno que puedan sustituir a las células ciliadas. La opción obvia es trasplantar células madre, que tienen el potencial de dividirse y diferenciarse en una gama de tipos de células maduras. Las células madre pueden ser cultivadas en un recipiente y guiadas hacia un destino celular deseado (en este caso, células ciliadas) por ciertos agentes químicos o condiciones de cultivo. Las células madre son muy prometedoras para tratar varios tipos de patología, incluyendo enfermedades cardíacas, ceguera y leucemia.

Algunos de los primeros estudios para probar la utilidad de diferentes tipos de células madre para reemplazar las células ciliadas dañadas se realizaron con células madre pluripotentes o células madre neurales derivadas de embriones de ratón. Li *et al.*⁵⁸ acondicionaron células madre embrionarias de ratón con varios compuestos en cultivo para llevarlos a diferenciar las características de células ciliadas. En el trasplante en el oído de un embrión de pollo, las células acondicionadas incorporadas en epitelio de células ciliadas y adquirieron propiedades similares a células ciliadas. Fujino *et al.*⁵⁹ encontraron que las células madre neurales introducidas en los órganos del oído interno cultivados de ratas integradas en el epitelio sensorial de los órganos vestibulares, pero no la cóclea. Posteriormente, Oshima *et al.*⁶⁰ identificaron tratamientos que impulsan las células madre pluripotentes inducidas (derivadas de fibroblastos) para diferenciar las características avanzadas de las células ciliadas en cultivo, incluyendo los haces capilares y las corrientes de mecanotransducción. Más recientemente, se encontró que las células madre de embriones humanos eran capaces de formar células ciliadas en cultivo.⁶¹

La verdadera prueba de la utilidad terapéutica de una célula madre es si puede integrarse en el órgano de Corti, volverse inervado por el nervio auditivo, diferenciar las características maduras, y sobrevivir. La introducción de células madre en el órgano de Corti es un desafío porque el órgano está rodeado por una cavidad llena de líquido que está incrustado dentro del hueso temporal y es fácil de romper en la intervención quirúrgica. Parecería muy difícil colocar células trasplantadas en el órgano de Corti dada la diminuta naturaleza y delicadeza del tejido y el hecho de que las barreras de fluidos tendrían que ser interrumpidas.

No obstante, se están investigando varios enfoques para el suministro de células. Los científicos han introducido células madre embrionarias en los fluidos del órgano de Corti (rampa media) y en los espacios perilinfáticos que rodean la rampa media.^{62; 63} Aunque algunas células madre parecen persistir en estos espacios e integrarse en algunos tejidos alrededor de ellos, hay poca evidencia de que las células madre se integran en el órgano de Corti. Sin embargo, Parker *et al.*⁶⁴ informaron de que las células madre neurales inyectadas en la cóclea dañada por el ruido se incorporaron al epitelio sensorial. Claramente, se necesitan más estudios para identificar formas de persuadir a las células madre para integrarse en epitelios dañados de células ciliadas, adquirir características maduras, y restaurar la función.

CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Aunque el progreso hacia la regeneración de las células ciliadas ha sido significativo dado el tiempo limitado transcurrido desde su descubrimiento, varios

desafíos permanecen para determinar cómo el reemplazo de células ciliadas eficaz podría ser para mejorar la audición en humanos. Por ejemplo, no sabemos cuántas células ciliadas de cada tipo deben regenerarse para restaurar adecuadamente la audición en las personas con discapacidad. Aunque sabemos que las células ciliadas internas son críticas, sólo podemos adivinar lo bien que van a restaurar la audición en la ausencia de células ciliadas externas. Muchas formas de pérdida auditiva son causadas por la destrucción selectiva de las células ciliadas externas; la regeneración de las células ciliadas externas por sí sola podría ser útil en estos pacientes. Además, carecemos de la capacidad de probar con precisión qué tipo de células necesitan reparación en los pacientes. Esta evaluación requiere el desarrollo de procedimientos de diagnóstico más específicos de las células y no invasivos. Además, las imágenes de alta resolución del oído interno, que permiten la evaluación cuantitativa de cada tipo de célula, serían muy útiles y actualmente se están investigando. Aunque hay desafíos para restaurar las células ciliadas después de los daños en los mamíferos, muchos obstáculos ya han sido conquistados, con prometedoras investigaciones en el horizonte para introducir un tratamiento potencial para la pérdida auditiva.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a Glen MacDonald y Linda Howarth, quienes proporcionaron las imágenes para este artículo.

REFERENCIAS

1. Bredberg, G. (1967). The human cochlea during development and ageing. *Journal of Laryngology and Otology* 81, 739–758.
2. McLean, W. J., Smith, K. A., Glowatzki, E., and Pyott, S. J. (2009). Distribution of the Na,K-ATPase a subunit in the rat spiral ganglion and organ of Corti. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 10, 37–49.
3. Warchol, M.E. (2011) . Sensory Regeneration in the vertebrate inner ear: Differences at the levels of cells and species. *Hearing Research* 273, 72 – 79.
4. Groves A. K., Zhang, K. D., and Fekete, D. M. (2013). The genetics of hair cell development and regeneration. *Annual Review of Neuroscience* 36, 361-381.
5. Rubel, E. W, Furrer, S. A., and Stone, J. S. (2013). A brief history of hair cell regeneration research and speculations on the future. *Hearing Research* 297, 42–51.
6. Cotanche, D. A. (1987). Regeneration of hair cell stereociliary bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma. *Hearing Research* 30, 181–195.
7. Cruz, R. M., Lambert, P. R., and Rubel, E.W, (1987). Light microscopic evidence of hair cell regeneration after gentamicin toxicity in chick cochlea. *Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery* 113, 1058–1062.
8. Jørgensen, J. M., and Mathiesen, C. (1988). The avian inner ear. Continuous production of hair cells in vestibular sensory organs, but not in the auditory papilla. *Naturwissenschaften* 75, 319–320.
9. Corwin, J. T., and Cotanche, D. A. (1988). Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 240, 1772–1774.

10. Ryals, B. M., and Rubel, E. E. (1988). Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail. *Science* 240, 1774 – 1776.
11. Roberson, D. W., Kreig, S., and Rubel, E. W. (1996). Light microscopic evidence that direct transdifferentiation gives rise to new hair cells in regenerating avian auditory epithelium. *Auditory Neuroscience* 2, 195–205.
12. Roberson, D. W., and Rubel, E. W. (1994). Cell division in the gerbil cochlea after acoustic trauma. *American Journal of Otolaryngology* 15, 28–34.
13. Chardin, S., and Romand, R. (1995). Regeneration and mammalian auditory hair cells. *Science* 267, 707–711.
14. Forge, A., Li, L., and Nevill, G. (1998). Hair cell recovery in the vestibular sensory epithelia of mature guinea pigs. *Journal of Comparative Neurology* 397, 69–88.
15. Kawamoto, K., Izumikawa, M., Beyer, L. A., Atkin, G. M., and Raphael, Y. (2009). Spontaneous hair cell regeneration in the mouse utricle following gentamicin ototoxicity. *Hearing Research* 247, 17–26.
16. Golub, J. S., Tong, L., Ngyuen, T. B., Hume, C. R., Palmiter, R. D., Rubel, E. W., and Stone, J. S. (2012). Hair cell replacement in adult mouse utricles after targeted ablation of hair cells with diphtheria toxin. *Journal of Neuroscience* 32, 15093–15105.
17. Li, L., and Forge, A. (1997). Morphological evidence for supporting cell to hair cell conversion in the mammalian utricular macula. *International Journal of Developmental Neuroscience* 15, 433–446.
18. Kuntz, A. L., and Oesterle, E. C. (1998). Transforming growth factor α with insulin stimulates cell proliferation in vivo in adult rat vestibular sensory epithelium. *Journal of Comparative Neurology* 399, 413–423.
19. Oesterle, E. C., Cunningham, D. E., Westrum, L. E., and Rubel, E. W. (2003). Ultrastructural analysis of [^3H]thymidine-labeled cells in the rat utricular macula. *Journal of Comparative Neurology* 463, 177–195.
20. Oshima, K., Grimm, C. M., Corrales, C. E., Senn, P., Martinez Monedero, R., Géléoc, G. S. G., Edge, A., Holt, J. R., and Heller, S. (2007). Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 8, 18–31.
21. White, P. M., Doetzlhofer, A., Lee, Y. S., Groves, A. K., and Segil, N. (2006). Mammalian cochlear supporting cells can divide and transdifferentiate into hair cells. *Nature* 441, 984 – 987.
22. Cox, B. C., Chai R., Lenoir A., Liu Z., Zhang L., Nguyen D. H., Chalasani K., Steigelman K. A., Fang, J., Rubel, E. W., Cheng A. G., and Zuo, J. (2014). Spontaneous hair cell regeneration in the neonatal mouse cochlea in vivo. *Development* 141, 816–829.
23. Cai, T., Jen, H.-I., Kang, H., Klisch, T. J., Zoghbi, H. Y., and Groves, A. K. (2015). Characterization of the transcriptome of nascent hair cells and identification of direct targets of the *Atoh1* transcription factor. *Journal of Neuroscience* 35, 5870–5883.

24. Bermingham, N. A., Hassan, B. A., Price, S. D., Vollrath, M. A., Ben-Arie, N., Eatock, R. A., Bellen, H. J., Lysakowski, A., and Zoghbi, H. Y. (1999). *Math1*: An essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284, 1837–1841.
25. Cafaro, J., Lee, G. S., and Stone, J. S. (2007). *Atoh1* expression defines activated progenitors and differentiating hair cells during avian hair cell regeneration. *Developmental Dynamics* 236, 156–170.
26. Wang, G.-P., Chatterjee, I., Batts, S. A., Wong, H. T., Gong, T.-W., Gong, S.-S., and Raphael, Y. (2010). Notch signaling and *Atoh 1* expression during hair cell regeneration in the mouse utricle. *Hearing Research* 267, 61 – 70.
27. Lin, V., Golub, J. S., Nguyen, T. B., Hume, C. R., Oesterle, E. C., and Stone, J. S. (2011). Inhibition of Notch activity promotes nonmitotic regeneration of hair cells in the adult mouse utricles. *Journal of Neuroscience* 31, 15329–15339.
28. Lewis, R. M., Hume, C. R., and Stone, J. S. (2012). *Atoh1* expression and function during auditory hair cell regeneration in post-hatch chickens. *Hearing Research* 289, 74-85.
29. Zheng, J. L., and Gao, W. Q. (2000). Overexpression of *Math 1* induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. *Nature Neuroscience* 3, 580 – 586.
30. Gubbels, S. P., Woessner, D. W., Mitchell, J. C., Ricci, A. J., and Brigande, J. V. (2008). Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer. *Nature* 455, 537–541.
31. Izumikawa, M., Minoda, R., Kawamoto, K., Abrashkin, K. A., Swiderski, D. L., Dolan, D. F., Brough, D. E., and Raphael, Y. (2005). Auditory hair cell replacement and hearing improvement by *Atoh1* gene therapy in deaf mammals. *Nature Medicine* 11, 271–276.
32. Schlecker, C., Praetorius, M., Brough, D. E., Presler, R. G., Hsu, C., Plinkert, P. K., and Staecker, H. (2011). Selective atonal gene delivery improves balance function in a mouse model of vestibular disease. *Gene Therapy* 18, 884 – 890.
33. Liu, Z., Dearman, J. A., Cox, B. C., Walters, B. J., Zhang, L., Ayrault, O., Zindy, F., Gan, L., Roussel, M. F., and Zuo, J. (2012). Age-dependent in vivo conversion of mouse cochlear pillar and deiters' cells to immature hair cells by *atoh1* ectopic expression. *Journal of Neuroscience* 32, 6600–6610.
34. Atkinson, P. J., Huarcaya Najarro, E., Sayyid, Z. N., and Cheng, A. G. (2015). Sensory hair cell development and regeneration: Similarities and differences. *Development* 142, 1561–1571.
35. Lewis, J. (1998). Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 9, 583-589.
36. Kelley, M. W. (2006). Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nature Reviews Neuroscience* 7, 837–849.
37. Lanford, P. J., Shailam, R., Norton, C. R., Gridley, T., and Kelley, M. W. (2000). Expression of *Math1* and *HES5* in the cochleae of wildtype and *Jag2* mutant mice. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 1, 161–171.

38. Hayashi, T., Kokubo, H., Hartman B. H., Ray, C. A., Reh, T. A., Bermingham-McDonogh, O. (2008). *Hesr1* and *Hesr2* may act as early effectors of Notch signaling in the developing cochlea. *Developmental Biology* 316, 87-99.
39. Doetzlhofer, A., Basch, M. L., Ohyama, T., Gessler, M., Groves, A. K., and Segil, N. (2009). *Hey2* regulation by FGF provides a Notch-independent mechanism for maintaining pillar cell fate in the organ of Corti. *Developmental Cell* 16, 58–69.
40. Ma, E. Y., Rubel, E. W., and Raible, D. W. (2008). Notch signaling regulates the extent of hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. *Journal of Neuroscience* 28, 2261–2273.
41. Daudet, N., Gibson, R., Shang, J., Bernard, A., Lewis, J., and Stone, J. (2009). Notch regulation of progenitor cell behavior in quiescent and regenerating auditory epithelium of mature birds. *Developmental Biology* 326, 86–100.
42. Mizutari, K., Fujioka, M., Hosoya, M., Bramhall, N., Okano, H. J., Okano, H., and Edge, A. S. B. (2013). Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma. *Neuron* 77, 58–69.
43. Maass, J. C., Gu, R., Basch, M. L., Waldhaus, J., Lopez, E. M., Xia, A., Oghalai, J. S., Heller, S., and Groves, A. K. (2015). Changes in the regulation of the Notch signaling pathway are temporally correlated with regenerative failure in the mouse cochlea. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9, 110.
44. Chen, P., and Segil, N. (1999). *p27(Kip1)* links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development* 126, 1581–1590.
45. Löwenheim, H., Furness, D.N., Kil, J., Zinn, C., Gültig, K., Fero, M. L., Frost, D., Gummer, A. W., Roberts, J. M., Rubel, E.W, Hackney, C. M., and Zenner, H.-P. (1999). Gene disruption of *p27Kip1* allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of Corti. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4084–4088.
46. Oesterle, E. C., Chien, W.-M., Campbell, S., Nellimarla, P., and Fero, M. L. (2011). *p27Kip1* is required to maintain proliferative quiescence in the adult cochlea and pituitary. *Cell Cycle* 10, 1237–1248.
47. Jansson, L., Kim, G. S., and Cheng, A. G. (2015). Making sense of Wnt signaling- linking hair cell regeneration to development. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9, 66.
48. Shi, F., Hu, L., Jacques, B. E., Mulvaney, J. F., Dabdoub, A., and Edge, A.S. B. (2014). β -Catenin is required for hair-cell differentiation in the cochlea. *Journal of Neuroscience* 34, 6470 – 6479.
49. Chai, R., Kuo, B., Wang, T., Liaw, E. J., Xia, A., Jan, T. A., Liu, Z., Taketo, M. M., Oghalai, J. S., Nusse, R., Zuo, J, and Cheng, A. G. (2012). Wnt signaling induces proliferation of sensory precursors in the postnatal mouse cochlea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 8167-8172
50. Shi, F., Hu, L., and Edge, A. S. B. (2013). Generation of hair cells in neonatal mice by β -catenin overexpression in *Lgr5*-positive cochlear progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 13851 – 13856.

51. Head, J. R., Gacioch, L., Pennisi, M., and Meyers, J. R. (2013). Activation of canonical Wnt/-catenin signaling stimulates proliferation in neuromasts in the zebrafish posterior lateral line. *Developmental Dynamics* 242, 832–846.
52. Jacques, B. E., Montgomery, W. H., Uribe, P. M., Yatteau, A., Asuncion, J. D., Resendiz, G., Matsui, J. I., and Dabdoub, A. (2014). The role of Wnt/-catenin signaling in proliferation and regeneration of the developing basilar papilla and lateral line. *Developmental Neurobiology* 74, 438–456.
53. White, P. M., Stone, J. S., Groves, A. K., and Segil, N. (2012). EGFR signaling is required for regenerative proliferation in the cochlea: conservation in birds and mammals. *Developmental Biology* 363, 191 – 200.
54. Lefebvre, P. P., Malgrange, B., Pirry, M., Van De Water, T.R., and Moonen, G. (2000). Epidermal growth factor upregulates production of supernumerary hair cells in neonatal rat organ of corti explants. *Acta Oto-laryngologica* 120, 142–145.
55. Hume C. R., Kirkegaard M., Oesterle E. C. (2003). ErbB expression: The mouse inner ear and maturation of the mitogenic response to heregulin. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 4(3), 422-443.
56. Zhao, L.-D., Guo, W.-W., Lin, C., Li, L.X., Sun, J.-H., Wu, N., Ren, L.-L., Li, X.-X., Liu, H.-Z., Young, W.-Y., Gao, W. Q., and Yang, S. M. (2011). Effects of DAPT and Atoh 1 overexpression on hair cell production and hair bundle orientation in cultured Organ of Corti from neonatal rats. *PLoS One* 6, e23729.
57. Kuo, B. R., Baldwin, E. M., Layman, W. S., Taketo, M. M., and Zuo, J. (2015). In vivo cochlear hair cell generation and survival by coactivation of -catenin and Atoh1. *Journal of Neuroscience* 35, 10786–10798.
58. Li, H., Roblin, G., Liu, H., and Heller, S. (2003). Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 13495–13500.
59. Fujino, K., Kim, T.-S., Nishida, A. T., Nakagawa, T., Omori, K., Naito, Y., and Ito, J. (2004). Transplantation of neural stem cells into explants of rat inner ear. *Acta Oto-Laryngologica Supplementum* 124(551), 31–33.
60. Oshima, K., Shin, K., Diensthuber, M., Peng, A. W., Ricci, A. J., and Heller, S. (2010). Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell* 141, 704–716.
61. Ronaghi, M., Nasr, M., Ealy, M., Durruthy-Durruthy, R., Waldhaus, J., Diaz, G. H., Joubert, L.-M., Oshima, K., and Heller, S. (2014). Inner ear hair cell like cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development* 23, 1275 – 1284.
62. Coleman, B., Hardman, J., Coco, A., Epp, S., de Silva, M., Crook, J., and Shepherd, R. (2006). Fate of embryonic stem cells transplanted into the deafened mammalian cochlea. *Cell Transplantation* 15, 369–380.
63. Hildebrand, M. S., Dahl, H.-H.M., Hardman, J., Coleman, B., Shepherd, R. K., and de Silva, M. G. (2005). Survival of partially differentiated mouse embryonic stem cells in the scala media of the guinea pig cochlea. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 6, 341–354.

64 Parker, M. A., Corliss, D. A., Gray, B., Anderson, J. K., Bobbin, R. P., Snyder, E. Y., Cotanche, D. A. (2007). Neural stem cells injected into the sounddamaged cochlea migrate throughout the cochlea and express markers of hair cells, supporting cells, and spiral ganglion cells. *Hearing Research* 232, 29-43.

