



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Modelo de diferenciación dirigida de células ciliadas del oído
interno a partir de células troncales embrionarias (E14Tg2a) de
ratón**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MIGUEL ÁNGEL JUÁREZ MANCERA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. PAUL MONDRAGÓN TERÁN**

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Datos del alumno:

Juárez
Mancera
Miguel Ángel
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
409088731

Datos del Tutor

Dr.
Paul
Mondragón
Terán

Datos del sinodal 1

Dr.
Jorge Antonio
García
Álvarez

Datos del sinodal 2

Dra.
Sofía Lizeth
Alcaraz
Estrada

Datos del sinodal 3

Dra.
Maricela
Villagrán
Santa Cruz

Datos del sinodal 4

M. en C.
Silvia
García

Datos del trabajo escrito

Modelo de diferenciación dirigida de células ciliadas del oído interno a partir de células troncales embrionarias (E14Tg2a) de ratón.

66 p.

2015

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Oído interno	2
2.1.1 Fisiología de la audición - Células ciliadas del oído interno	4
2.1.2 Pérdida de las células ciliadas del oído	6
2.2 Regeneración de Células Ciliadas del Oído Interno a partir de Células Troncales Embrionarias	7
2.2.1 Células troncales embrionarias	7
2.2.2 Derivación de células ciliadas del oído interno y medicina regenerativa.....	12
3. Antecedentes	15
4. Justificación.....	17
5. Hipótesis	18
6. Objetivos.....	18
6.1 General.....	18
6.2 Particulares	18
7. Materiales y Métodos	20
7.1 Cultivo y mantenimiento de CTER (línea celular E14Tg2a)	20
7.2 Criopreservación.....	22
7.2.1 Banco Maestro	22
7.2.2 Banco de Trabajo.....	23
7.3 Evaluación del estado pluripotente de las CTER mediante citometría de flujo	23
7.4 Evaluación del estado pluripotente de las CTER a través de la técnica de Inmunocitoquímica (ICQ)	24
7.5 Cuantificación del área de Células Troncales Embrionarias de Ratón.....	25
7.6 Cinética de proliferación de las Células Troncales Embrionarias de Ratón.....	26
7.7 Evaluación de dos medios de cultivo químicamente definidos para el proceso de diferenciación	27
7.8 Proceso de diferenciación de las CTER hacia CCOI	29
7.9 Evaluación de la especialización celular mediante la técnica de inmunocitoquímica 30	
7.10 Cuantificación del área de Células Ciliadas del Oído Interno.....	32

7.11 Cinética de proliferación de las CPN durante el proceso de diferenciación	32
8. Resultados	34
8.1 Evaluación del estado pluripotente por citometría de flujo.....	34
8.2 Evaluación del estado pluripotente de las CTER´s por ICQ	35
8.3 Cinética de proliferación de las CTER.....	37
8.4 Evaluación de dos medios químicamente definidos para el proceso de diferenciación (GMEM vs F-12K).	39
8.5 Evaluación del estado de diferenciación por ICQ en células especializadas en medio químicamente definido GMEM.....	44
8.6 Estimación de la expresión y coexpresión de los marcadores Miosina VIIa y Math1/Atoh1 a través del área (μm^2).	49
8.7 Cinética de proliferación para el proceso de diferenciación celular.....	51
9. Discusión.....	53
10. Conclusiones.....	59
11. Bibliografía.....	60

Índice de figuras

Figura 1.- Estructura del oído interno en mamíferos	2
Figura 2.- Anatomía de la cóclea	3
Figura 3.- Arreglo de las células ciliadas del oído interno dentro de la cóclea	4
Figura 4.- Despolarización de una célula ciliada después de haber recibido un estímulo.....	5
Figura 5.- Microfotografía comparativa de una cóclea sana y una cóclea dañada	6
Figura 6.- Obtención, cultivo y diferenciación de células troncales embrionarias	8
Figura 7.- Microfotografía de colonias de CTER	22
Figura 8.- Protocolo de diferenciación	30
Figura 9.- Citometría de flujo para los marcadores específicos de células pluripotentes	35
Figura 10.- Microfotografías de las ICQ realizadas para evaluar el estado pluripotente de las CTER	36
Figura 11.- Determinación del porcentaje de expresión de los marcadores OCT $\frac{3}{4}$ y Nanog en función del área (μm^2)	37
Figura 12.- Cinética de proliferación para CTER	38
Figura 13.- Microfotografías en las primeras 240 h de diferenciación	40

Figura 14.- Microfotografías a las 480 h de diferenciación	41
Figura 15.- Diferenciación hacia células de fenotipo neural (384 h)	42
Figura 16.- Microfotografías durante la etapa de especialización	43
Figura 17.- Microfotografía de células neurales observadas en el día 26 de iniciado el proceso de diferenciación.....	44
Figura 18.- Inmunocitoquímica para evaluar la expresión de Nestina	45
Figura 19.- Microfotografías de las ICQ realizadas a las células después de 240 h de cultivo para observar la expresión de los marcadores Miosina VIIa y Math1/Atoh1 .	46
Figura 20.- Microfotografías de las ICQ realizadas a las células después de 480 h de cultivo para observar la expresión de los marcadores Miosina VIIa y Math1/Atoh1 .	47
Figura 21.- Microfotografías de las ICQ realizadas a las células después de 672 h de cultivo para observar la expresión de los marcadores Miosina VIIa y Math1/Atoh1 .	48
Figura 22.- Expresión en función del área de las proteínas Miosina VIIa y Math1/Atoh1	50
Figura 23.- Expresión en % de las proteínas Miosina VIIa y Math1/Atoh1.....	50
Figura 24.- Cinética de proliferación durante el proceso de diferenciación	51
Figura 25.- Número de células $\cdot \text{cm}^{-2}$ que expresaron los marcadores específicos Miosina VIIa, Math1/Atoh1 y la coexpresión de ambos	52

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
Ca⁺²	Calcio
CC	Células Ciliadas
CCOI	Células Ciliadas del Oído Interno
CO₂	Dióxido de Carbono
CPN	Células Precursoras Neurales
CTE	Células Troncales Embrionarias
CTER	Células Troncales Embrionarias de Ratón
CTPi	Células Troncales Pluripotentes inducidas
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EB's	Embryoid Bodies
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
FIT-C	Fluorescein isothiocyanate
GMEM	Glasgow's Minimum Essential Medium
h	Horas
HMG – box	High mobility group – box
HNS	Hipoacusia neurosensorial
IGF-1	Insuline-like Growth Factor – 1
K⁺	Potasio
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
ln	Logaritmo natural
MCI	Masa Celular Interna
Mg⁺²	Magnesio
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
µl	Microlitros

μm²	Micrometros cuadrados
Ng	Nanogramos
OCT^{3/4}	Octamer ^{3/4}
PBS	Phosphate-Buffered Saline
POU	Pituitary specific Pit1 - Octamer transcription - neural Unc-86
POU_H	Homeodominio POU
POU_s	Dominio específico POU
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNG's	Neuronas ganglionares en espiral
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SOX2	Sex determinig region Y – box 2
Td	Tiempo de duplicación
TRIT-C	Tetramethylrodamine

Glosario

Blastocisto.- Estadio embrionario que prosigue a la fase de mórula en el desarrollo embrionario de mamíferos. Es una masa esférica de células con una cavidad central llena de líquido (el blastocele) rodeada de dos capas de células.

bFGF.- Factor de crecimiento que aumenta el índice de actividad mitótica y síntesis de ADN facilitando la proliferación de varias células precursoras.

Canal de Rosenthal.- El canal enrollado del laberinto óseo que da dos vueltas y media alrededor del modiollo de la cóclea; se encuentra dividido de forma incompleta en dos compartimientos óseos.

Células ciliadas del oído.- Células transductoras altamente sensibles que facilitan las sensaciones de audición y equilibrio. Una fuerza sutil aplicada en el ápice celular produce una señal eléctrica en el polo basal.

Células troncales embrionarias.- Células pluripotentes derivadas de la Masa Celular Interna que pueden ser cultivadas bajo condiciones específicas que permiten mantener su estado de pluripotencia.

Células troncales pluripotentes inducidas.- Células con características pluripotentes derivadas artificialmente de células adultas diferenciadas, en las cuales se induce la expresión de genes exógenos (tales como Oct3/4 , Sox2, Klf4 y c-Myc) para lograr una reprogramación hacia el estado pluripotente.

Cóclea: Conducto cónico enrollado que forma parte del oído interno y contiene al órgano espiral (órgano de Corti).

Co-cultivo.- Técnica de cultivo que consiste en mezclar varios tipos de células *in vitro* para permitir interacciones sinérgicas o antagonistas, como en la diferenciación celular o apoptosis.

Córtex auditivo.- Zona del cerebro que interpreta las vibraciones percibidas por el sistema auditivo. El córtex auditivo primario permite distinguir los sonidos, su intensidad y memorizarlos. El córtex auditivo secundario gestiona la comprensión de las palabras del lenguaje y su clasificación.

Cuerpos embroides.- Agregados espontáneos de células trocales embrionarias que se producen *in vitro* después de ser cultivadas en un medio carente de Factor Inhibidor de Leucemia.

Cultivo en monocapa.- Técnica de cultivo celular en donde las células crecen adheridas sobre un soporte sólido. El anclaje al sustrato es un prerrequisito para la proliferación celular. Es el método más utilizado para el cultivo de la mayoría de las células exceptuando a las hematopoyéticas.

Diferenciación.- Proceso por el que una célula no especializada se especializa hacia uno de los muchos tipos celulares que conforman el cuerpo.

Diferenciación celular dirigida.- Diferenciación de las células troncales pluripotentes hacia un tipo celular específico.

Diferenciación celular espontánea.- Diferenciación celular hacia cualquier tipo celular que ocurre durante un proceso de diferenciación.

Drogas ototóxicas.- Sustancias que producen un efecto nocivo, reversible o irreversible sobre el oído que pueden afectar el equilibrio y la audición. De esta definición se excluyen las sustancias que actúan a través de la circulación sanguínea cerebral o de los mecanismos centrales de la audición, las cuales se consideran sustancias neurotóxicas.

Ectodermo.- La más externa de las tres capas germinales. Del ectodermo se origina el sistema nervioso, los órganos sensoriales, así como los tejidos epidérmicos.

EGF.- Sustancia proteica que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una función importante en la comunicación intercelular.

Endodermo.- Capa celular más interna de las que se desarrollan en el disco embrionario a partir de la Masa Celular Interna. El endodermo da origen al revestimiento de las cavidades y conductos corporales, además de la mayoría de los órganos internos (digestivo y reproductivo).

Epiblasto.- Capa externa principal del blastocisto o blástula, antes de diferenciarse en las tres capas germinales, que origina al ectodermo y que contiene células capaces de formar el endodermo y el mesodermo.

Endolinfa: Líquido que se encuentra dentro del laberinto membranoso en el oído interno.

Factores de crecimiento.- Conjunto de proteínas cuya acción pseudo-hormonal influye directamente en los procesos celulares de diferenciación, proliferación, así como en el control del ciclo celular.

Gastrulación.- Proceso de formación de la gástrula. Proceso que sigue a la segmentación. A través de una serie de movimientos celulares coordinados en el espacio y el tiempo (movimientos morfogénicos), genera el plan de organización primario del embrión. En este proceso se organizan las hojas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo).

Hipoacusia neurosensorial.- Trastorno del oído medio que se debe a la pérdida de las células sensoriales que se encuentran dentro del oído interno y por la pérdida neural que involucra al nervio auditivo.

IGF-1.- Hormona similar en estructura molecular a la insulina. Tiene efectos similares a la insulina también puede regular el desarrollo y proliferación celular, especialmente en las células nerviosas.

Laberinto membranoso: Parte del laberinto del oído interno localizada dentro del laberinto óseo y separado de él por la perilinfa. Está formado por los conductos semicirculares, el sáculo, el utrículo y el conducto coclear.

Laberinto óseo: Conjunto de cavidades ubicadas en la porción petrosa del hueso temporal que forman el vestíbulo, la cóclea y los conductos semicirculares del oído interno.

Masa celular interna.- Pequeño grupo de células internas localizadas dentro del blastocisto que posteriormente desarrollarán al embrión y sus estructuras asociadas: el saco vitelino, el alantoides y el amnios.

Mesodermo.- La capa media de las tres capas germinales, se localiza entre el endodermo y ectodermo. El mesodermo da origen a los músculos y el esqueleto; tejido conectivo; órganos reproductores; a los riñones, sangre y a la mayoría del tejido cardiovascular.

Mórula.- Embrión de los vertebrados con 16 – 64 células; precede al estado de blástula o blastocisto.

Neuronas aferentes.- Neuronas que transmiten la información desde células sensitivas receptoras (por ejemplo, las ondas de sonido desde el oído, señales luminosas desde la retina) hasta el Sistema Nervioso Central (espina dorsal y cerebro).

Nervio auditivo.- Es el octavo de los 12 nervios craneales. Es responsable del equilibrio y la audición.

Neuronas sensitivas.- Neuronas que conducen los impulsos nerviosos producidos por alguna estructura receptora, siempre en sentido centrípeto, es decir, de la periferia hacia el sistema nervioso central.

Órgano de Corti.- Se encuentra en la rampa coclear o media del oído interno de los mamíferos y compuesto por las células sensoriales auditivas llamadas células ciliadas. Transforman la energía de mecánica de las ondas sonoras en impulsos eléctricos.

Perilinfia: Líquido presente entre los laberintos membranoso y óseo del oído interno.

Placas óticas.- Par de engrosamientos epidermales que se invaginan para formar el laberinto del oído interno, cuyas neuronas forman los ganglios auditivos los cuales hacen posible la audición.

Placa neural.- Región dorsal del ectodermo que es específica para dar origen al ectodermo neural. Las células de ésta región tienen una apariencia de columna.

Sáculo: La cámara más inferior y pequeña de las dos que existen en el laberinto membranoso dentro del vestíbulo del oído interno; contiene el órgano receptor para el equilibrio estático.

Sistema Nervioso Autónomo.- Es la parte del sistema nervioso que controla los movimientos involuntarios.

Sistema Nervioso Central.- Estructura biológica presente sólo en el reino Animal. Está constituido por el encéfalo y la médula espinal.

Sistema Nervioso Parasimpático.- Pertenece al sistema nervioso autónomo, que controla las funciones y actos involuntarios. Los nervios que lo integran nacen en el encéfalo, formando parte de los nervios craneales, motor ocular común, facial, glossofaríngeo y vago. En la médula espinal se encuentra a nivel de las raíces sacras de S2 a S4.

Teratocarcinoma.- Tumor derivado de células germinales primordiales malignas, contiene una población de células troncales indiferenciadas (carcinoma embrionario o células CE)

que tienen propiedades bioquímicas y de desarrollo similares a las células que conforman la Masa Celular Interna. Las células CE pueden diferenciarse en una amplia cantidad de tejidos, incluyendo epitelio respiratorio e intestinal, músculo, nervio, cartílago y hueso.

Tranfección viral.- Técnica mediante la cual se introducen fragmentos de ADN de interés en células utilizando vectores virales.

Trofoblasto.- Células externas del embrión temprano en mamíferos (por ejemplo, el blastocisto y el trofoblasto) que se anclan al útero. Las células del trofoblasto darán origen al corion (la porción embrionaria de la placenta). También llamado trofoectodermo.

Utrículo: La más grande de las dos divisiones del laberinto membranoso localizado dentro del vestíbulo del oído interno, que contiene un órgano receptor para el equilibrio estático.

1. Resumen

En el presente trabajo se propuso un protocolo para lograr una derivación de células ciliadas del oído interno a partir de células troncales embrionarias (E14Tg2a) de ratón mediante un proceso de diferenciación dirigida que constó de 3 etapas: 1) derivación de células precursoras neurales; 2) expansión de las células precursoras neurales y 3) especialización hacia células ciliadas del oído; todo el procedimiento se realizó en un medio químicamente definido y libre de células alimentadoras. Antes de ser sometidas al proceso de diferenciación, se evaluó el estado pluripotente de las células a través del ensayo de inmunocitoquímica y citometría de flujo, el cual fue mayor al 95%. Se propuso una cinética de proliferación para esta línea celular, con un tiempo de duplicación de 28.8 h.

Para poder establecer las condiciones óptimas en las que se llevaría a cabo la experimentación, se compararon dos medios para cultivo celular químicamente definidos. Se determinó al final del proceso de diferenciación que el medio GMEM suplementado con factores de crecimiento nos proporcionaba las condiciones necesarias para lograr una diferenciación exitosa; las células troncales embrionarias fueron expuestas directamente a tres factores de crecimiento IGF-1, EGF y bFGF, se realizó de ésta forma para tener un mayor control en el proceso de diferenciación y evitar en la mayor medida posible la diferenciación espontánea; en donde se observó una coexpresión de los marcadores para células ciliadas del oído (Miosina VIIa y Math1/Atoh1) durante la primera etapa del proceso, dicha expresión se mantuvo hasta el final del experimento.

Así mismo, se propuso una cinética de proliferación para las células ciliadas del oído interno para cultivo *in vitro*; sin embargo se concluye que a pesar de que es posible obtener células ciliadas por el protocolo propuesto es necesario evaluar las primeras 240 h de iniciado el proceso de diferenciación.

2. Introducción

2.1 Oído interno

El oído se divide en tres regiones principales: el oído externo, que recoge las ondas sonoras y las canaliza hacia el interior; el oído medio, que transmite las vibraciones sonoras a la ventana oval; y el oído interno, que aloja los receptores de la audición y el equilibrio.

El oído interno también se denomina laberinto por su complicada serie de conductos. Estructuralmente consiste en dos divisiones principales: un laberinto óseo externo que envuelve a un laberinto membranoso interno, Figura 1. El laberinto óseo está constituido por cavidades en el hueso temporal divididas en tres áreas: 1) canales semicirculares, 2) vestíbulo, que contienen receptores para el equilibrio, y 3) la cóclea, que contiene receptores para la audición. El laberinto óseo está revestido por periostio y encierra a la perilinfa. Este líquido, que tiene una composición química similar a la del líquido cefalorraquídeo, rodea al laberinto membranoso, el cual es una sucesión de sacos y conductos dentro del laberinto óseo. El laberinto membranoso está revestido por epitelio y contiene a la endolinfa, el nivel de iones de potasio (K^+) en la endolinfa es inusualmente alto para un líquido extracelular y desempeña un papel importante en la generación de las señales auditivas, Figura 2 (Torres y Giráldez, 1998).

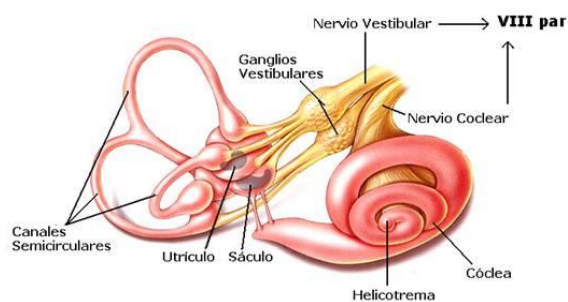


Figura 1.- Estructura del oído interno en mamíferos.

La cóclea es un conducto óseo en forma de espiral, da casi tres vueltas alrededor de un núcleo óseo central denominado columela. Los cortes a través de la cóclea revelan que ésta se divide en tres conductos: el conducto coclear, la rama vestibular y la rama timpánica. El conducto coclear o rama media es una continuación del laberinto membranoso dentro de la cóclea; está lleno de endolinfa. El conducto situado por encima del coclear es la rama vestibular, que termina en la ventana oval, Figura 2. Tanto la rama vestibular como la rama timpánica forman parte del laberinto óseo de la cóclea; en consecuencia están repletas de perilinfa. Las ramas vestibular y timpánica se hallan completamente separadas entre sí, excepto por una abertura en el vértice de la cóclea, el helicotrema (Figura 1). La cóclea se continúa con la pared del vestíbulo, dentro del cual se abre la rama vestibular. La perilinfa en el vestíbulo es continua con la de la rama vestibular, Figura 2 (Dallos, 1992).

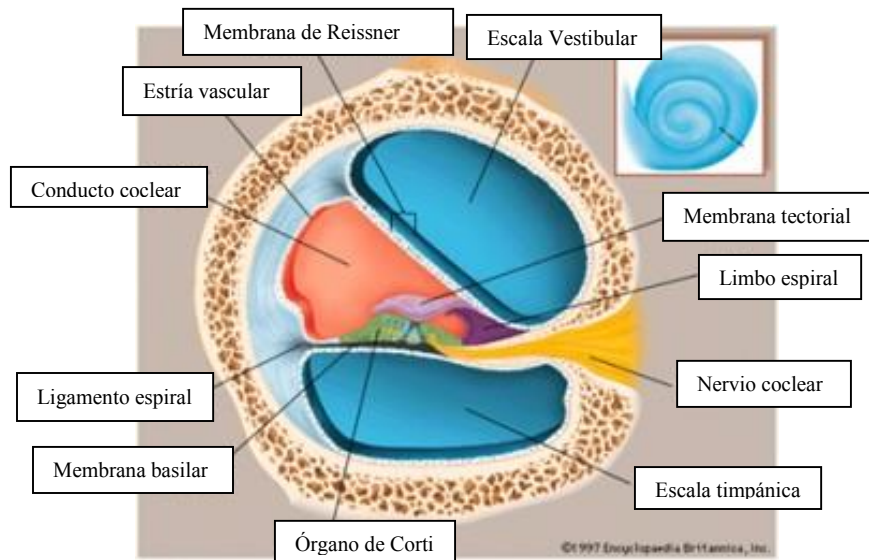


Figura 2.- Anatomía de la cóclea.

La membrana vestibular separa el conducto coclear de la rama vestibular y la membrana basilar lo separa de la rama timpánica. Sobre la membrana basilar descansa el órgano espiral u órgano de Corti. El órgano espiral es una lámina enrollada de células epiteliales, con células de sostén y alrededor de 25 000 células ciliadas, mismas que son los receptores de la audición. Hay dos grupos de células ciliadas: *las células ciliadas internas*, que están distribuidas en una sola fila, mientras que las *células ciliadas externas* se disponen en tres filas (Figura 3). En la parte apical de cada célula ciliada hay un haz de cilias, constituida

por 30 a 100 estereocilias que se extienden dentro de la endolinfa del conducto coclear (Raphael, 2003).

En sus extremos basales, tanto las células ciliadas internas como las externas hacen sinapsis con neuronas sensitivas de primer orden y con neuronas eferentes del ramo coclear del nervio vestibulococlear. A pesar de que la relación numérica entre las células ciliadas externas e internas es de 3 a 1, las células ciliadas internas hacen sinapsis con el 90 al 95% de las neuronas sensitivas de primer orden en el nervio coclear que retransmiten la información auditiva al cerebro. La membrana tectoria, una membrana gelatinosa y flexible, cubre a las células ciliadas del órgano espiral (Tortoga, 2006).

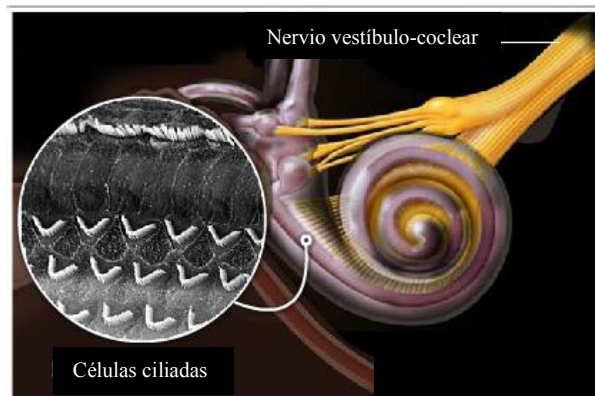


Figura 3.- Arreglo de las células ciliadas del oído interno dentro de la cóclea.

2.1.1 Fisiología de la audición - Células ciliadas del oído interno

Las células ciliadas internas son los transductores primarios de la audición, ya que traducen el movimiento de los haces de cilios apicales, inducido por las ondas sonoras, en una señal despolarizante (Figura 4). Las células ciliadas externas, por otro lado, reciben estímulos eferentes desde centros superiores de control para modular la señal auditiva y contribuyen a magnificar la sensibilidad del sistema. Las señales de las células ciliadas internas son transmitidas a los núcleos de los nervios auditivos localizados en el tronco cerebral a través de las neuronas ganglionares en espiral (SNG's por sus siglas en inglés), neuronas de primer orden en la vía auditiva. Existen varios núcleos en el tronco cerebral que son los

responsables de ajustar y sintonizar la señal enviada desde la cóclea antes de enviarla a través de las fibras para la interpretación final del sonido en el córtex auditivo (Rivolta, 2013).

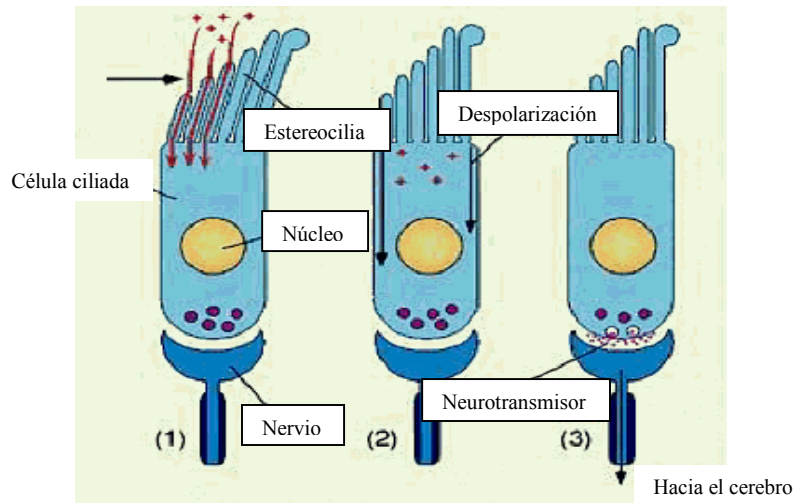


Figura 4.- Despolarización de una célula ciliada después de percibir un estímulo.

La despolarización de las células ciliadas permite que liberen un neurotransmisor, probablemente ácido glutámico, que inicia la despolarización de neuronas aferentes vecinas. El potasio que penetra en las células ciliadas por conductos catiónicos sensibles a factores mecánicos es reciclado. Las prolongaciones de las células ciliares sobresalen en la endolinfa, en tanto que las bases se encuentra sumergidas en la perilinf; tal disposición es necesaria para la producción normal de potenciales receptores. La perilinfa se constituye principalmente de plasma. La endolinfa, por otra parte, se forma en la rampa media por acción de la estra vascular y muestra una gran concentración de potasio y una baja concentración de sodio. Los filamentos ciliares suministran un mecanismo para generar cambios en el potencial de membrana, los cuales son proporcionales a la dirección y la distancia de los movimientos del cilio. De esta manera las células ciliadas desempeñan un papel esencial en la fisiología de la audición al ser los receptores primarios de las ondas sonoras por un lado, y por el otro al transformar la energía mecánica recibida en impulsos nerviosos a través de la liberación de neurotransmisores para que finalmente la información recibida llegue a regiones específicas del cerebro para que puedan ser interpretadas (Fernández y Hernández, 2010).

2.1.2 Pérdida de las células ciliadas del oído

La sordera es una afección bastante común, se ha reportado que en el mundo existen alrededor de 250 millones de personas que padecen este trastorno. Cerca del 90% de los casos es de carácter neurosensorial e involucra la pérdida de las células ciliadas y sus neuronas asociadas (Chen *et al.*, 2009).

Las células ciliadas sensoriales de la cóclea transmiten las vibraciones mecánicas del sonido hacia el cerebro por medio de las neuronas auditivas. La pérdida de las células ciliadas del oído interno en mamíferos ocasiona una disminución gradual y permanente de la audición neurosensorial, y como consecuencia la degeneración de las neuronas auditivas (Coleman, 2007). La edad, anomalías genéticas y factores ambientales (por ejemplo, el ruido y drogas ototóxicas tales como el ácido acetilsalicílico o los aminoglucósidos) son las causas más comunes que causan sordera. Debido al nulo potencial regenerativo de las células ciliadas en mamíferos, muchos tipos de desórdenes auditivos congénitos y adquiridos tienen su origen en el daño o pérdida de las células ciliadas del oído (Glavaski-Joksimovic *et al.*, 2009) (Figura 5).

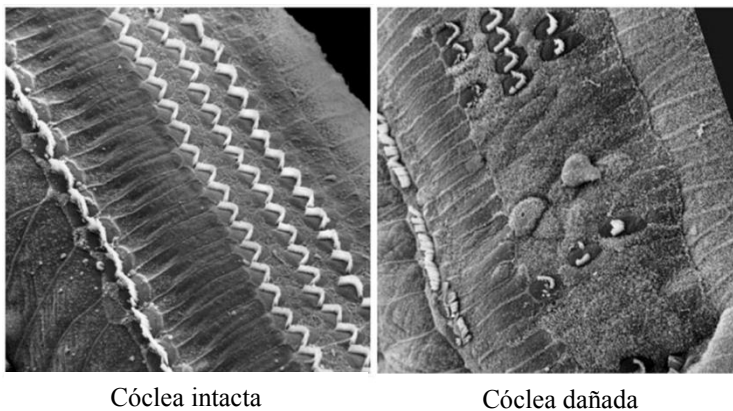


Figura 5.- Microfotografía comparativa de una cóclea sana (izquierda) y una cóclea dañada (derecha). Se observa daño en la estructura de las células ciliadas.

Las células ciliadas del oído, generalmente proveen un soporte trófico a las neuronas ganglionares en espiral (SNG's, por sus siglas en inglés), y a las neuronas aferentes de

primer orden del nervio auditivo, en forma de neurotrofinas (Ylikoski *et al.*, 1993). La pérdida de estas células ciliadas provoca una serie de cambios morfológicos y fisiológicos que tienen como resultado final la degeneración de las SNG's. Una rápida pérdida inicial de procesos periféricos es seguida de una degeneración más gradual de los cuerpos celulares que se encuentran dentro del canal de Rosenthal (Leake y Hradek, 1988). La degeneración de las neuronas auditivas es un proceso en curso que, eventualmente resulta en un pequeño número de SNG's sobrevivientes a través del tiempo en animales adultos (Hardie y Shepherd, 1999; Leake y Hradek, 1988; Coleman *et al.* 2006). Además, la cóclea de los mamíferos carece del potencial para regenerar a las células ciliadas ni a las neuronas sensitivas (Raphael, 2002; Rivolta, 2013), la ausencia en la regeneración de éstas células se atribuye a la compleja organización del epitelio coclear y a su escasa proliferación, que comprende al órgano de Corti en mamíferos (Shi *et al.*, 2012). Ante ésta falta de autoreparación la pérdida de la audición provocada por daños a éstas células es permanente (Rivolta, 2013).

2.2 Regeneración de Células Ciliadas del Oído Interno a partir de Células Troncales Embrionarias

2.2.1 Células troncales embrionarias

Las células troncales por definición poseen dos características: autorenovación y la habilidad para diferenciarse en diversos linajes celulares, bajo condiciones apropiadas. A su vez se han clasificado en 2 tipos, dependiendo su capacidad de diferenciación: células troncales embrionarias y células troncales no embrionarias o adultas (Kumar, 2006; Ramakrishna *et al.*, 2011). Las células troncales embrionarias son denominadas pluripotentes ya que pueden diferenciarse en cualquier tipo celular de las tres capas germinales (Figura 6) y las células troncales no embrionarias, multipotentes; debido a que su capacidad de diferenciación se limita sólo al tejido a donde residen (Lee y Hui, 2006).

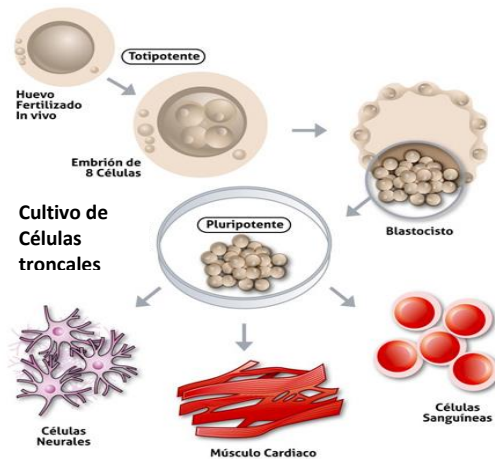


Figura 6.- Obtención, cultivo y diferenciación de células troncales embrionarias.

El término “potencialidad”, se refiere a la capacidad que tienen las células troncales para diferenciarse. Las células troncales “totipotentes” se producen de la fusión del óvulo y el espermatozoide. Las células derivadas de las primeras divisiones subsecuentes a la unión de los núcleos de las células germinales tienen características totipotenciales. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en tipos celulares embrionarios y extraembrionarios. Se sabe que únicamente las células de la mórula son capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares, incluyendo los de placenta. Las células troncales “pluripotentes” provienen de las células totipotentes y pueden diferenciarse en cualquier tipo celular de las 3 capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), pero no en tipos celulares extraembrionarios (placenta). Las células pluripotentes se localizan en el blastocisto, el cual es un estado del desarrollo embrionario exclusivo de los mamíferos; es el estado en el cual el embrión se adhiere a las paredes del útero. Las células troncales “multipotentes” sólo pueden producir células estrechamente relacionadas con ellas, por ejemplo, las células troncales hematopoyéticas. Un último tipo, es el de las células troncales “unipotentes”, las cuáles pueden diferenciarse únicamente en un tipo celular específico, pero tienen la capacidad de autorenovarse (Avasti *et al.*, 2008).

La capacidad para dirigir la diferenciación de las células troncales embrionarias hacia determinados tipos celulares específicos puede ser de amplia utilidad en medicina regenerativa (Loh *et al.*, 2006).

Se han descrito varios reguladores clave que mantienen la autorenovación y el estado pluripotente de las células troncales embrionarias, tales como: OCT3/4, Nanog y SOX2; los dos primeros son comúnmente utilizados como marcadores para determinar el estado pluripotente de las células troncales (Avasti *et al.*, 2008).

OCT3/4 es un regulador transcripcional de la familia POU con una expresión restringida a embriones tempranos, células de linaje germinal y células indiferenciadas (células cancerígenas embrionarias, células germinales embrionarias y células troncales embrionarias) (Smith, 2001).

Las proteínas Oct comprenden una subfamilia de la familia de factores de transcripción POU (por Pit, Oct y Unc) y que se unen a una secuencia consenso, el octámero: ATGCAAAT. La familia de proteínas POU, comparten el dominio POU, el cual es un dominio bipartita de anclaje a ADN, el cual está constituido por los subdominios: POU_S (dominio específico) y POU_H (homeodominio). Estos dos subdominios, conectados por una región enlazadora variable, forman estructuras independientes e individualmente hacen contactos específicos de secuencia con secuencias blanco de ADN afines (Okumura *et al.*, 2005).

En el blastocisto, OCT3/4 (tanto en mRNA como proteína) se encuentra presente en la Masa Celular Interna (MCI), pero no en el trofoectodermo. OCT3/4 puede actuar ya sea reprimiendo o activando genes de transcripción específicos. También regula la expresión de múltiples genes interactuando con al menos otros dos factores de transcripción presentes en las células pluripotentes: E1A – like activity y la proteína HGM – box SOX2 (Nichols *et al.*, 1998).

La proteína OCT3/4 se encuentra expresada en el núcleo de las 8 células embrionarias y en todas las células subsecuentes al estado de la mórula. Cuando el embrión se desarrolla en el blastocisto, se forma el trofoectodermo en la capa externa del embrión y es el primer linaje celular con una especificación. La expresión de OCT3/4 es suprimida en las células del trofoblasto, mientras que su expresión continua en la MCI que mantiene la pluripotencialidad para generar tejidos extraembrionarios (excepto el trofoblasto) y todos los tipos celulares fetales incluyendo a las células germinales. Después de la implantación, la expresión de OCT3/4 es observada en el epiblasto, y que subsecuentemente es regulada negativamente durante la gastrulación. En los estados tardíos del desarrollo embrionario, OCT3/4 es expresada únicamente en las células germinales primordiales. *In vitro*, OCT3/4 se expresa en células troncales embrionarias (CTE) y células embrionarias cancerígenas (CEC); su expresión baja o se suprime cuando dichas células son inducidas a diferenciarse. Se ha demostrado que la expresión de OCT3/4 juega un papel importante en la producción de células totipotenciales y pluripotenciales, embriones con una delección en el gene que expresa la proteína pueden llegar al estado de blastocisto, pero las células pluripotentes que forman la MCI se diferencian en células del trofoblasto, por lo que la MCI no se establece. OCT3/4 no controla la pluripotencia de las células por la expresión o restricción de la misma, sino que son niveles precisos en su expresión lo que define el destino de las células troncales embrionarias. Un incremento menor de dos veces en los niveles de expresión normal causa la diferenciación en ectodermo y mesodermo, mientras que una reducción menor al 50% de la expresión normal guía hacia una diferenciación en trofoectodermo (Okumura *et al.*, 2005).

Sox2 es un cofactor transcripcional expresado tanto en células troncales embrionarias como en células neuronales. Se ha demostrado que Sox2 desempeña un papel importante en el mantenimiento de la expresión génica de las células troncales embrionarias, especialmente al formar un complejo con el factor embrionario Octamero, OCT3/4 (Tomioka *et al.*, 2002), al formar el complejo activa la transcripción de *Fgf4*, *Utf1*, *Sox2* y *Fbx15* (Kuroda *et al.*, 2005).

Sox2 es un miembro de la familia de genes conocida como SOX [HMG-box relacionados con SRY] que codifica para una serie de factores de transcripción un dominio simple de anclaje a ADN: HMG. Sox2 está involucrado directamente en la conservación del estado pluripotencial de las células que conforman al embrión durante las etapas tempranas, y al igual que Oct3/4 se expresa en la MCI, el epiblasto y las células germinales (Avilion *et al.*, 2003).

Nanog es un factor de transcripción con una función esencial en el mantenimiento de las células pluripotentes de la MCI y en el origen de las células troncales embrionarias. En condiciones de cultivo y bajo una diferenciación inducida, la sobreexpresión de Nanog es capaz de mantener la pluripotencia y la autorenovación, que son las principales características de las CTE. Asociado a la función esencial del mantenimiento de las células pluripotentes están sus patrones de expresión. La primera transcripción de Nanog aparece en las células internas de la mórula, antes de la formación del blastocisto y no es detectable después de la implantación. La expresión de Nanog reaparece en el epiblasto proximal en el día 6 del desarrollo embrionario del ratón y permanece restringida al epiblasto conforme progresa el desarrollo. Sin embargo los factores que controlan la expresión de este gen aún no han sido descritas (Rodda *et al.*, 2005).

Existe un considerable interés en la aplicación terapéutica de las células troncales derivadas del embrión o de tejidos diferenciados. Muchos esfuerzos han sido dirigidos hacia el mantenimiento del estado pluripotencial y a determinar las vías de señalización que guían hacia un linaje específico. El control de estos mecanismos puede permitir la manipulación de las células pluripotentes para desarrollar terapias de reemplazo celular o de tejidos para solucionar problemas de tejidos dañados o disfuncionales. La habilidad para poder manipular la diferenciación de las células troncales derivadas del embrión requiere entender a fondo los procesos por los cuales se establecen los diversos linajes celulares, así como también aquellos que están implicados en la diferenciación de las CTE *in vivo* (Loebel *et al.*, 2003).

2.2.2 Derivación de células ciliadas del oído interno y medicina regenerativa

Todas las células del sistema nervioso en vertebrados derivan de la placa neural, una región del epitelio columnar inducida desde el ectodermo en la superficie dorsal del embrión durante la gastrulación y desde las placodas sensoriales en la región de la cabeza. Hacia el final de la gastrulación, la placa neural comienza a plegarse y conforma el tubo neural. Las células de la cresta neural migran hacia fuera desde la parte dorsal del tubo y darán lugar a las neuronas sensoriales del sistema nervioso periférico (SNP) y a las neuronas del sistema nervioso autónomo (SNA). Las células que permanecen dentro del tubo neural formarán al cerebro y a la espina dorsal, que más tarde comprenderán el sistema nervioso central (SNC) (Wolpert *et al.*, 2007).

Embriológicamente, el oído interno se forma a partir de un engrosamiento localizado en el ectodermo, la placa ótica, una a cada lado del cerebro posterior. Ésta placa se deprime para formar la vesícula ótica. La placa ótica está situada en serie con placas similares desde las que se desarrollan los órganos de la línea lateral. El oído interno, que se desarrolla a partir de la placa ótica, se cree representa un órgano de la línea lateral altamente especializado y pertenece por tanto al *sistema acústico-lateral* (Parker y Haswell, 1987).

Las vías de señalización que guían hacia la generación del oído rudimentario, la vesícula ótica, y finalmente hacia la diferenciación de los diversos tipos celulares que conforman el oído interno están siendo gradualmente revelados. Varios factores de crecimiento han sido implicados en desempeñar papeles durante el desarrollo del oído interno, lo anterior basándose en su actividad mitogénica, actividad promotora de la supervivencia o por inducir ciertos fenotipos celulares. Entre éstas moléculas se encuentran: Factor de Crecimiento Epidermal (EGF, por sus siglas en inglés), Factor de Crecimiento parecido a la Insulina 1 (IGF-1, por sus siglas en inglés) y miembros de familia de Factores de Crecimiento de Fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) (Li *et al.*, 2003).

La vía de señalización Wnt controla la expresión de Atoh1, que es gen clave para el desarrollo del epitelio del intestino y del oído interno (Shi *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que la exposición ectópica de Atoh1 en epitelio coclear embrionario y neonatal puede generar nuevas células ciliadas (CC) sensoriales. Además, experimentos con transfección viral sugiere que Atoh1 podría dirigir la formación de nuevas CC en la cóclea de mamíferos adultos. Atoh1 inicia un programa de diferenciación que guía hacia el desarrollo de los haces ciliares, innervación dirigida y las propiedades fisiológicas de las CC endógenas. La inducción de Atoh1 resulta en una sobrerregulación de la vía de señalización Notch y la generación de células de soporte no-sensoriales que rodean a las CC ectópicas en regiones sensoriales ectópicas. Atoh1 no actúa únicamente como un potente factor de diferenciación hacia CC, también puede activar vías importantes para la estructuración del epitelio sensorial a través del control de las decisiones del destino celular y del ciclo celular (Kelly *et al.*, 2012).

Las CC dependen absolutamente de dos isoenzimas de miosina no convencionales: miosina VI y miosina VIIa; si alguna de las dos no es funcional, las CC mueren y resulta en condición de sordera. Las esterocilias en mamíferos contienen miosina VIIa, pero no miosina VI. Existen diversas miosinas distribuidas no homogéneamente en las CC (miosinas V, VI y VIIa), en las células de soporte y en sistema nervioso (Hasson, 1997; Hasson *et al.*, 1997).

Debido a la falta de regeneración endógena y a las limitaciones de las terapias disponibles, el potencial para desarrollar un tratamiento basado en la implantación de células exógenas especializadas, ofrecen nuevas alternativas. Investigaciones recientes, basadas en la terapia celular, se han enfocado en el reemplazo o restauración de las CC o de las SNGs que han sido dañadas. Las células troncales embrionarias son excelentes candidatos para la implantación biológica, debido a que poseen el potencial para proliferar y diferenciarse. La optimización de una buena estrategia de trasplante celular requiere de un gran trabajo, ya que son muchas las variables que deben de tomarse en cuenta en cada experimento. El rango del uso potencial de las diferentes células troncales y de las diversas líneas celulares, el estado del tejido del paciente y los mecanismos para poder realizar el trasplante, son algunos factores que podrían afectar la eficiencia del trasplante (Rivolta, 2013).

Para que las CTE puedan ser usadas en humanos a través de terapias basadas en medicina regenerativa, éstas células deben de ser capaces de contribuir a la regeneración de tejidos específicos en el paciente, sin la presencia de células indiferenciadas que puedan propiciar la formación de teratomas. Para esto, se requieren poblaciones homogéneas de células completamente diferenciadas y funcionales. En el embrión, el destino de una célula troncal para progresar hacia un linaje celular en particular requiere de una activación coordinada de señales inductivas e inhibitorias de los tejidos circundantes y de la capacidad de la célula para poder interpretar éstas señales. La replicación de éstas condiciones *in vitro* se puede lograr controlando la exposición de las células troncales hacia ciertos factores de crecimiento (Loebel *et al.*, 2003).

3. Antecedentes

Actualmente existen diversas líneas de investigación enfocadas en revertir los daños a nivel celular que tienen como consecuencia el desarrollo de Hipoacusia Neurosensorial (HNS). Las terapias disponibles hoy en día consisten en implemento de audífonos e implantes cocleares, dispositivos prostéticos que si bien han demostrado una alta efectividad, no reemplazan totalmente la complejidad de un órgano biológico. Algunas de las estrategias con las que actualmente se experimenta para lograr la regeneración de las células ciliadas y/o de las neuronas ganglionares en espiral incluyen el reemplazo de las células dañadas a través de células troncales cultivadas *ex vivo*; la administración directa de factores de crecimiento/neurotrofinas para la reprogramación y posterior especialización de células adyacentes a las células neurosensitivas a través de la manipulación de genes clave por medio de vectores virales que puedan guiar la diferenciación de las células de soporte hacia células ciliadas (Rivolta, 2013).

En 2003, Li y colaboradores lograron derivar células ciliadas a través del uso de cuerpos embroides (EB's por sus siglas en inglés), para posteriormente ser cultivados en presencia de tres factores de crecimiento implicados en el desarrollo y maduración del oído interno durante la gestación del embrión en mamíferos.

Bermingham *et al.* en 1999 lograron diferenciar células ciliadas en órganos de Corti dañados, forzando la expresión de un gen clave en el desarrollo y maduración de CC implementado la transfección con adenovirus con una secuencia codificante para el Math1/Atoh1. Más tarde, en 2005 Izumukawa *et al.* lograron derivar células ciliadas funcionales en cócleas de conejillos de las Indias previamente dañadas por el mismo método.

También se han logrado derivar células ciliadas a partir de células troncales trasplantando éstas últimas directamente en cócleas dañadas en conejillos de las Indias, puesto que las características que poseen las CTE para diferenciarse en cualquier tipo celular aunado al

entrar en contacto con los tipos celulares que existen en órgano de Corti puede promover la diferenciación de las CTE hacia CC (Coleman *et al.*, 2006).

Más recientemente, Oshima *et. al* en 2010 obtuvieron células ciliadas similares a las que existen en la cóclea a partir de CTPi (Células Troncales Pluripotentes inducidas), la diferenciación fue realizada al exponer EB's a factores de crecimiento e inhibidores de vías de señalización específicas que podrían estar involucradas en el desarrollo del oído interno y sus derivados celulares durante la gestación; las células obtenidas fueron mecanosensitivas, lo anterior fue determinado por pruebas de patch-clamp.

Las técnicas antes mencionadas son prometedoras en cuanto a la regeneración de las células ciliadas; sin embargo, se encuentran lejos de una aplicación clínica ya que son muchas las limitantes que presentan. El uso de técnicas de co-cultivo tendría riesgos para el paciente debido a que en la mayoría de los casos las células alimentadoras que se utilizan son de origen animal y permiten la introducción de agentes desconocidos; tal es el caso de algunos factores de crecimiento. En el caso de los EB's los procesos de diferenciación son escasamente controlados, lo que trae como consecuencia la generación espontánea. La implementación directa de CTE da origen a teratocarcinomas. El uso de terapias génicas basadas en uso de virus no garantizan la ausencia de complicaciones y efectos secundarios a largo plazo.

La complejidad estructural del oído interno, sumado a las dificultades para derivar y aislar un tipo celular en específico, es por lo que aún no existe una estrategia definitiva en regeneración auditiva (Rivolta, 2013). Por lo que idealmente, para considerar una terapia de replazo celular de células ciliadas del oído interno (CCOI); es necesario generar poblaciones “puras” de CCOI especializadas; siempre bajo esquemas de cultivo y diferenciación con medios químicamente definidos y con un control completo del proceso de diferenciación.

4. Justificación

Actualmente los protocolos reportados para diferenciar células ciliadas del oído interno a partir de células troncales embrionarias, utilizan la producción de cuerpos embriones, técnicas de co-cultivo o transfección viral. El uso de estas estrategias tiene como consecuencia la diferenciación espontánea y un escaso control sobre la diferenciación en las primeras etapas; así como también, cuestiones de seguridad por el uso de virus durante la transfección. Las terapias de reemplazo celular, requieren de un estricto control de los procesos de diferenciación; aunado al uso de agentes conocidos y de bajo o nulo riesgo de bioseguridad para su uso clínico. El presente trabajo pretende establecer un modelo de diferenciación dirigida a través de cultivo en monocapa, utilizando medios químicamente definidos, evitando la formación de cuerpos embrionarios así como el uso de suero fetal bovino para así poder tener un mayor control sobre el proceso de diferenciación.

5. Hipótesis

El uso de un medio químicamente definido durante la diferenciación de células troncales embrionarias (E14Tg2a) de ratón nos permitirá obtener células ciliadas del oído interno como un modelo de diferenciación dirigida.

6. Objetivos

6.1 General

Establecer un modelo de diferenciación dirigida para obtener una población de células ciliadas del oído interno a partir de células troncales (E14Tg2a) de ratón utilizando un medio químicamente definido y en condiciones microambientales sin células alimentadoras.

6.2 Particulares

- Determinar el estado pluripotente de las células troncales embrionarias (E14Tg2a) a través de los marcadores OCT $\frac{3}{4}$ y Nanog, utilizando el ensayo de inmunocitoquímica y la técnica de citometría de flujo.
- Realizar una cinética de proliferación de las células troncales embrionarias (E14Tg2a) de ratón para determinar la tasa de proliferación.
- Establecer las condiciones óptimas para el proceso de diferenciación mediante la evaluación de dos condiciones de cultivo diferentes a través del uso de dos diferentes medios de cultivo químicamente definidos.
- Evaluar el estado de diferenciación de las células ciliadas del oído interno a través del marcaje de las proteínas Math1/Atoh1 y Miosina VIIa, utilizando el ensayo de inmunocitoquímica.

- Establecer la cinética de proliferación durante el proceso de diferenciación para determinar la tasa de diferenciación y proliferación durante dicho proceso.

7. Materiales y Métodos

7.1 Cultivo y mantenimiento de CTER (línea celular E14Tg2a)

Para el mantenimiento de las CTER en su estado pluripotente se utilizó medio GMEM (Glasgow's Minimal Essential Medium por sus siglas en inglés; SIGMA, EUA) adicionado con Suero Fetal Bovino (FBS por sus siglas en inglés; Gibco, EUA) a una concentración de 9.2% (v/v), L-glutamina 200 mM (Gibco, Brasil)/piruvato sódico (Gibco, China) a una concentración de 1.9% (v/v), aminoácidos no esenciales (Gibco, EUA) 0.9% (v/v), 0.009% (v/v) de 2-β mercaptoetanol (SIGMA, Japón) 0.1M y 1×10^6 unidades/ml de Factor Inhibidor de Leucemia de ratón recombinante, liofilizado (LIF por sus siglas en inglés; Gibco, EUA). Adicionalmente se utilizó medio GMEM no completo para inactivar a la tripsina durante el subcultivo de las CTER, el medio GMEM-No completo contiene los mismos elementos y concentraciones que el medio GMEM-Completo, con la diferencia que a éste no se le agregó LIF.

Se utilizaron Células Troncales Embrionarias “E14Tg2a” de Ratón donadas por el “Grupo de Medicina Regenerativa y Bioprocesos de Células Troncales” (University College of London, UK) las cuales cuentan con las siguientes características: células troncales embrionarias derivadas del blastocisto de ratón (*Mus musculus*), adaptadas para ser co-cultivadas sin fibroblastos, y contenidas en un criovial. Las células fueron criopreservadas en nitrógeno líquido.

Para descongelar a las células y comenzar su cultivo se realizó lo siguiente: se preparó una placa de cultivo de 6 pozos adicionando gelatina porcina (SIGMA, EUA) 0.1% (p/v), se dejó reposar por 30 minutos para generar una película sobre la superficie del pozo que sirvió como matriz para que las células pudieran adherirse. El criovial se descongeló a 37 °C en baño María, el medio que ayuda a la criopreservación celular es altamente tóxico a temperatura ambiente debido a que contiene Dimetil-Sulfóxido (DMSO por sus siglas en inglés; SIGMA, EUA); el cual evita la cristalización del agua contenida dentro de las células, por lo que las células tuvieron que ser cultivadas en un lapso no mayor a 7 minutos.

Se extrajo el contenido del criovial el cual contenía a las células, y se pasaron a un tubo para centrifuga de 15 ml al cual se le adicionaron 5 ml de medio GMEM completo para continuar con la centrifugación durante 4 minutos a 1500 rpm El sobrenadante fue retirado y desechado evitando romper el pellet formado en el fondo del tubo; se hizo una resuspensión lenta para disgregar el pellet, las células se encuentran en un estado de estrés por el congelamiento, por lo que una resuspensión rápida podría reducir en gran medida la viabilidad celular. Se resuspendió en 1 ml de medio completo; el procedimiento se llevó a cabo dos veces para eliminar el DMSO; la segunda resuspensión del pellet se llevó cabo en 2 ml de medio GMEM completo, se agregó al pozo de la placa de cultivo (previamente se retiró la gelatina una vez concluidos los 30 minutos). Las células fueron cultivadas en una incubadora (Sanyo-Panasonic modelo MCO – 19AICUV – PA) en condiciones estándar de 37°C temperatura y una atmósfera controlada de CO₂ al 5%.

El cultivo fue observado 24 horas después de la inoculación para comprobar que las células fueran viables, estuvieran adheridas a la superficie y formaran colonias. Durante la fase exponencial de crecimiento, se observó en el cultivo una confluencia aproximada del 70%, lo cual indicó que se debía de realizar el primer pasaje. El pasaje se realizó retirando y desechando el medio gastado, haciendo un lavado con DPBS sin Ca²⁺/Mg²⁺ (ATCC, EUA), se agregó 1 ml de Tripsina 1X [solución compuesta por: 1% de suero de pollo (Gibco, Nueva Zelanda), 1% de tripsina 2.5% (Gibco, EUA) y 0.036% de ácido etildiaminotetraacético (EDTA por sus siglas en inglés; Gibco, EUA) diluidos en DPBS sin Ca²⁺/Mg²⁺], se incubó durante 5 minutos a 37°C. La tripsina es una proteasa, por lo que es utilizada para degradar la matriz extracelular y así desprender a las células de la superficie. Concluido el lapso de tiempo, la tripsina fue inactivada agregando 2 ml de medio no completo, la suspensión celular se recuperó en un tubo de centrifuga de 15 ml, se llevó a cabo una centrifugación a 1500 rpm durante 4 minutos. El sobrenadante fue retirado y desechado, la resuspensión del pellet se realizó utilizando 9 ml de medio GMEM-Completo; la suspensión celular fue repartida en tres pozos de una placa de cultivo de 6 pozos (3 ml por pozo). A los 3 pozos de les agregó previamente gelatina porcina 0.1%, la cual fue retirada a los 30 minutos para poder llevar a cabo la inoculación de las células. Las células fueron cultivadas a 37 °C – 5% de CO₂ durante 48 horas.

Estabilizar un cultivo recién descongelado puede tomar de 1 a 2 semanas, las colonias de células deben tener una morfología como las que aparecen en la Figura 7. Los pasajes se realizaron durante la fase de crecimiento exponencial considerando la confluencia de los cultivos, la cual debe de ser mayor al 70%.

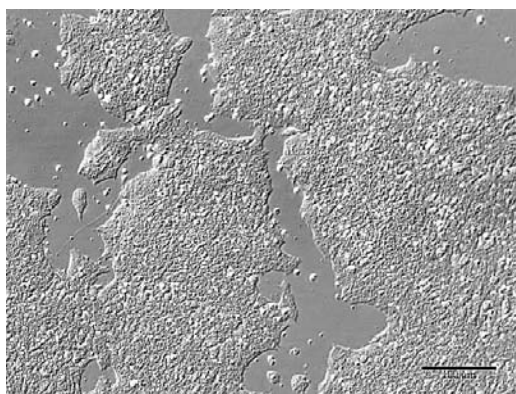


Figura 7.- Microfotografía de colonias de CTER obtenidas después de 48 h de incubación. Objetivo 10x.

7.2 Criopreservación

7.2.1 Banco Maestro

El banco maestro se generó durante los primeros pasajes celulares, una vez que los cultivos fueron estables. La expansión de los cultivos consistió en transferir a las células a recipientes con un área mayor durante cada pasaje, tomando en cuenta el número de células y el área en cm^2 del recipiente al cual serían transferidas.

Cada pozo de una placa de cultivo de 6 pozos posee un área de 10 cm^2 , después de cultivar a las células durante 48 horas se pueden obtener aproximadamente 2×10^6 células $\cdot 10 \text{ cm}^2$, debido a lo anterior por cada pozo de una placa de cultivo de 6 pozos se pueden obtener una placa de 6 pozos completa, o de 2 a 3 frascos T-25, los cuales son llamados de esta forma debido a que poseen un área de 25 cm^2 .

La primera expansión se realizó con los primeros 3 pozos de una placa de cultivo de 6 pozos obtenidos 1 semana después del descongelamiento de las células, las células se subcultivaron a 9 frascos T-25 y se cultivaron durante 48 horas a 37°C – 5% CO₂. Concluido el lapso de tiempo, se tomaron 7 de los frascos para generar el banco maestro. Los frascos fueron lavados con DPBS sin Ca²⁺/Mg²⁺, se agregó 1 ml de tripsina 1X, se incubó por 5 minutos a 37°C; la tripsina fue inactivada con medio GMEM-No completo, la suspensión de cada frasco se recuperó en 2 tubos de centrifuga de 15 ml, centrifugando a 1500 r.p.m. durante 4 minutos, el sobrenadante fue retirado y desechado cuidando de no disgregar el pellet; las células fueron resuspendidas en 7 ml de medio GMEM-Completo adicionado con 10% (v/v) de DMSO para finalmente ser almacenadas en 7 crioviales (1 ml de la suspensión por cada vial). La criopreservación se realizó en nitrógeno líquido. Se obtuvieron 7 viales del pasaje 3. Los 2 frascos T-25 restantes fueron expandidos a 6 frascos T-25 y cultivados a 37°C-5% CO₂.

7.2.2 Banco de Trabajo

El procedimiento para la elaboración del banco de trabajo fue el mismo que el descrito para el banco maestro, con la diferencia que la expansión se realizó en frascos T-75; por cada frasco T-75 se obtuvieron 3 viales para criopreservación. Se realizaron 6 bancos de trabajo en los pasajes 5, 7, 9, 43, 44 y 50. Los bancos de trabajo fueron criopreservados en nitrógeno líquido.

7.3 Evaluación del estado pluripotente de las CTER mediante citometría de flujo

Para evaluar el estado pluripotente mediante ésta técnica se utilizó un frasco T-25 que contenía CTER con 48 horas de cultivo. Las células fueron tripsinizadas y recuperadas en 1 ml de DPBS 1X sin Ca²⁺/Mg²⁺ y colocadas dentro de un tubo para centrifuga de 15 ml, se centrifugaron por 4 minutos a 1500 rpm para retirar el exceso de medio. El sobrenadante fue retirado y desechado, el pellet se resuspendió en 900 µl de PBS 1X (Gibco, EUA), posteriormente a 3 pozos de una placa de cultivo de 96 pozos se agregaron 300 µl de la suspensión celular a cada uno. Se centrifugó la placa durante 4 minutos a 2500 rpm,

transcurrido el tiempo el sobrenadante fue retirado y desechado teniendo cuidado de no extraer el pellet formado en el fondo del pozo. El inmunomarcaje se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el anexo de los anticuerpos. A cada pozo se le agregaron 100 μ l de paraformaldehído (Sigma, Alemania) 4% (v/v) para fijar a las células, los pozos se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, el siguiente paso consistió en centrifugar la placa a 2500 rpm durante 4 minutos. El sobrenadante fue retirado y desechado; se realizaron 3 lavados con PBS 1X (entre cada lavado se resuspendió el pellet y se centrifugó a 2500 rpm durante 4 minutos). La permeabilización de las muestras se realizó resuspendiendo los pellets de los pozos en 100 μ l de solución de bloqueo [solución compuesta por de 0.05% de suero de cabra (Invitrogen, EUA) + 0.25% de Triton 100X (SIGMA, EUA) diluidos en PBS 1X] incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. El proceso de lavado para retirar el exceso de solución de bloqueo fue el mismo descrito para retirar el exceso de paraformaldehído. A uno de los pozos se le agregaron 100 μ l de Anti-OCT3/4 conjugado con AlexaFluor 488 (1: 100; Millipore, EUA); otro pozo fue tratado con 100 μ l del anticuerpo Anti-Nanog Alexa conjugado con AlexaFluor 488 (1:10; Millipore, EUA), ambos pozos fueron cultivados en la oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente. Para retirar el exceso de anticuerpo se realizaron 3 lavados con PBS 1X (entre cada lavado se resuspendió el pellet y se centrifugó a 2500 rpm durante 4 minutos). Uno de los pozos no fue expuesto a los anticuerpos primarios, pero sí al anticuerpo secundario, éste se utilizó como control negativo.

Las muestras se analizaron por triplicado en el Citometro de Flujo Guava EasyCyte 5HT. Utilizando el software GuavaSoft Incyte 2.7.

7.4 Evaluación del estado pluripotente de las CTER a través de la técnica de Inmunocitoquímica (ICQ)

Se utilizaron 3 pozos de una placa de cultivo de 6 pozos los cuales contenían CTER en la fase exponencial de cultivo. El medio fue retirado y desechado, se hicieron dos lavados con DPBS 1X sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ para eliminar completamente el medio de cultivo. A cada pozo se agregó paraformaldehído 4% (v/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente para fijar a

las células. Transcurridos los 20 minutos, las células fueron lavadas 3 veces (4 minutos entre cada lavado) con PBS 1X para eliminar el exceso de paraformaldehído. Después de los lavados, a cada pozo le fue agregado 1 ml de solución de bloqueo (solución compuesta de 0.05% suero de cabra + 0.25 de Triton 100X diluidos en PBS 1X), para permeabilizar las membranas celulares la solución se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente hacer 3 lavados con PBS 1X (4 minutos entre cada lavado) para quitar el exceso de la solución bloqueadora. Tras el procedimiento ya descrito a uno de los pozos se le agregó 400 μ l de Anti-OCT3/4 conjugado con AlexaFluor 488 (1: 100); otro pozo fue tratado con 400 μ l del anticuerpo primario Anti-Nanog (1:200; Abcam, EUA), ambos pozos fueron incubados en la oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente. Para retirar el exceso de anticuerpo los pozos fueron lavados 3 veces con PBS 1X (4 minutos entre cada lavado). Debido a que el anticuerpo para Nanog no tenía incorporado el fluorocromo se tuvo que agregar un anticuerpo secundario, como anticuerpo secundario se utilizó Goat TRITC Anti-Mouse (1:200; Abcam, EUA) incubado en la oscuridad durante 60 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el lapso de tiempo se hicieron 3 lavados con PBS 1X para eliminar el exceso de TRITC. Por último, a los 3 pozos se le agregó DAPI (a una concentración de 300 mM; Molecular Probes, EUA) se incubaron por 5 minutos en la oscuridad para teñir los núcleos celulares, los pozos fueron lavados con PBS 1X para retirar el exceso de DAPI, el pozo al cual no se le agregaron los anticuerpos para los marcadores se tomó como control negativo.

Las muestras se observaron al microscopio OLYMPUS IX71 modificado para detectar fluorescencia, a un aumento de 10x, se utilizó el software ImageProPlus Versión 5.1 para Windows para el análisis de imágenes, así como para la captura de microfotografías.

7.5 Cuantificación del área de Células Troncales Embrionarias de Ratón.

Una vez adquiridas las imágenes de inmunocitoquímica; con ayuda del software Image J 1.48v (NIH), se cuantificó el área (μm^2) de células positivas para los marcadores de células troncales pluripotentes OCT3/4 y Nanog, seguido de la cuantificación del área total (μm^2) de células positivas para DAPI. Se estimó el porcentaje de área positiva para los

marcadores de células troncales pluripotentes OCT3/4 y Nanog, considerando el área total cubierta con DAPI como 100%. Los resultados, se presentan como un promedio mostrando las desviaciones estándar, de 2 diferentes fotografías para cada marcador, evaluados en la fase exponencial de proliferación.

7.6 Cinética de proliferación de las Células Troncales Embrionarias de Ratón

Para realizar la cinética de proliferación se utilizaron 6 placas de cultivo de 6 pozos. A cada uno de los pozos se les adicionaron 1 ml de gelatina 0.1%, se dejó reposar durante 30 minutos para generar una película de gelatina porcina en la que las células se adhirieran. La expansión se realizó con un frasco T-25; las células se fueron despegadas de la superficie de cultivo utilizando tripsina 1X y recuperadas como se ha descrito previamente. En cada pozo se inocularon en promedio 1×10^4 células·cm⁻², renovando el medio cada 48 horas.

Cada 24 horas se realizó la recuperación de células utilizando tripsina 1X para obtener células de 3 pozos (mediante procesos independientes). Se tomaron 50 µl de la suspensión de células recuperadas y se adicionó 50 µl de azul de tripano 4% (p/v) el cual permea a las células muertas y se puede visualizar al microscopio como células teñidas de azul. La mezcla fue resuspendida gentilmente durante varios segundos para homogeneizar. De la muestra se colectaron 10 µl, y se colocaron en una cámara de Neubauer para realizar el conteo y viabilidad de las células utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Células} \cdot \text{ml}^{-1} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Número de cuadrantes}} \times \text{factor de dilución} \times 10^4 \dots\dots\dots \text{(Ecuación 1)}$$

Células Totales: $\text{Células} \cdot \text{ml}^{-1}$ (resultado anterior) x Volumen total de la muestra..... (Ecuación 2)

Ecuación 3: Viabilidad celular: $\frac{\text{Células vivas}}{(\text{Células vivas} + \text{Células muertas})} \times 100 \dots\dots\dots \text{(Ecuación 3)}$

Mientras que para calcular la tasa de crecimiento específico en un lapso de tiempo dado, así como el tiempo de duplicación se utilizaron las ecuaciones:

$$\mu = \frac{[\ln \frac{x_2}{x_1}]}{t_2 - t_1} \dots\dots\dots \text{(Ecuación 4)}$$

Dónde:

μ = Tasa de proliferación específica

X_1 = Concentración celular del primer lapso de tiempo

X_2 = Concentración celular del segundo lapso de tiempo

t_1 = Tiempo inicial de la fase a analizar

t_2 = Tiempo final de la fase a analizar

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu} \dots\dots\dots \text{(Ecuación 5)}$$

Dónde:

T_d = tiempo de duplicación

μ = Tasa de proliferación específica

7.7 Evaluación de dos medios de cultivo químicamente definidos para el proceso de diferenciación

Se evaluaron dos medios de cultivo celular para determinar cuál era óptimo para realizar el proceso de diferenciación de células troncales embrionarias hacia células ciliadas del oído, los medios evaluados fueron medio F-12K (ATTC, EUA) y medio GMEM (SIGMA, EUA).

La evaluación se llevó a cabo de acuerdo al siguiente diseño experimental: a cada pozo de 4 placas de cultivo (de 6 pozos) se les agregó 1 ml de gelatina 0.1% durante 30 minutos, transcurrido el tiempo la gelatina fue retirada y desechada, en cada pozo se inocularon 1×10^4 células·cm⁻² obtenidas a través del uso de tripsina y recuperadas en medio GMEM-No completo para iniciar el proceso de diferenciación celular. Las células fueron incubadas

durante 16 horas a condiciones estándar de cultivo de 37°C temperatura y atmósfera controlada de 5% de CO₂.

Transcurrido el tiempo, el medio GMEM-No completo fue retirado; se hizo un lavado con DPBS 1X sin Ca²⁺/Mg²⁺, a 12 pozos se les agregó 2 ml de medio GMEM adicionado con L-glutamina 200 mM/piruvato sódico a una concentración de 1.9% (v/v), aminoácidos no esenciales 0.9% (v/v), 0.009% (v/v) de 2-β mercaptoetanol 0.1M, 50 ng·ml⁻¹ de Factor de Crecimiento parecido a la Insulina-1 (IGF-1 por sus siglas en inglés; Gibco, EUA), 20 ng·ml⁻¹ de Factor de Crecimiento Epidermal (EGF por sus siglas en inglés; Invitrogen, EUA) y 1% (v/v) suplemento N2 (Gibco, EUA). A los 12 pozos restantes se les agregaron 2 ml de medio F-12K adicionado con 50 ng·ml⁻¹ de IGF-1, 20 ng·ml⁻¹ de EGF y 1% (v/v) suplemento N2. Las células fueron incubadas a 37°C de temperatura y atmósfera controlada de 5% de CO₂, el medio fue renovado cada 48 horas durante un periodo total de 240 horas.

Transcurridas las 240 horas de cultivo en 12 pozos el medio fue sustituido por medio GMEM adicionado con L-glutamina 200 mM/piruvato sódico a una concentración de 1.9% (v/v), aminoácidos no esenciales 0.9% (v/v), 0.009% (v/v) de 2-β mercaptoetanol 0.1M, 50 ng·ml⁻¹ de IGF-1, 20 ng·ml⁻¹ de EGF, 10 ng·ml⁻¹ de Factor de crecimiento de Fibroblastos (bFGF por sus siglas en inglés; BIOSOURCE, USA), 1% (v/v) suplemento N2. A los 12 pozos restantes se les agregó medio F-12K adicionado con 50 ng·ml⁻¹ de IGF-1, 20 ng·ml⁻¹ de EGF, 10 ng·ml⁻¹ de bFGF y 1% (v/v) suplemento N2 (Gibco; EUA). Las células fueron incubadas a 37°C de temperatura y atmósfera controlada de 5% de CO₂, el medio fue renovado cada 48 horas durante un periodo total de 192 horas.

Después de las 192 horas de cultivo las células cultivadas en medio GMEM adicionado con los factores de crecimiento fue reemplazado con GMEM adicionado con L-glutamina 200 mM/piruvato sódico a una concentración de 1.9% (v/v), aminoácidos no esenciales 0.9% (v/v), 0.009% (v/v) de 2-β mercaptoetanol 0.1M, 1% (v/v) suplemento N2. En los pozos restantes el medio fue reemplazado por medio F-12K adicionado con 1% (v/v) suplemento N2. Las células fueron incubadas a 37°C de temperatura y atmósfera controlada de 5% de CO₂, el medio fue renovado cada 48 horas durante un periodo total de 240 horas. Al final

del proceso todas las placas fueron fijadas con paraformaldehído 4% (v/v) para su posterior análisis por inmunocitoquímica para marcadores de células ciliadas del oído.

Las placas fueron observadas diariamente al microscopio óptico OLYMPUS IX71, se adquirieron microfotografías con el software ImageProPlus Versión 5.1 para Windows para evaluar la proliferación celular en cada uno de las diferentes condiciones de cultivo.

7.8 Proceso de diferenciación de las CTER hacia CCOI

Se utilizaron CTER E14Tg2a, el protocolo de diferenciación fue modificado del método reportado por Li *et al.* 2003. El proceso de diferenciación propuesto consta de 3 etapas (Figura 8): **1) Diferenciación de CTER hacia Células Progenitoras Neurales (CPN)**, a 27 pozos de placas de cultivo de 6 pozos fueron tratados con gelatina porcina 0.1% durante 30 minutos, transcurrido el tiempo la gelatina fue retirada y desechada. A cada pozo se agregaron 2 ml de medio GMEM-No completo con una concentración aproximada de 1×10^4 CTER \cdot cm⁻², las células fueron cultivadas durante 16 horas para promover la adhesión. Transcurrido el tiempo el medio GMEM-No completo fue retirado, se hizo un lavado con DPBS 1X sin Ca²⁺/Mg²⁺, y a cada pozo se le agregaron 2 ml de medio GMEM adicionado con L-glutamina 200 mM/piruvato sódico a una concentración de 1.9% (v/v), aminoácidos no esenciales 0.9% (v/v), 0.009% (v/v) de 2-β mercaptoetanol 0.1M, 50 ng·ml⁻¹ de IGF-1, 20 ng·ml⁻¹ de EGF y 1% (v/v) suplemento N2. Las células fueron incubadas a 37°C de temperatura y atmósfera controlada de 5% de CO₂, el medio fue renovado cada 48 horas durante un periodo total de 240 horas. **2) Expansión de las CPN** (obtenidas de la primera etapa); Transcurridas las 240 horas de cultivo el medio fue sustituido por medio GMEM adicionado con L-glutamina 200 mM/piruvato sódico a una concentración de 1.9% (v/v), aminoácidos no esenciales 0.9% (v/v), 0.009% (v/v) de 2-β mercaptoetanol 0.1M, 50 ng·ml⁻¹ de IGF-1, 20 ng·ml⁻¹ de EGF, 10 ng·ml⁻¹ de bFGF, 1% (v/v) suplemento N2. Las células fueron incubadas a 37°C de temperatura y atmósfera controlada de 5% de CO₂, el medio fue renovado cada 48 horas durante un periodo total de 192 horas. **3) Especialización de las CPN hacia CCOI**; después de las 192 horas de cultivo el medio fue sustituido por medio GMEM adicionado con L-glutamina 200 mM/piruvato sódico a una

concentración de 1.9% (v/v), aminoácidos no esenciales 0.9% (v/v), 0.009% (v/v) de 2-β mercaptoetanol 0.1M, 1% (v/v) suplemento N2. Las células fueron incubadas a 37°C de temperatura y atmósfera controlada de 5% de CO₂, el medio fue renovado cada 48 horas durante un periodo total de 240 horas. Al final del proceso todas las placas fueron fijadas con paraformaldehído 4% (v/v) para su posterior análisis por inmunocitoquímica para células ciliadas del oído.



Figura 8.- Protocolo de diferenciación. El protocolo que proponemos consta de 3 etapas: Obtención de Células Precursoras Neurales (CNP), expansión de CNP y especialización de células ciliadas del oído.

7.9 Evaluación de la especialización celular mediante la técnica de inmunocitoquímica

Para determinar la presencia de CCOI al final del proceso de diferenciación se utilizaron dos marcadores: Miosina VIIa y Math1/Atoh1; sin embargo la coexpresión de ambos es necesaria para concluir que se cumplió el objetivo principal.

Después de 240 horas de cultivo, a dos de las placas de cultivo de 6 pozos les fue retirado el medio, se lavaron 2 veces cada uno de los pozos para remover los restos de medio, a cada pozo le fue agregado 1 ml de paraformaldehído 4% (v/v), incubando por 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados (dejando reposar durante 4 minutos entre cada lavado) con PBS 1X. Una vez retirado el PBS se agregó 1 ml de solución permeabilizadora (0.25% Triton 100X diluidos en PBS 1X) a cada pozo, incubando las células por un lapso de 30 minutos a temperatura ambiente. Concluidos los 30 minutos la solución fue retirada y desechada, sustituida por la 1ml/pozo de solución bloqueadora (0.05% suero de cabra + 0.25% Tritón 100X diluidos en PBS 1X), se conoce que el suero de cabra bloquea los sitios inespecíficos permitiendo una unión antígeno-anticuerpo más específica, las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 20

minutos, posteriormente se hicieron 3 lavados (dejando el PBS 1X por 4 minutos entre cada lavado). Cuatro pozos fueron tratados con el anticuerpo primario anti-Myosin VIIa anti-mouse (1:200; Abcam, EUA), 2 pozos con el anticuerpo primario anti-Math1/Atoh1 anti-mouse (1:200; Abcam, EUA), a otros 2 pozos no se les agregó ningún anticuerpo primario dado que serían los controles negativos. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios durante 60 minutos a temperatura ambiente, para eliminar el exceso de los anticuerpos se realizaron 3 lavados con PBS 1X (4 minutos entre cada lavado) al finalizar el tiempo de incubación. Dado que ninguno de los dos anticuerpos estaba conjugado, se incorporó como anticuerpo secundario FITC anti-mouse (1:200; Abacm, EUA) para los pozos tratados con el anticuerpo anti-Myosin VIIa ant-mouse y el fluorocromo TRITC anti-mouse (1:200; Abcam, EUA) para los pozos tratados con el anticuerpo primario anti-Math1/Atoh1. El exceso de los anticuerpos secundarios se retiró mediante 3 lavados con PBS 1X. Los núcleos celulares fueron teñidos con 300 μ l de DAPI [300 mM], incubados en la oscuridad durante 5 minutos a temperatura; éste proceso se llevó a cabo en 2 pozos tratados con el anticuerpo para Miosina VIIa, 2 pozos tratados con el anticuerpo Math1/Atoh1, así como uno de los pozos que se tomó como control negativo. Los dos pozos restantes con los anticuerpos anti-Myosin VIIa-FITC incorporados fueron almacenados sin teñir sus núcleos, el ensayo de coexpresión consistió en agregar el anticuerpo primario AntiMath1/Atoh1 a los dos pozos tratados con Miosina VIIa que no tenían los núcleos teñidos con DAPI, las células se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente, el exceso de anticuerpo fue retirado mediante 3 lavados con PBS 1X (84 minutos entre cada lavado) e incorporando posteriormente el anticuerpo secundario TRITC, de nuevo se realizaron 3 lavados con PBS 1X, finalizando con la tinción nuclear mediante el proceso antes mencionado. Dos pozos no fueron expuestos a los anticuerpos primarios (Miosina VIIa y Math1/Atoh1), pero sí a los anticuerpos secundarios (FITC -C y TRIT-C), éstos se utilizaron como control negativo.

El procedimiento descrito previamente se realizó de la misma forma para las células obtenidas a las 480 horas; así como también a las 672 horas de cultivo, tiempo en el que se finalizó el proceso de diferenciación.

Las muestras fueron analizadas con un microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS IX71); con el aumento de 10x, se obtuvieron microfotografías de cada tiempo de cultivo muestreado con el software ImageProPlus Versión 5.1 para Windows.

7.10 Cuantificación del área de Células Ciliadas del Oído Interno.

Una vez adquiridas las imágenes de inmunocitoquímica; con ayuda del software Image J 1.48v (NIH), se cuantificó el área (en μm^2) de células positivas para los marcadores de células ciliadas del oído interno Miosina VIIa, Math1/Atoh1 y la coexpresión de ambos, seguido de la cuantificación del área total (μm^2) de células positivas para DAPI. Se estimó el porcentaje de área positiva para los marcadores de células ciliadas del oído interno Miosina VIIa, Math1/Atoh1 y la coexpresión de ambos, considerando el área total cubierta con DAPI como 100%. Los resultados, se presentan como un promedio con desviaciones estándar obtenidas de 9 diferentes microfotografías para cada marcador, a las 48h, 360h y 672h del proceso de diferenciación.

7.11 Cinética de proliferación de las CPN durante el proceso de diferenciación

Para determinar la tasa de proliferación específica, el tiempo de duplicación y obtener una gráfica en la que se pudiera observar la proliferación y la viabilidad celular durante el proceso de diferenciación una vez determinadas las condiciones de cultivo se hizo una cinética de proliferación. Las células fueron cultivadas en medio GMEM bajo las mismas condiciones descritas en el apartado 6.7 del presente manuscrito. Los tiempos en los que se recuperaron las células por medio del uso de tripsina fueron a las 240 horas, a las 480 horas y a las 672 horas de iniciado el proceso de diferenciación.

En cada uno de los pozos correspondientes a cada uno de los tiempos antes mencionados se realizó la recuperación celular por el método de tripsina para obtener células de 3 pozos (mediante procesos independientes). Se tomaron 50 μl de la suspensión de células recuperadas y se adicionó 50 μl de azul de tripán 4% (p/v) el cual permea a las células muertas y se puede visualizar al microscopio como células teñidas de azul. La mezcla fue resuspendida gentilmente durante varios segundos para homogeneizar. De la muestra se

colectaron 10 μl , y se colocaron en una cámara de Neubauer para realizar el conteo y viabilidad de las células utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3 del apartado 6.6. Para calcular la tasa de proliferación específica durante la fase de crecimiento exponencial y el tiempo de duplicación se utilizaron las ecuaciones 4 y 5 respectivamente, del mismo apartado.

Una vez obtenida la cinética de proliferación y con el número de células para cada uno de los tiempos de muestreo, se calculó el número de células que expresaban los marcadores específicos para células ciliadas. Se multiplico el % del área de expresión por el promedio de número de células $\cdot \text{cm}^{-2}$ obtenido en cada uno de los diferentes tiempos de muestreo.

Las diferencias significativas entre los datos obtenidos fueron calculadas utilizando una prueba “t de student” de dos colas. Un valor de p menor que 0.05 fue considerado significativo y las comparaciones se realizaron entre los tres diferentes tiempos de muestreo.

8. Resultados

8.1 Evaluación del estado pluripotente por citometría de flujo

Las muestras se obtuvieron de 4 experimentos independientes (cada uno por triplicado), las células fueron teñidas para los marcadores de interés de acuerdo a la técnica establecida para realizar inmunocitoquímicas. En todos los experimentos se seleccionó una región correspondiente a la población de donde se obtendría la muestra (R1). Se establecieron parámetros para delimitar a las células positivas para los marcadores, las células negativas, también aquellas que presentaban autofluorescencia (R2). El número de eventos (células) totales analizados fue de 5, 000 para los cuatro experimentos y los datos obtenidos a través del análisis por Incyte GuavaSoft 2.7 se presentaron de la siguiente forma:

En todos los casos el porcentaje de células en estado pluripotente fue mayor al 95%, el cual fue determinado por la expresión de ambos marcadores (OCT3/4 y Nanog) tal como se presenta en la Figura 9.

Para el marcador OCT3/4 se obtuvieron 4, 770 células positivas lo cual fue igual al 95.4% de los eventos totales, 148 células fueron negativas (2.96%), 81 entrecruzamientos con el canal amarillo (1.62%) y 1 evento de autofluorescencia (0.02%), en la Figura 9-a; en tanto que para la Figura 9-b, 4, 816 fueron positivas (96.32%), 169 negativas (3.38%) y 15 entrecruzamientos con el canal amarillo.

Se obtuvieron resultados similares en cuanto a la expresión del marcador Nanog: 4, 822 células positivas (96.44%), 81 negativas (1.62%) y 97 (1.94%) empalmes con el canal amarillo (Figura 9-c). Para la Figura 9-d: 4, 751 eventos positivos (95.02%), 135 negativas (2.7%) y 114 (2.28%) empalmes con el canal amarillo.

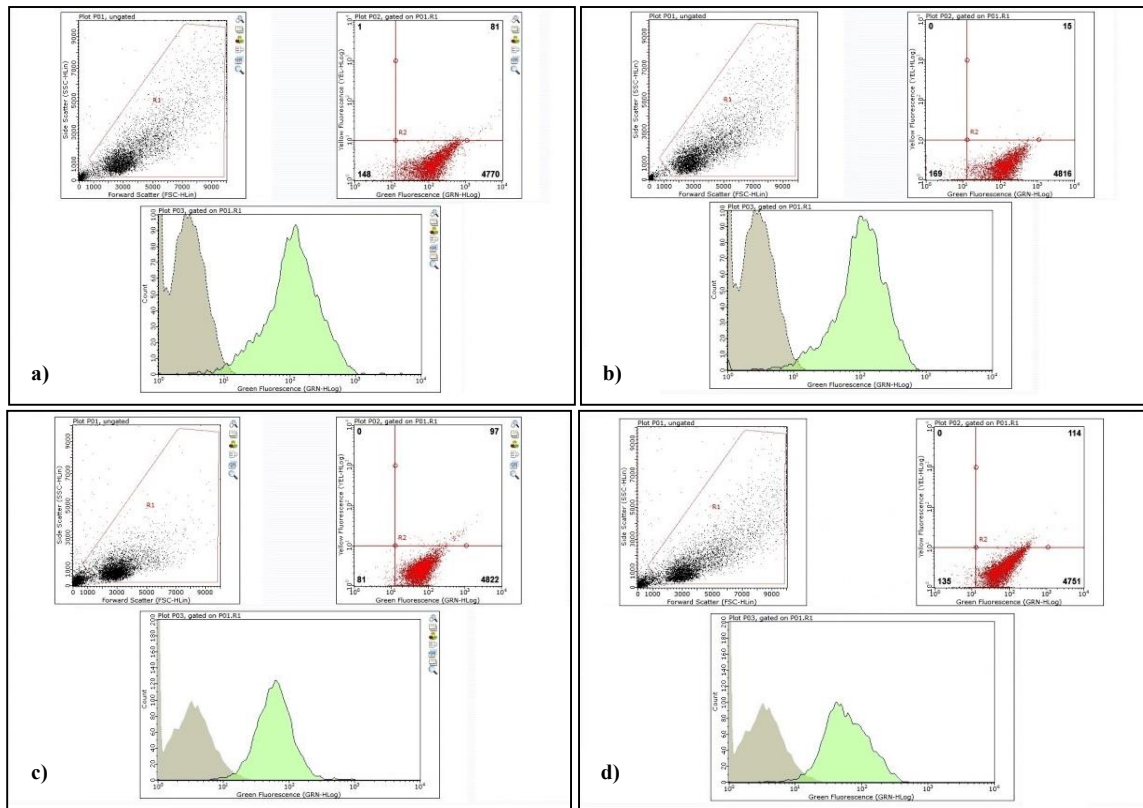


Figura 9.- Citometría de flujo para los marcadores específicos de células pluripotentes. a) y b) para OCT3/4 AlexaFluor 488; c) y d) Nanog/AlexaFluor 488. En las cuatro imágenes, el área bajo la curva en gris corresponde al control negativo; los cuales consistieron en CTER's sin tinción; en tanto que el área bajo la curva en verde corresponde a la población celular positiva para los marcadores indicados.

8.2 Evaluación del estado pluripotente de las CTER's por ICQ

Los resultados de los ensayos de inmunocitoquímica mostraron una alta expresión de los marcadores Nanog y OCT3/4. Las microfotografías expuestas en la Figura 10 corresponden a 2 experimentos independientes. Se muestran colonias de Células Troncales Embrionarias (E14tg2a) de ratón cultivadas por un lapso de tiempo aproximado de 48h; las células fueron fijadas, permeadas y marcadas con anticuerpos para los marcadores de pluripotencia Nanog y OCT3/4. Se puede observar una expresión para ambos marcadores mayor al 90%.

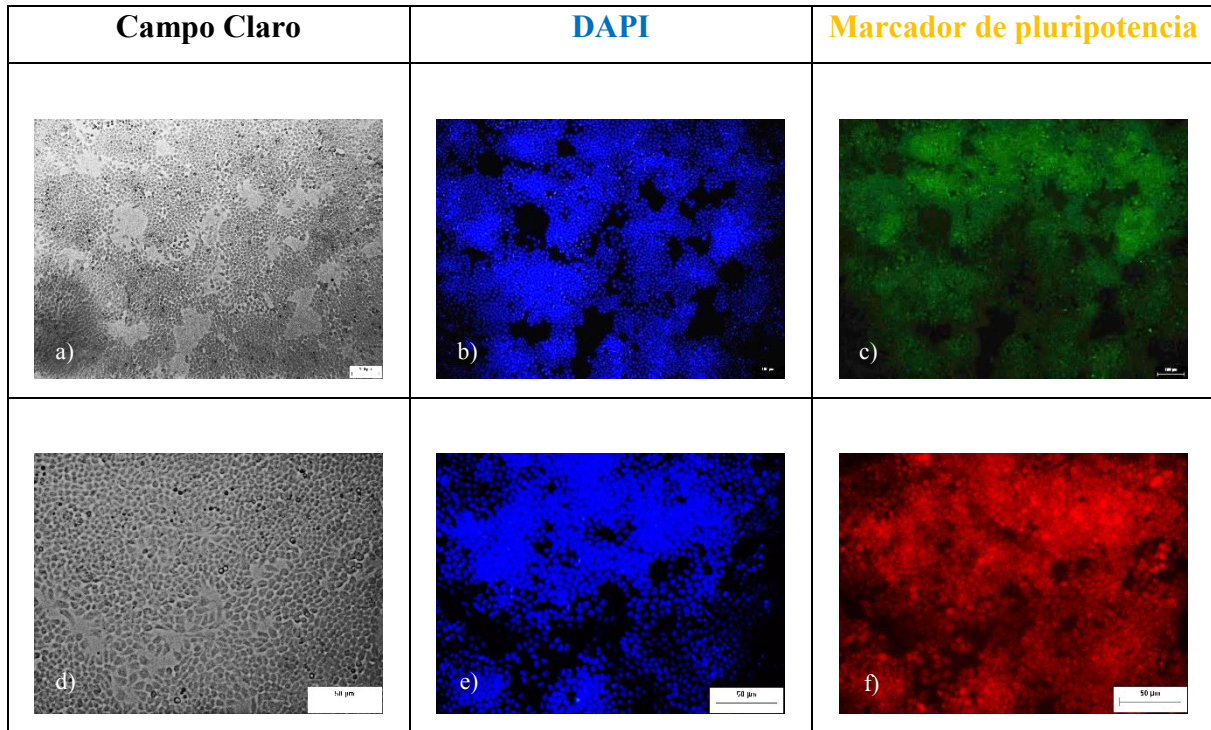


Figura 10.- Microfotografías de las ICQ realizadas para evaluar el estado pluripotente de las CTER. a) y d) es el campo claro de dos experimentos independientes; b) y e) son los núcleos teñidos con DAPI; c) corresponde al inmunomarcaje del marcador OCT3/4 conjugado con el fluorocromo AlexaFluor 488; f) se observa la fluorescencia positiva para Nanog/TRIT-C. Para las figuras a), b) y c) la escala representa 100 µm; para las figuras d), e) y f) la escala representa 50 µm.

Tras obtener las microfotografías de las ICQ positivas para los marcadores de estado pluripotente (Nanog y OCT3/4); se contabilizó el área (en µm²) cubierta por las células teñidas por los marcadores, utilizando el software ImageJ 1.48v (NIH), para evaluar en términos de % la expresión de los marcadores Nanog y OCT3/4. Una vez obtenidos los datos de las áreas de 6 microfotografías, se calcularon los promedios y las desviaciones estándar, en la Figura 11 se presentan los resultados graficados. Para el marcador Nanog se obtuvo una expresión de 90.94%, en tanto que para OCT3/4 fue de 91.45%. El área evaluada positiva para DAPI en las microfotografías fue tomada como Área Total (100%).

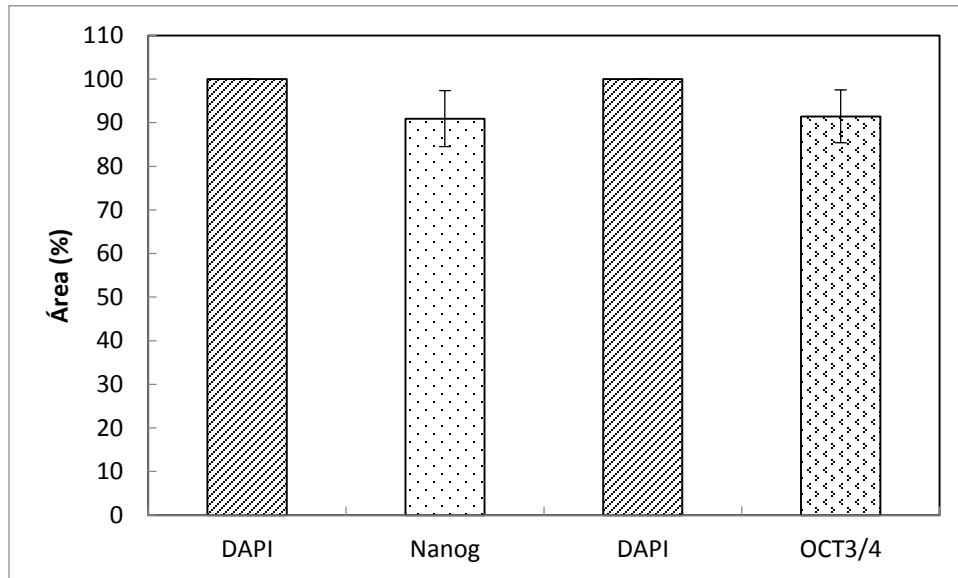


Figura 11.- Determinación del porcentaje de expresión de los marcadores Nanog y OCT ¾ en función del área (μm^2) durante la fase exponencial de proliferación.

8.3 Cinética de proliferación de las CTER

En la Figura 12 se presentan las gráficas correspondientes al número de células· cm^{-2} y a la viabilidad de estas, durante la cinética de proliferación de las células troncales embrionarias (E14Tg2a) de ratón. Se observa un incremento exponencial en el número de células· cm^{-2} a partir de las 24 horas de cultivo, mismo que se mantiene hasta las 120 horas. A partir del punto que corresponde a las 120 horas de iniciado el cultivo se puede observar la fase estacionaria, sin embargo, sólo muestra una duración de 24 horas. A las 168 horas de cultivo se presentó lo que parece ser una segunda fase de proliferación exponencial, con una duración de 24 horas. Asimismo, la viabilidad de las células fue mayor al 85% durante todo el experimento; el decremento en el número de células viables ocurrió de forma lenta.

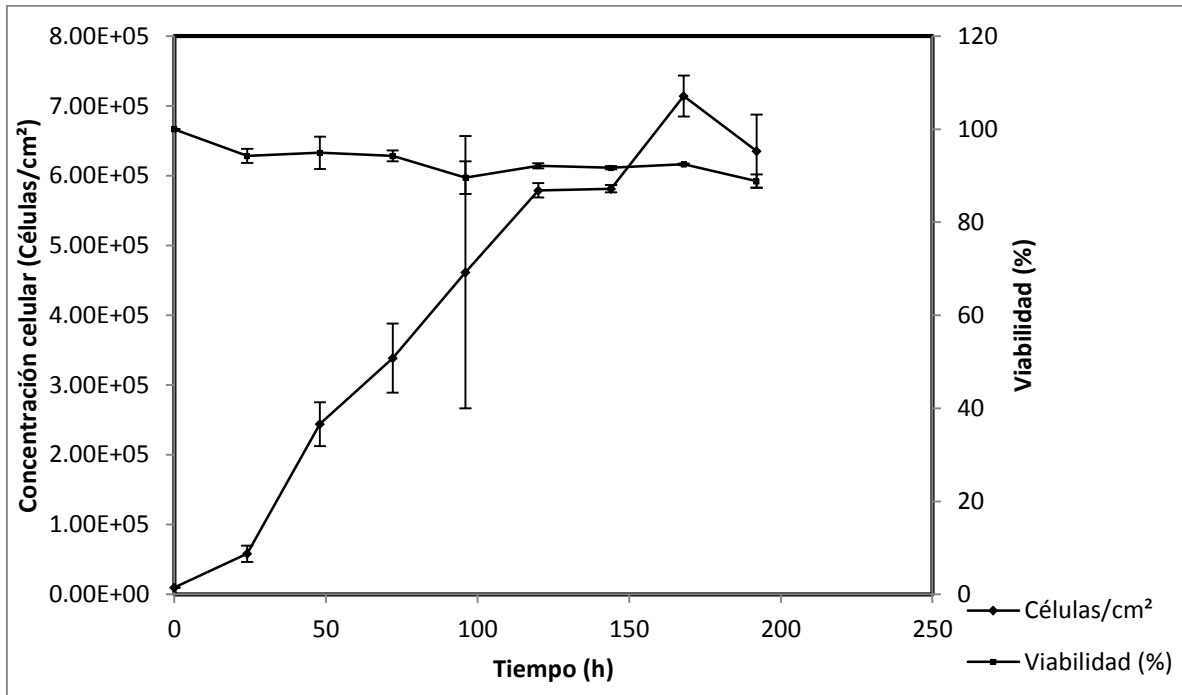


Figura 12.- Cinética de Proliferación para CTER. Los datos corresponden al número de células por cm² y la viabilidad de las mismas versus tiempo. Se muestra la desviación estándar de cada uno de los puntos graficados.

Con los datos obtenidos de la cinética de proliferación (Figura 12) se calculó la tasa de proliferación específica para la fase de crecimiento exponencial, la cual comprende del punto 24 h al 120 h; de acuerdo a la ecuación 4 el valor para μ en este lapso de tiempo es de 0.024 h^{-1} con un tiempo de duplicación (de acuerdo a la ecuación 5) de 28.8 horas para esta línea celular; incubadas a una temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$, con una atmósfera controlada de 5% de CO_2 , sin realizar subcultivo, con renovación de medio cada 48 horas y cultivadas en un área de 10 cm^2 .

8.4 Evaluación de dos medios químicamente definidos para el proceso de diferenciación (GMEM vs F-12K).

De la comparación para determinar cuál medio de cultivo químicamente definido (GMEM o F-12K) era adecuado para realizar la diferenciación, se obtuvieron los siguientes resultados:

Durante las primeras 144 horas de iniciado el proceso de diferenciación no se observaron variaciones marcadas entre los dos diferentes medios de cultivo; las colonias de células mostraron morfología similar en ambos tratamientos; sin embargo entre las 96 h y 168 h fue notable la disminución de la concentración celular en ambos tratamientos. Después de éste periodo sólo en el cultivo tratado con medio GMEM, se observó proliferación celular (Figura 13). Cada una de las microfotografías corresponde a un tiempo diferente dentro de la primera etapa del proceso de diferenciación que corresponde a la diferenciación de las CTER hacia CPN. Las células en ambos tratamientos fueron incubadas bajo las mismas condiciones de temperatura y cantidad de CO₂, las concentraciones de los factores de crecimiento utilizados, así como del suplemento N2 también fueron iguales.

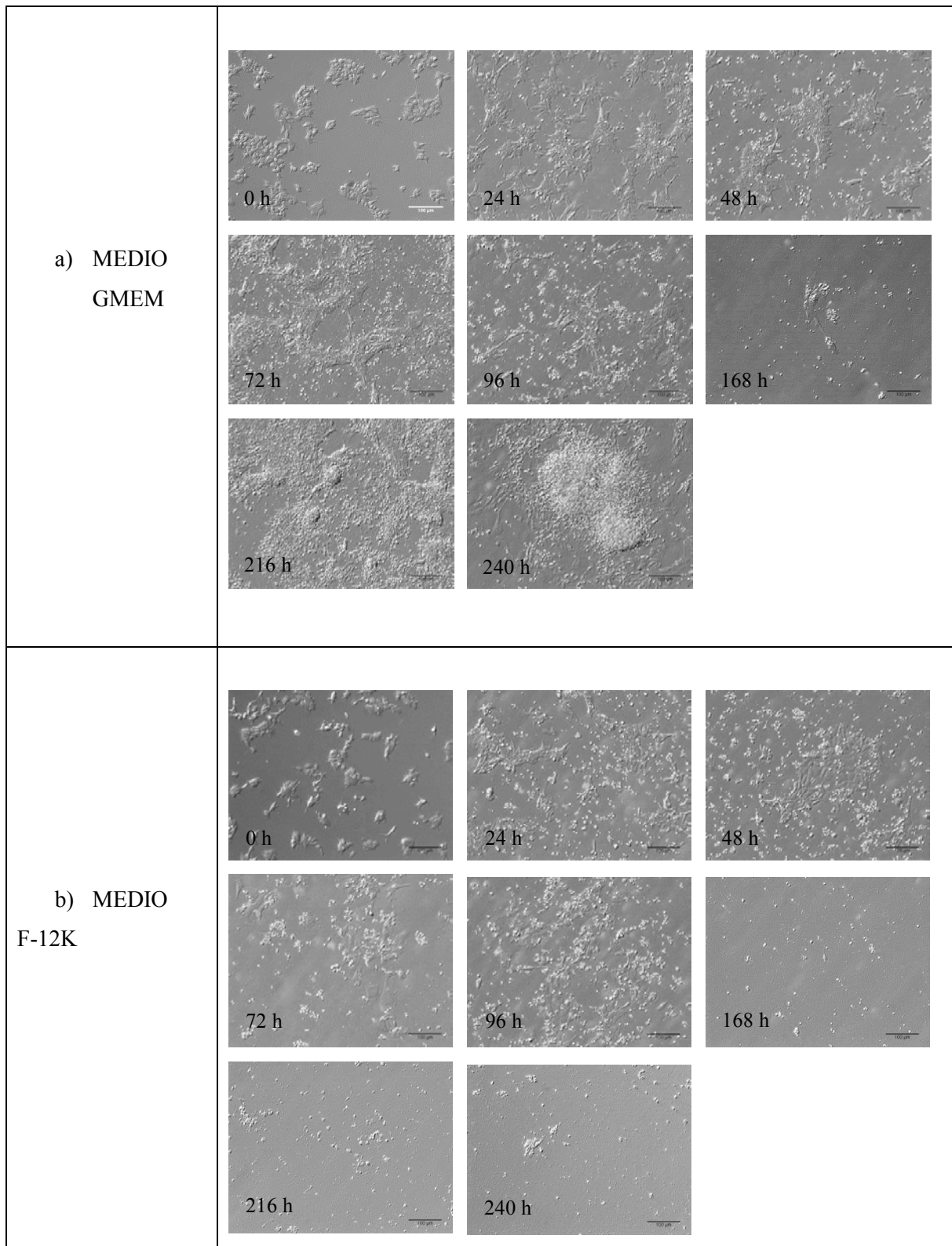


Figura 13.- Microfotografías de las primeras 240 h de diferenciación. a) Células cultivadas en medio GMEM + suplemento N2 + EGF + IGF-1. **b)** Células cultivadas en medio F-12K + suplemento N2 + EGF + IGF-1. Nótese que durante las primeras 96 h de cultivo, tanto la morfología como la proliferación fueron similares. Entre las 96 h y las 168 h de cultivo hubo una disminución en la proliferación celular y sólo en el medio GMEM hubo una adaptación positiva. Para todas las figuras la escala representa 100 μm .

La segunda etapa consistió en expandir e incrementar la proliferación de las colonias celulares formadas en ambos cultivos, para lo cual se agregó bFGF en ambos tratamientos. A las 384 h en el medio GMEM se observó la formación de neuronas, seguido por una ligera disminución en el número de células, lo cual se puede observar en la microfotografía correspondiente a las 432 h de cultivo en la Figura 14. En los cultivos tratados con medio F-12K fue apreciable un incremento en el número de células, pero comparativamente inferior que con el medio GMEM. Aunado a lo anterior, en el caso del tratamiento con medio F-12K, la morfología de las colonias celulares no correspondía a la formación de algún tipo de linaje neural, ya que la mayoría de las células presentaron arreglos individuales.

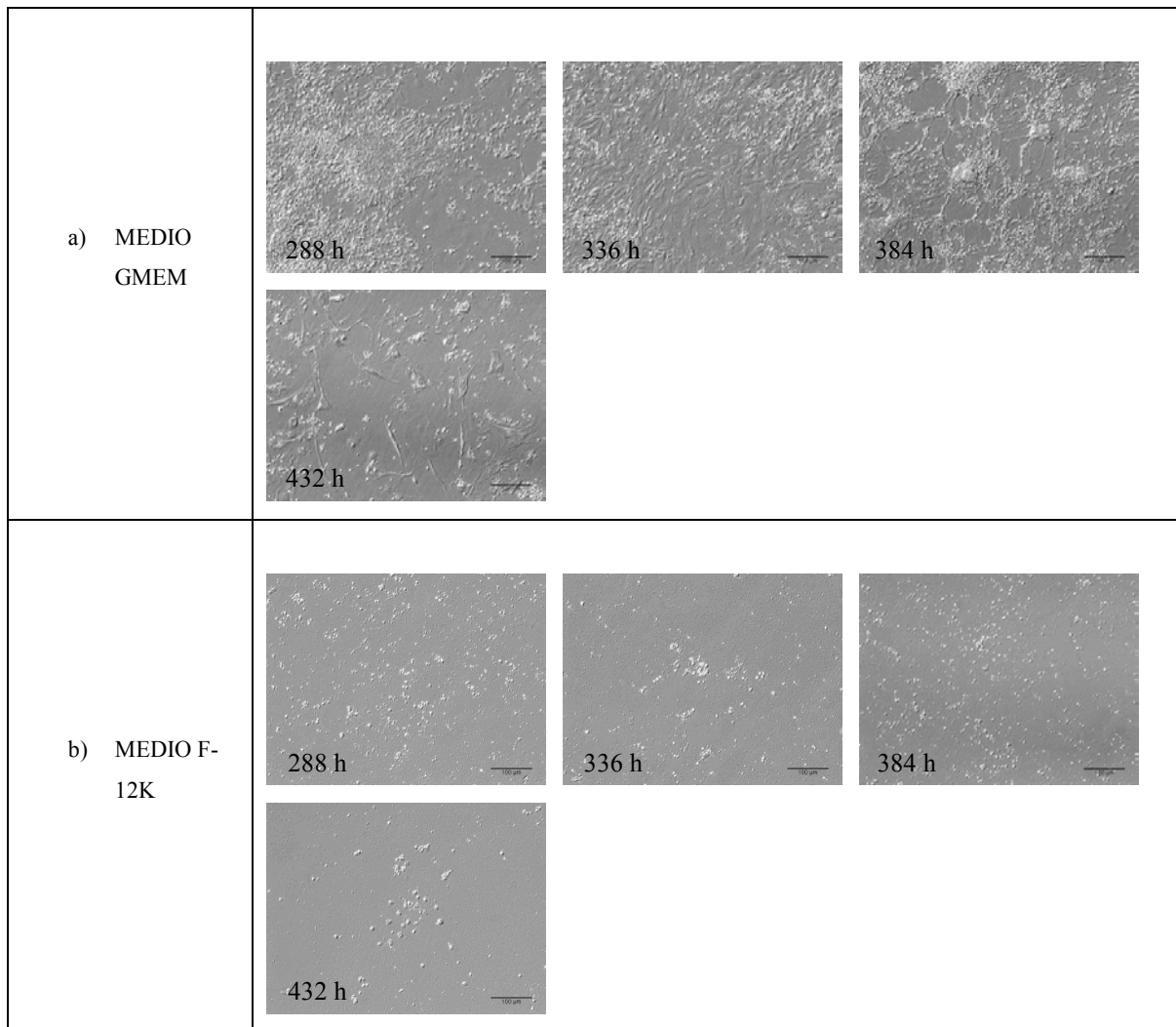


Figura 14.- Microfotografías a las 480 h de diferenciación. Durante la fase de formación de las CPN ambos tratamientos fueron suplementados con bFGF para promover la expansión de las CNP, este procedimiento tuvo una duración de 192 h. a) Medio GMEM + suplemento N2 + EGF + IGF-1 + bFGF. b) Medio F-12K + suplemento N2 + EGF + IGF-1 + FGF. Para todas las figuras la escala representa 100 μ m.

La presencia de células con fenotipo neural durante la etapa de expansión de las CNP nos indicó que se estaba llevando a cabo la diferenciación hacia células de linaje neural, en la Figura 15 se observan las neuronas formadas.

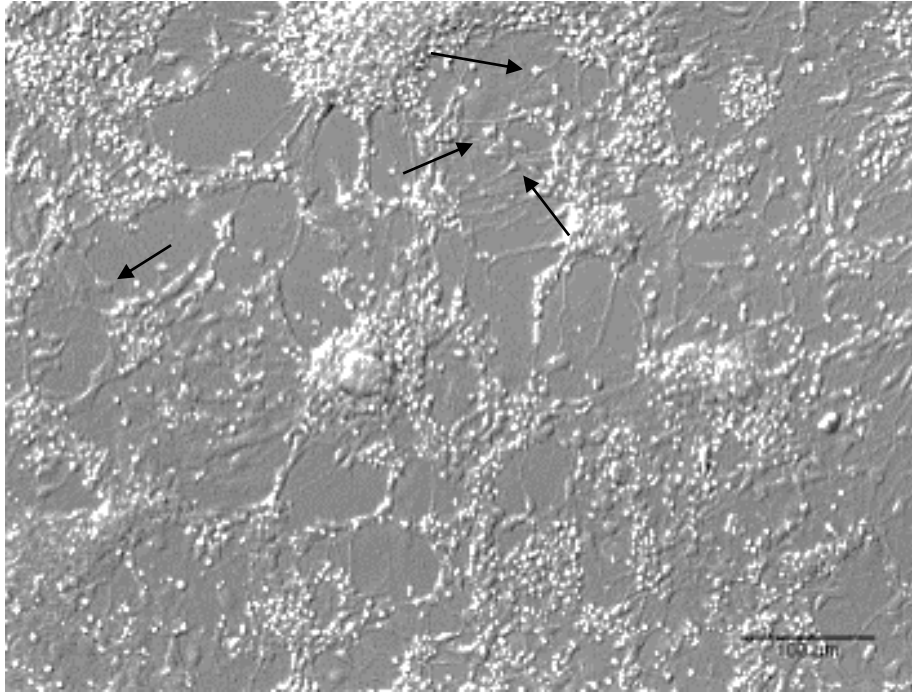


Figura 15.- Diferenciación hacia células de fenotipo neural (384 h). En la segunda etapa de diferenciación se observó la formación de neuronas, las cuales son señaladas con flechas (→), la microfotografía corresponde células cultivadas en medio GMEM. La escala representa 100 μm .

La especialización de las CPN se llevó a cabo durante la etapa final del protocolo, para ello fue necesario retirar los 3 factores de crecimiento, para así poder dar inicio a la diferenciación hacia las CCOI, las células fueron cultivadas con medio GMEM o medio F-12K, adicionando a ambos suplemento N2.

El proceso de especialización tuvo una duración de 240 h, sólo se observó diferenciación en las colonias celulares cultivadas con medio GMEM, del tiempo 456 h al 528 h se puede ver un arreglo celular individual, en tanto que a partir de las 600 h a las 672 h las células comenzaron a formar colonias; las otras células cultivadas en medio F-12K mantuvieron una baja proliferación durante todo el procedimiento, no hubo variaciones notables en cuanto a su morfología y tamaño, características que se mantuvieron constantes durante las

últimas dos fases del experimento. Las microfotografías que se presentan en la Figura 16 corresponden a la etapa de especialización en ambos tratamientos en 5 tiempos diferentes.

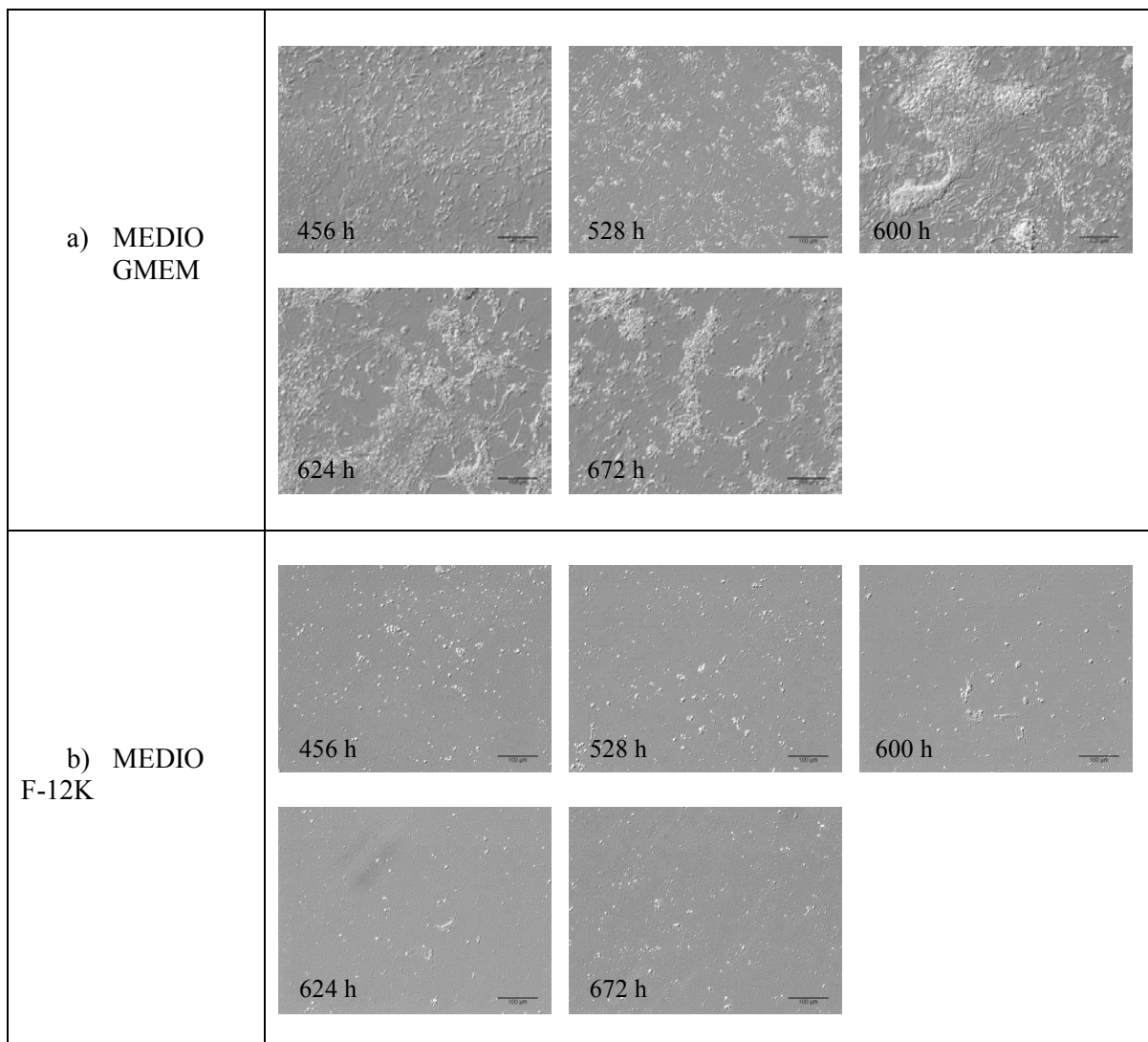


Figura 16.- Microfotografías de la etapa final del experimento. Para comenzar el proceso de diferenciación se retiraron los factores de crecimiento después de 432 h de cultivo. a) Medio GMEM + suplemento N2, al final del experimento fue en éste medio donde se obtuvo la mayor cantidad de células con morfología de tipo neural. b) Medio F-12K + suplemento N2, a partir de las 168 h de cultivo la proliferación y la diferenciación fue casi nula. Este patrón se mantuvo hasta el final del proceso. Para todas las figuras la escala representa 100 μ m.

En la Figura 17 se observa la presencia de células con morfología neural, las cuales también se observaron en la última etapa del proceso de diferenciación y sólo en las células que fueron cultivadas en medio GMEM.

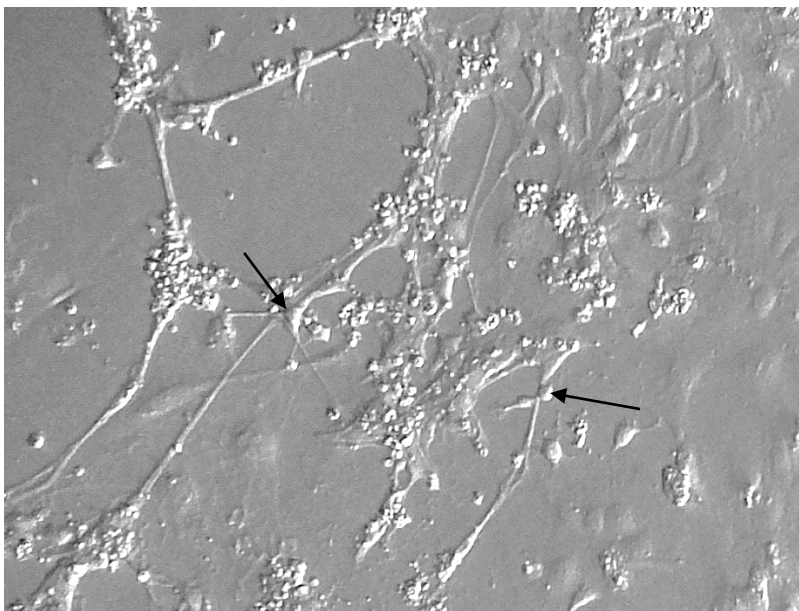


Figura 17.- Microfotografía (20x) de células neurales observadas en el día 26 de iniciado el proceso de diferenciación, éstas sólo estuvieron presentes en las células cultivadas en medio GMEM, las neuronas se encuentran señaladas con flechas (→).

8.5 Evaluación del estado de diferenciación por ICQ en células especializadas en medio químicamente definido GMEM

Dado que las células cultivadas en medio GMEM mostraron una respuesta favorable ante el proceso de diferenciación, se llevó a cabo otro experimento en cual las células fueron sometidas al mismo proceso de diferenciación en medio GMEM bajo las mismas condiciones para analizar la expresión de los marcadores Miosina VIIa, Math1/Atoh1, así como la coexpresión de ambos por medio de la técnica de inmunocitoquímica. Los tiempos en el proceso de diferenciación evaluados fueron 240 h, 480 h y 672 h que corresponden a las Figuras 19, 20 y 21 respectivamente. Las microfotografías fueron tomadas de 3 experimentos independientes, en los cuales se hizo un inmunomarcaje para las proteínas Miosina VIIa y Math1/Atoh1 de forma individual y en forma de coexpresión, ya que esto último es esencial para determinar la presencia de CCOI.

Dado que en las primeras etapas del protocolo de diferenciación se buscaba obtener CPN para su posterior especialización hacia CCOI, a las 240 h de iniciado el proceso se realizó

la evaluación de la expresión de Nestina para corroborar la presencia de CPN debido; sin embargo al observar al microscopio de epifluorescencia se obtuvo una casi nula expresión (Figura 18), el inmunomarcaje se realizó en un pozo independiente de los tratados para verificar la expresión de Math1/Atoh1 y Miosina VIIa.

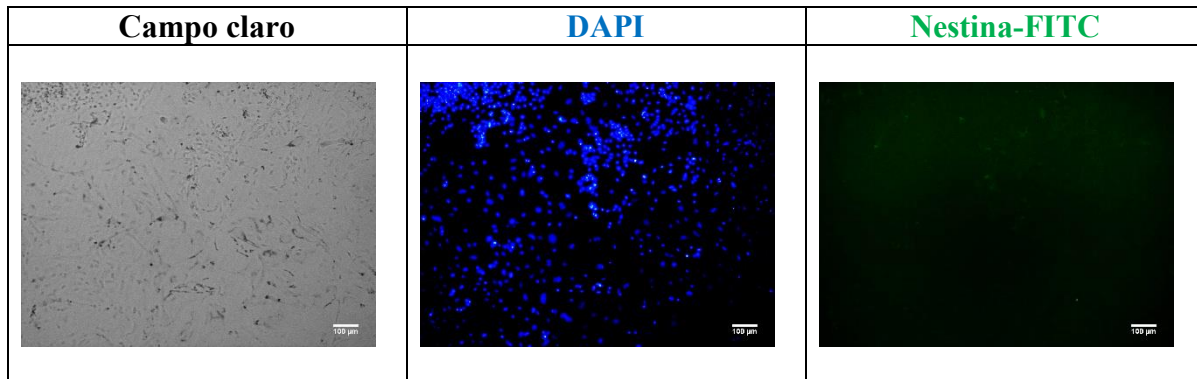


Figura 18.- Inmunocitoquímica para evaluar la presencia del marcador Nestina, las microfotografías corresponden a las 240 h de iniciado el proceso de diferenciación. Para todas las figuras la escala representa 100 µm.

Para las Figuras 19, 20 y 21, se muestran las microfotografías en diferentes campos y para todos los tiempos evaluados: en la primera columna se muestra el “Campo Claro”, en ellas se observan las colonias celulares sin ningún tipo de tinción; en la segunda columna se observan los núcleos de las células teñidos en azul con el colorante DAPI; la tercera columna corresponde a las células positivas para la proteína Miosina VIIa, el fluorocromo utilizado fue FIT-C (verde); en la cuarta columna se observa a las células positivas para Math1/Atoh1 que fluorescen en naranja debido al fluorocromo TRIT-C; por último, en la quinta columna se muestra la coexpresión de ambos marcadores, las zonas con una mayor coexpresión se observan en color amarillo.

La figura 19, corresponde a la etapa de diferenciación de las CTER hacia CPN. Se observó una escasa proliferación celular; las células se encuentran formando colonias. A pesar de ser una etapa temprana en el proceso de diferenciación (240 h), se observa una alta expresión de los marcadores Miosina VIIa (verde) y Math1/Atoh1 (naranja), pero se limita sólo a las células que han formado colonias, siendo escasa o nula en las células individuales. Se realizó el empalme de las microfotografías que corresponden a cada marcador para evaluar la coexpresión (amarillo) de ambas proteínas.

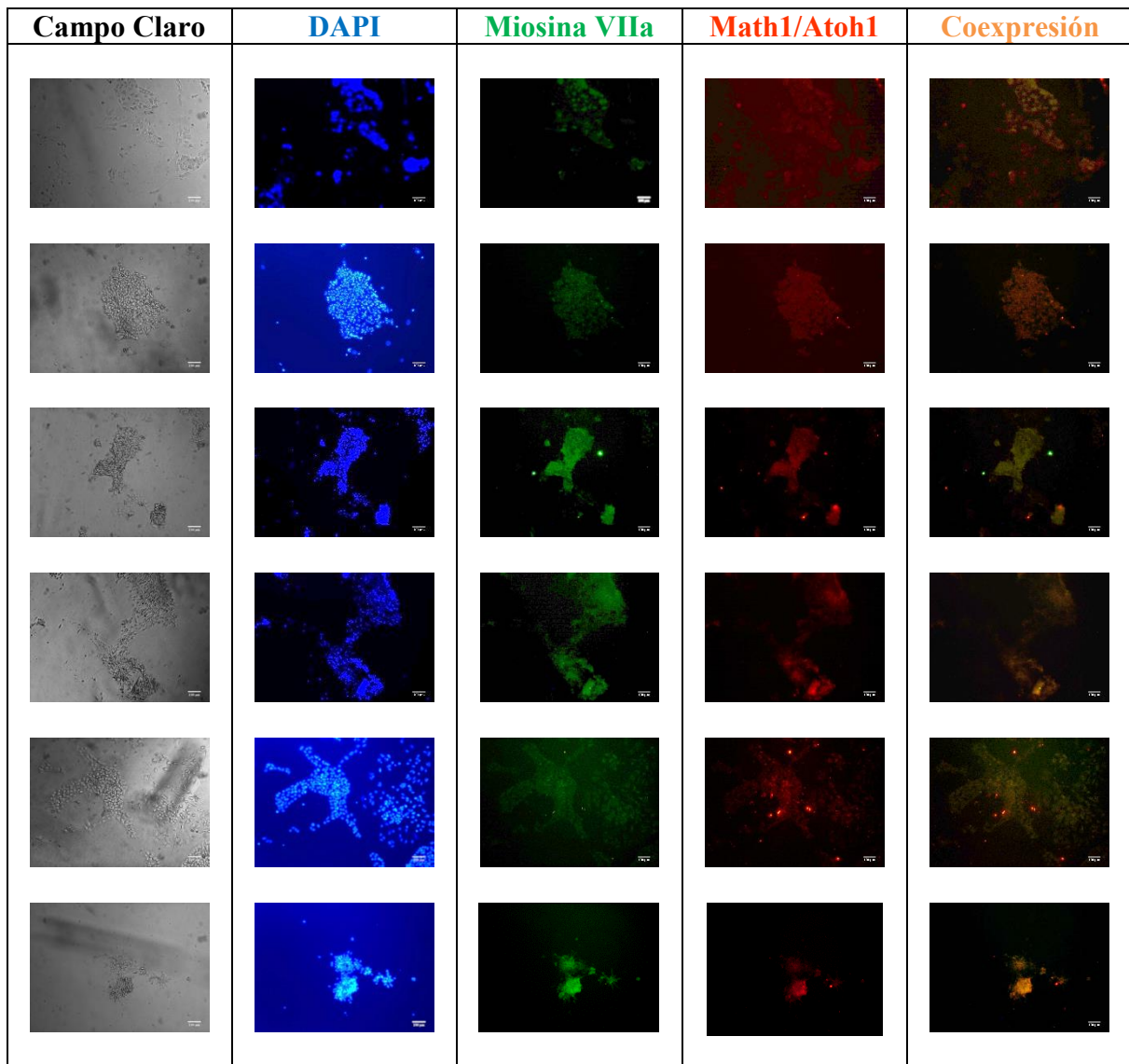


Figura 19.- Microfotografías de las ICQ realizadas a las células después de 240 h de cultivo para observar la expresión de los marcadores Miosina VIIa y Math1/Atoh1. Las diversas microfotografías fueron tomadas en diferentes campos de 3 experimentos independientes. Para todas las microfotografías la escala representa 100 μ m.

A las 480 h de iniciado el proceso (48 h después de haber concluido la etapa de expansión) que corresponde a la Figura 20; se observa un incremento en la proliferación celular, los arreglos celulares de colonia se perdieron y las células presentan una morfología individual, no obstante la expresión de Miosina VIIa (verde) y Math1/Atoh1 (naranja) se mantiene. De nuevo se realizó el empalme de las microfotografías para determinar si existía coexpresión para ambas proteínas (amarillo); dicha coexpresión apreciable en la última columna determina la presencia de CCOI.

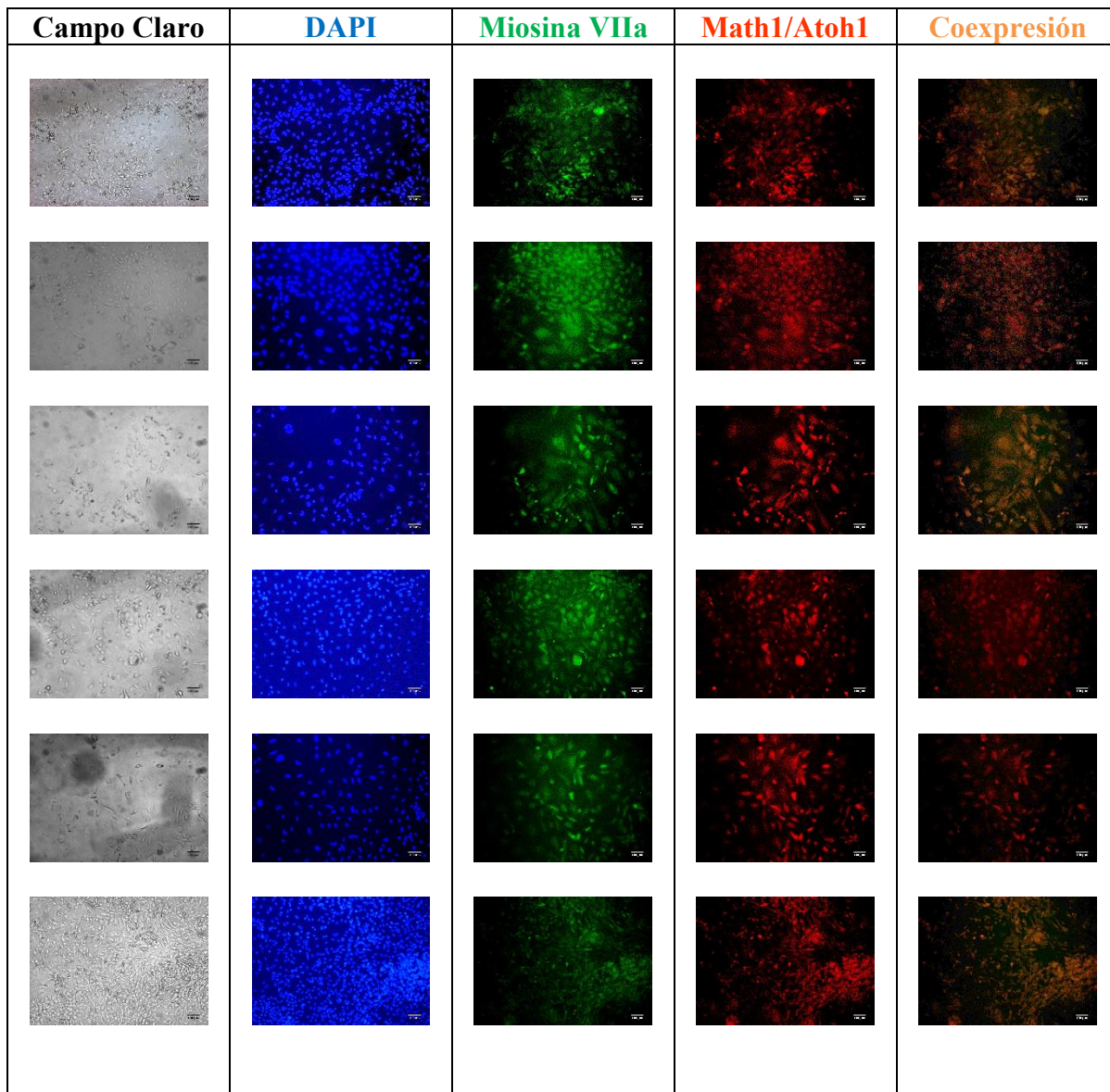


Figura 20.- Microfotografías de las ICQ realizadas a las células después de 480 h de cultivo para observar la expresión de los marcadores Miosina VIIa y Math1/Atoh1. Las diversas microfotografías fueron tomadas en diferentes campos de 3 experimentos independientes. Para todas las microfotografías la escala representa 100 μ m.

En la Figura 21 se muestran microfotografías obtenidas después de marcar las proteínas Miosina VIIa (verde) y Math1/Atoh1 (naranja) una vez finalizado el proceso de especialización (672 h). Las células se presentan formando colonias más grandes, pero también es observable la existencia de arreglos individuales, la expresión y coexpresión (amarillo) de ambos marcadores es visiblemente mayor en los agregados celulares. Las

células individuales se mantienen a la periferia de las colonias formadas, como si estuviesen migrando, lo que asimila una placa óptica primitiva.

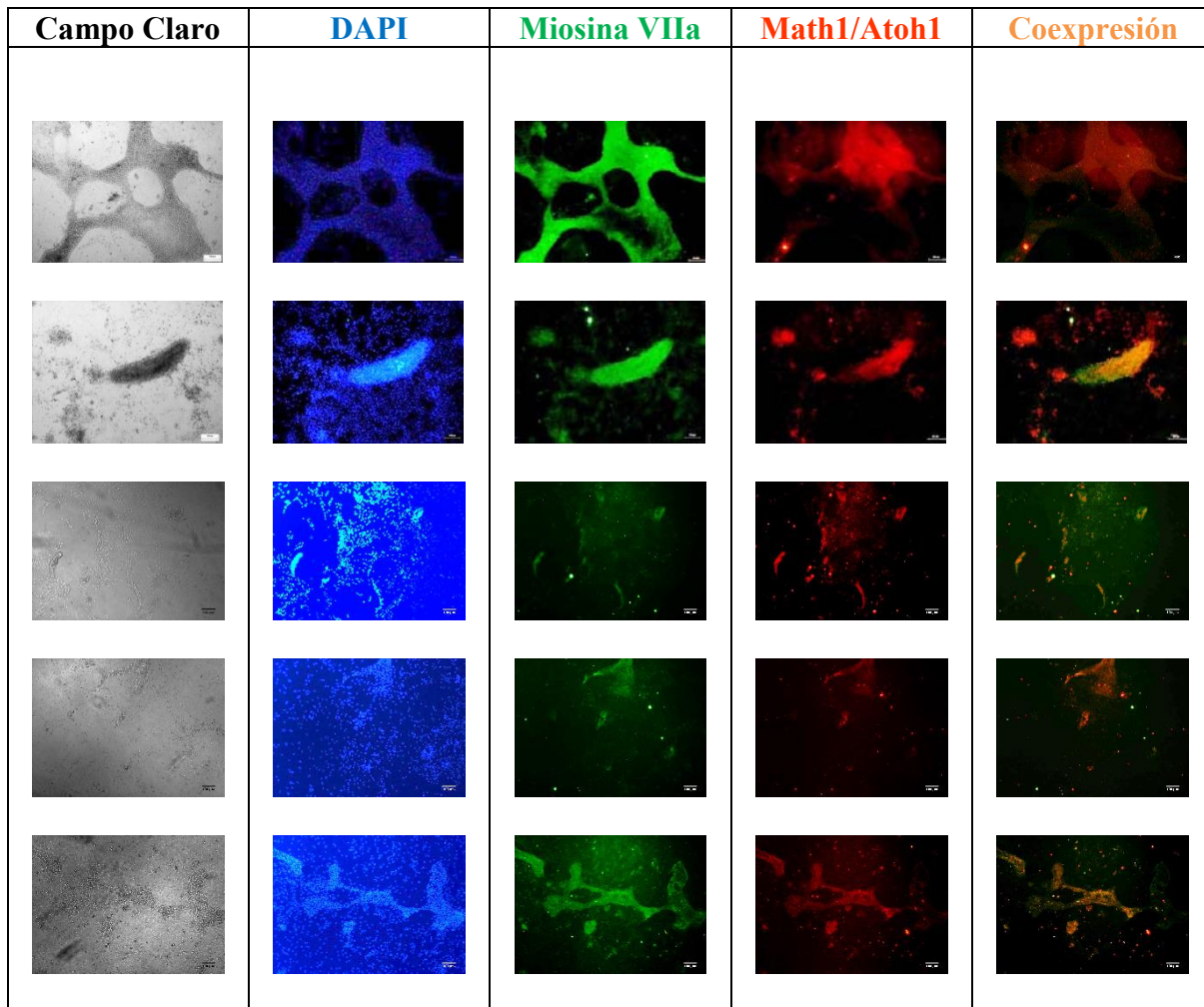


Figura 21.- Microfotografías de las ICQ realizadas a las células después de 672 h de cultivo para observar la expresión de los marcadores Miosina VIIa y Math1/Atoh1. Las diversas microfotografías fueron tomadas en diferentes campos de 3 experimentos independientes. Para todas las microfotografías la escala representa 100 μ m.

8.6 Estimación de la expresión y coexpresión de los marcadores Miosina VIIa y Math1/Atoh1 a través del área (μm^2).

Después obtener las microfotografías de las ICQ positivas para los marcadores de estado diferenciado para células ciliadas del oído interno (Miosina VIIa, Math1/Atoh1 y coexpresión); se cuantificó el área (en μm^2) cubierta por las células teñidas por los marcadores, utilizando el software ImageJ 1.48v (NIH), para evaluar en términos de área la expresión de los marcadores. Una vez obtenidos los datos de las áreas de 6 microfotografías, se calcularon los promedios y las desviaciones estándar, en la Figura 22 se presentan los resultados graficados. El área total representada por DAPI medida para el tiempo de 240 h alcanzó un valor de $190,759.81 \mu\text{m}^2$; de los cuales $127,840.36 \mu\text{m}^2$ (66.55%) expresaron Miosina VIIa; $133,166.06 \mu\text{m}^2$ (70.01%) expresaron Math1/Atoh1 y $111,599 \mu\text{m}^2$ (59.58%) expresaron ambos marcadores. A las 480 h se estimó un área total (representada por DAPI) igual a $222,111.98 \mu\text{m}^2$ de los cuáles Miosina VIIa se expresó en $114,702.58 \mu\text{m}^2$ (47.47%); Math1/Atoh1 en $125,939.22 \mu\text{m}^2$ (54.73) y una coexpresión en $58,869.81 \mu\text{m}^2$ (29.7%). Finalmente, en el último punto de muestreo se cuantificó un área total (DAPI) de $326,096.15 \mu\text{m}^2$; en los que la expresión de Miosina VIIa en el área fue igual a $198,253.33 \mu\text{m}^2$ (51.62%); $139,027.8 \mu\text{m}^2$ (37.94%) positivos para Math1/Atoh1 y en $117,217.2 \mu\text{m}^2$ (34.7%) mostraron coexpresión. Los valores estimados en función del % se muestran en la Figura 22. En términos de área en μm^2 se presentó una mayor coexpresión de ambos marcadores (Figura 22); sin embargo y como se muestra en la Figura 23, el mayor % de coexpresión se obtuvo durante las primeras 240 h de iniciado el proceso de diferenciación.

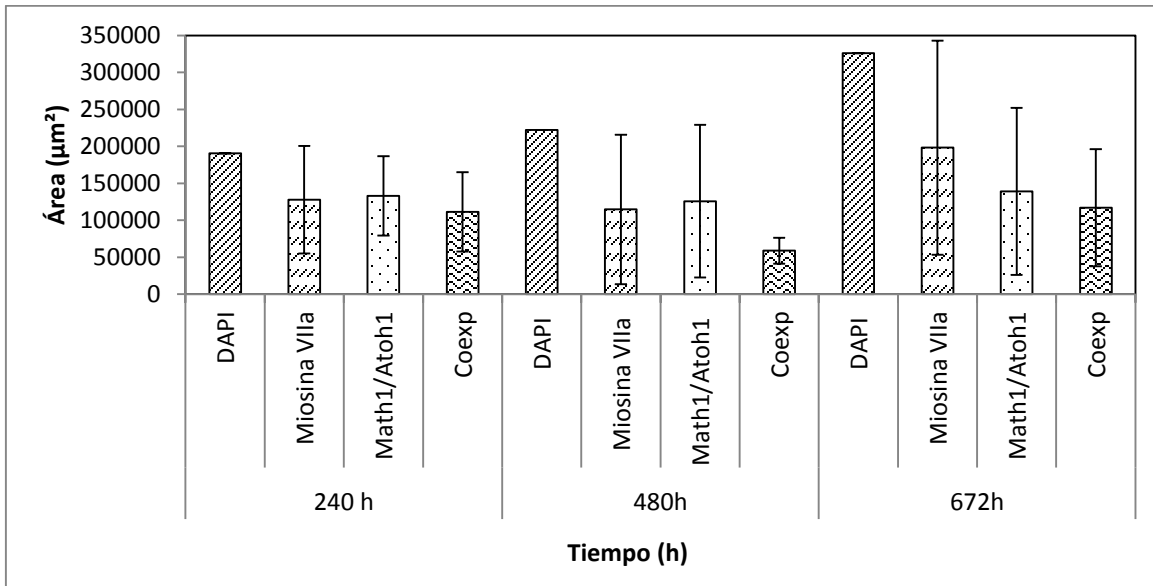


Figura 22.- Expresión en función del área de las proteínas Miosina VIIa y Math1/Atoh1. Se muestra el patrón de expresión en función del área (en μm^2) de las proteínas Miosina VIIa y Math1/Atoh1 en tres tiempos diferentes a lo largo de todo el proceso de diferenciación. El área teñida con DAPI representa el total del área (μm^2).

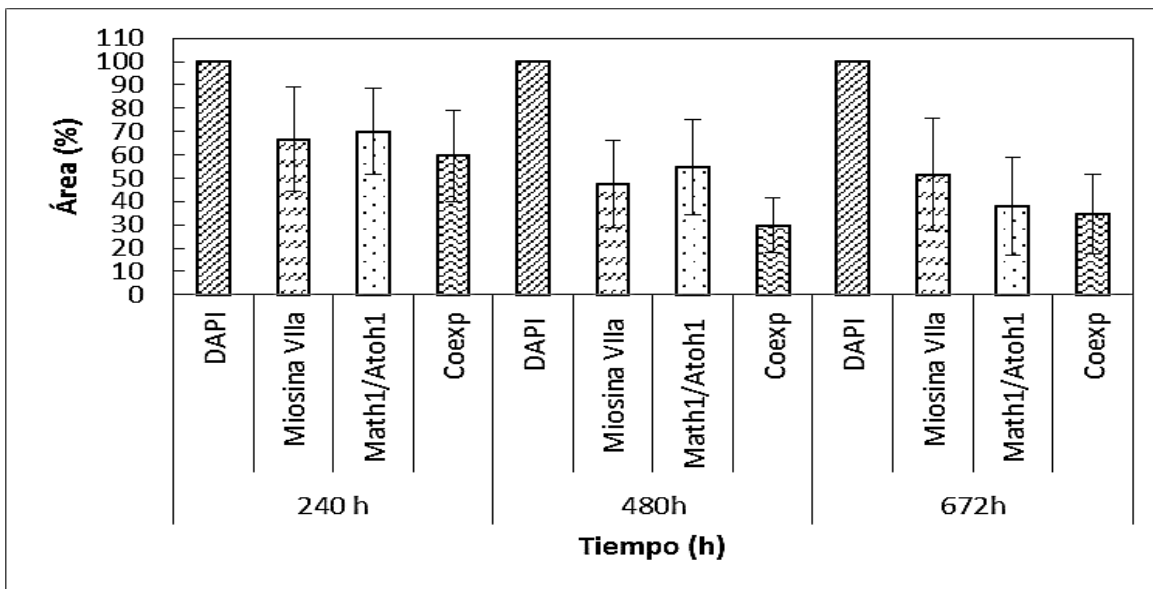


Figura 23.- Expresión en % de las proteínas Miosina VIIa y Math1/Atoh1. Se muestra el patrón de expresión de las proteínas Miosina VIIa y Math1/Atoh1 en tres tiempos diferentes a lo largo de todo el proceso de diferenciación. Los datos graficados se obtuvieron a través de un estimado en función del área donde DAPI representa el 100% del área (μm^2).

8.7 Cinética de proliferación para el proceso de diferenciación celular.

El número de células·cm⁻² y la viabilidad de estas; cuantificadas en tres tiempos diferentes durante el proceso de diferenciación, se muestran graficadas en la Figura 24. Del tiempo 240 h al 480 h corresponden a la fase de proliferación exponencial, donde se observa un considerable incremento en el número de células·cm⁻². Es observable un decremento en la proliferación celular después de 480 h. Asimismo, la viabilidad celular no fue constante, de 0 h a 240 h de iniciado el proceso de diferenciación se observó una baja en el número de células viables, un evento bastante común en los procesos de diferenciación. La viabilidad de las células fue mayor al 85% de 480 h a 672 h, independientemente del decremento en la proliferación celular.

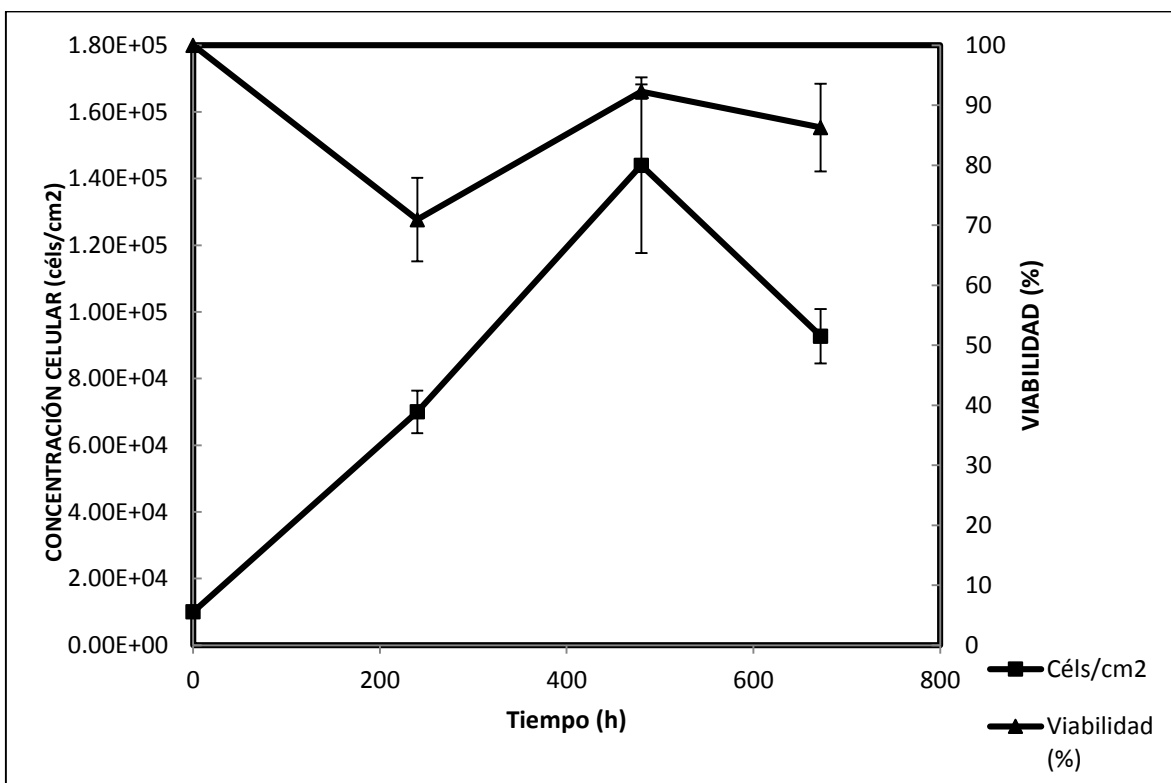


Figura 24.- Cinética de proliferación durante el proceso de diferenciación. Se muestra la proliferación celular (■) y la viabilidad (▲) durante el proceso de diferenciación. El segundo y tercer punto (■) representan la fase exponencial de la proliferación.

Se calculó la tasa de proliferación específica para la fase de crecimiento exponencial una vez obtenido el número de células·cm⁻² para cada punto de muestreo (Figura 24), la cual

comprende del punto 240 h al 480 h; de acuerdo a la ecuación 4 el valor para μ en este lapso de tiempo es de 0.003005 h^{-1} con un tiempo de duplicación (de acuerdo a la ecuación 5) de 230.66 horas (aproximadamente 9.61 días) para este linaje celular; incubadas a una temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$, con una atmósfera controlada de 5% de CO_2 , sin realizar subcultivo, con renovación de medio cada 48 horas, cultivadas en un área de 10 cm^2 .

En la figura 25 se muestra el número de células $\cdot \text{cm}^{-2}$ que expresaron los marcadores específicos del estado de diferenciación. En la prueba “t” de student realizada no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos en cuanto a la coexpresión de los marcadores Miosina VIIa y Math1/Atoh1 con un valor para α de 0.05 y un valor calculado para P igual a 0.907 comparando el número de células $\cdot \text{cm}^{-2}$ a las 240 h y 480 h, un valor de P igual 0.290 comparando el número de células $\cdot \text{cm}^{-2}$ entre 480 y 672 h; en tanto que el valor para P al comparar las 240 h y 672 h de iniciado el proceso fue igual a 0.298.

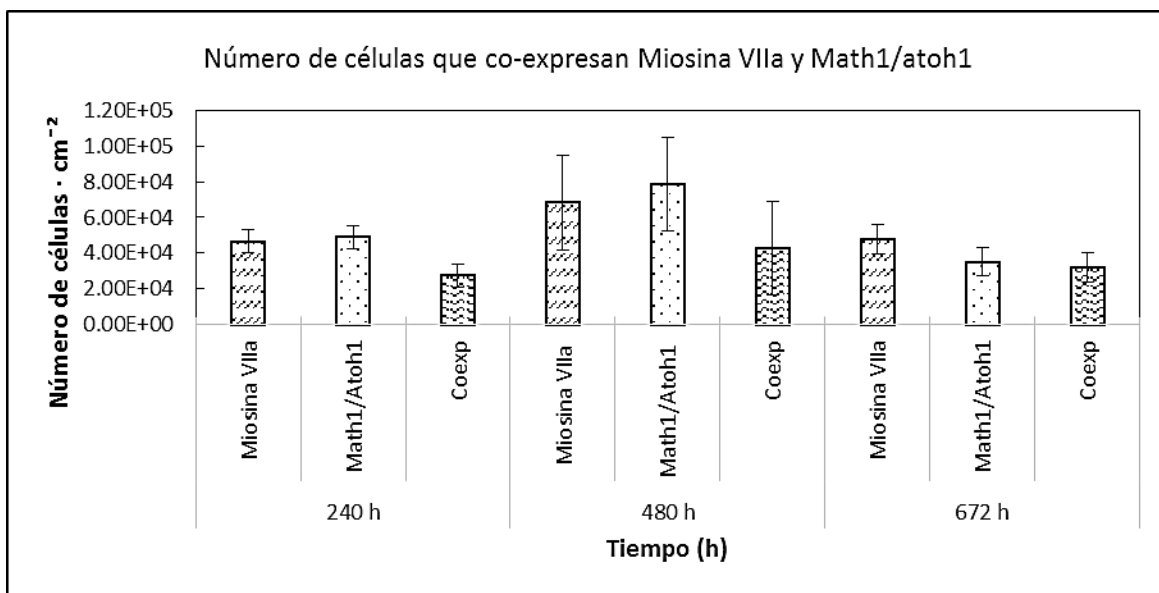


Figura 25.- Número de células $\cdot \text{cm}^{-2}$ que expresaron los marcadores específicos Miosina VIIa, Math1/Atoh1 y la coexpresión de ambos.

9. Discusión

Nanog y OCT $3/4$ son reguladores clave del estado pluripotente de las células troncales embrionarias, su expresión se encuentra directamente relacionada con el mantenimiento de la Masa Celular Interna (MCI), con la autorenovación de las Células Troncales Embrionarias de Ratón (CTER) y con la inhibición de la diferenciación al regular la transcripción de genes involucrados con la supervivencia celular y las rutas de diferenciación de las CTER (Loh, 2006; Silva, 2009). La evaluación del estado pluripotente de las CTER fue necesaria para poder iniciar el proceso de diferenciación ya que esta característica es la que les confiere la capacidad de poder diferenciarse en cualquier tipo celular, incluyendo las células ciliadas del oído (Murray y Edgar, 2001).

En la evaluación del estado pluripotente con citometría de flujo, se observó que existe un número limitado de células que son negativas para ambos marcadores a pesar de que fueron cultivadas bajo las mismas condiciones. Estas condiciones de cultivo controladas permiten mantener a largo plazo el estado pluripotente de las células troncales embrionarias de ratón en experimentos *in vitro*; sin embargo, nunca se ha llegado a obtener un 100% de células en estado pluripotente (Berril *et al.*, 2004). Lo anterior pudo deberse a que estas estaban iniciando un proceso de diferenciación espontánea. Los datos fueron corroborados con un ensayo de inmunocitoquímica, en donde se obtuvieron resultados similares en cuanto a la expresión para ambos marcadores superior al 90%; esto nos asegura que al menos el 90% de las células cultivadas fueron pluripotentes.

Para mantener dicho estado pluripotente en las CTER fue necesario su cultivo en medio adicionado con LIF y en presencia de suero fetal bovino, debido a que esta citoquina inhibe el proceso de diferenciación de las células troncales embrionarias, por lo tanto es clave para mantenerlas en un estado indiferenciado (Gearing *et al.*, 1991; Niwa *et al.*, 1998), sin embargo LIF es insuficiente para bloquear la diferenciación neural en medio libre de suero (Ying *et al.*, 2003).

En la cinética de proliferación se observó que la viabilidad se mantuvo mayor al 85% debido a que cada 48h se realizó una renovación de medio, de modo que las células no estuvieron limitadas en nutrientes, además que las células muertas que se encontraban flotando eran eliminadas en su mayoría al realizar el cambio de medio, lo que explicaría los valores casi constantes de viabilidad durante todo el periodo de cultivo y mantenimiento de las CTER.

El tiempo de duplicación estándar para las CTER durante la fase exponencial de proliferación tiene un rango de 10 – 16h (Viswanathan *et al.*, 2002; Berrill *et al.*, 2004); sin embargo se ha demostrado que la superficie de cultivo influye en la capacidad de las células para dividirse, a las células les toma más tiempo duplicarse y los valores de la tasa de crecimiento específico son menores cuando se incrementa la superficie de cultivo. Para el tiempo de duplicación dichos valores pueden ir desde 18.9 días hasta los 23.4 días, en tanto que la tasa de crecimiento tiene un rango de 0.038 a 0.032 h⁻¹ cuando la superficie de cultivo tiene valores de 35 mm a 90 mm respectivamente (Albranches *et al.*, 2003), los resultados obtenidos en la cinética de proliferación concuerdan con lo antes descrito ya que se obtuvo un tiempo de duplicación de 28.8 días y una tasa de proliferación específica de la fase exponencial de proliferación de 0.024 h⁻¹ en células cultivadas en una superficie de 10 cm² bajo condiciones de cultivo similares a las descritas por Albranches *et al.* 2003, salvo por que no se realizó ningún subcultivo en este experimento.

Una vez que se verificó el estado pluripotente de las CTER, fue necesario establecer las condiciones óptimas para poder iniciar el proceso de diferenciación hacia CCOI, para lo cual se compararon dos medios para cultivo diferentes: GMEM y F12-K. Al final de la experimentación se observó una mayor proliferación, así como una mejor diferenciación en el medio GMEM suplementado con los factores de crecimiento; las condiciones de cultivo, así como las concentraciones de los factores de crecimiento fueron iguales para ambos medios. Para poder determinar si las variaciones en la proliferación y diferenciación se debían a posibles diferencias en la composición química o inclusive a las concentraciones de algunos de los componentes en los medios, se revisó la hoja de datos técnicos de ambos medios, para verificar que no existían diferencias en los componentes y sus

concentraciones. Se determinó que ambos tenían los mismos componentes con variaciones mínimas en las concentraciones. Es posible que éstas pequeñas variaciones pudieran haber establecido la diferencia para el medio F-12K, siendo posible que las células se encontraran adaptadas a su cultivo en medio GMEM bajo condiciones controladas (presencia de FBS). Un cambio drástico en estas condiciones sumado a la alta tasa de mortalidad que se presenta en un proceso de diferenciación (tanto *in vivo* como en *in vitro*); pudo haber tenido como consecuencia una alta tasa de mortalidad celular, observada después de 6 días de iniciado el proceso de diferenciación. También es factible que al cultivar en medio F-12K se pudiera haber derivado un linaje más puro de células ciliadas del oído interno al ser un medio más especializado, permitiendo una restricción de proliferación hacia los demás tipos celulares, lo cual explicaría la ausencia de células con fenotipo neural. No existen reportes en donde se especifique un medio óptimo para diferenciar CTER hacia CCOI *in vitro*, ni tampoco se ha reportado si existe un decremento considerable en la proliferación celular durante este proceso, dado que los experimentos realizados que logran una diferenciación de CCOI en cultivos *in vitro*, sólo van enfocados en la obtención de dichas células utilizando diferentes técnicas sin optimizar el medio a utilizar (Coleman *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2003; Izumikawa *et al.*, 2005).

La coexpresión de los marcadores Math1/Atoh1 y Miosina VIIa fue evaluada en cada uno de los 3 puntos de muestreo ya que son marcadores que se encuentran expresados individualmente en diversos tipos celulares, pero sólo son expresados simultáneamente en las CCOI (Li *et al.*, 2003; Peciller *et al.*, 2005). La expresión de Math1/Atoh1 es esencial para guiar y mantener la diferenciación de las CTER hacia CCOI, también juega un papel importante en la maduración de las mismas (Bermingham *et al.*, 1999; Kawamoto *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2012) inclusive se han transfectado células de cócleas dañadas de conejillos de las Indias con cDNA para Math1/Atoh1 logrando una regeneración de CCOI fisiológicamente funcionales; en tanto que Miosina VIIa es una proteína estructural exclusiva de las células epiteliales tal como lo son las CCOI, en experimentos realizados para estudiar la hipoacusia en mamíferos en los cuáles se provoca la pérdida de las CCOI utilizando drogas ototóxicas no se detecta Miosina VIIa en la cóclea (Izumikawa *et al.*, 2005), existen mutaciones que afectan directamente la expresión de esta proteína, las

consecuencias pueden ser una baja o inclusive nula proliferación de CCOI durante el desarrollo embrionario desencadenando así sordera congénita (Sahly *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1997). Dada la importancia que tienen Math1/Atoh1 y Miosina VIIa en el funcionamiento y estructura de las CCOI fue importante el marcaje de ambas proteínas para determinar la derivación de CCOI.

Se esperaba que la coexpresión de los marcadores utilizados fuera gradual de menor a mayor a través de los 3 puntos de muestreo, ya que las dos primeras etapas consistieron en la diferenciación y expansión de células precursoras de CCOI. Sin embargo, en los resultados obtenidos a través del marcaje para Math1/Atoh1 – Miosina VIIa se puede apreciar que desde las 240 h de iniciado el proceso de diferenciación existe una fluorescencia bastante marcada que se mantiene hasta el término del experimento por lo que es probable que el paso hacia CPN se diera antes de las 240 h. De acuerdo al método propuesto por Li *et al.* 2003 (el cual fue modificado para realizar nuestros experimentos) se muestra la expresión de Math1/Atoh1 – Miosina VIIa una vez concluidas las tres etapas del proceso; los progenitores neurales cultivados con los factores de crecimiento y expandidos durante las primeras 2 etapas fueron positivos para Nestina, un gen altamente expresado en CPN (Kawaguchi *et al.*, 2001; Rani *et al.*, 2005); pero negativos para Miosina VIIa y Math1/Atoh1. Para reforzar la hipótesis de que en la estrategia experimental propuesta en ésta tesis, las CPN se diferenciaron antes de las 240h, los ensayos de inmunocitoquímica realizados para la expresión de Nestina a las 240h de iniciado el proceso fueron negativas en nuestros cultivos. Los cálculos estadísticos mostraron que no hubo diferencias en el número de células que coexpresaron los marcadores entre los diferentes tiempos de muestreo, por lo que el método que se propone supondría una forma más eficaz para diferenciar CC's durante las primeras 240 h.

La temprana expresión de los marcadores observada pudo deberse a la exposición directa de las CTER a los factores de crecimiento utilizados, dado que cada uno de ellos desempeña un papel importante en el desarrollo del oído interno durante la embriogénesis. De los tres factores de crecimiento utilizados FGF-2 (también llamado bFGF), así como IGF-1 son los que más actividad tienen en los procesos de diferenciación durante el

desarrollo, maduración y regeneración de las CCOI en varios grupos de vertebrados (Yamashita, 1994; Millimaki *et al.*, 2007). En embriones tempranos de ratón la expresión de bFGF comienza en células adyacentes a la placoda ótica, para posteriormente restringirse a etapas más tardías sólo a la zona sensorial (Wilkinson *et al.*, 1989), además se ha demostrado que utilizados en conjunto en medios químicamente definidos pueden potenciar la proliferación de neuroesferas, así como la diferenciación de CE hacia CCOI en cultivos *in vitro*. En tanto que EGF sólo posee una actividad mutagénica siendo mayor en presencia de insulina o IGF-1 (Li *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 1997), actualmente no se habían expuesto de forma directa CTE a alguno de los factores de crecimiento, por lo que al parecer, la estrategia propuesta para la exposición en conjunto de los tres factores, dadas las características mitogénicas que poseen, permitió una diferenciación hacia CCOI en un corto plazo de tiempo, siendo mayor la cantidad de CCOI durante las 2 primeras fases en comparación con la última; así la tasa de proliferación junto con el tiempo de duplicación calculados corresponden no a las CPN, sino a las CCOI; sin embargo con los datos presentados aquí no hay forma de corroborarlo, debido a que no hay referencias a la tasa de proliferación específica ni al tiempo de duplicación de las CCOI cultivadas *in vitro*; por lo que es importante realizar un conteo celular y de viabilidad en etapas tempranas y durante todo el proceso de diferenciación, para determinar las etapas de fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte del proceso de diferenciación propuesto.

El realizar diferenciación en cultivos en monocapa, utilizando medios químicamente definidos permiten tener un mayor control sobre los procesos de diferenciación y son más eficientes (Xing *et al.*, 2003), por lo que el método propuesto para obtener CCOI a partir de CTER en base a los resultados obtenidos podría ser más eficiente, obteniendo una gran cantidad de células diferenciadas en un lapso de tiempo menor, además no sería necesaria la utilización de CE ni cocultivo, evitando la diferenciación espontánea que ocurre en los CE por un lado, por el otro la introducción de factores desconocidos que podrían ser riesgosos al utilizar técnicas de cocultivo, ya que para ésta práctica por lo general son líneas celulares tumorígenas (Yan *et al.*, 2005).

A través del método propuesto se pudieron obtener CCOI en cada una de las fases del experimento, sin embargo, hacen falta más puntos de muestreo sobre todo durante los primeros 5 días para determinar si las CPN se formaron durante este lapso de tiempo. También deben de realizarse pruebas utilizando técnicas de biología molecular para conocer los patrones de expresión de los marcadores Math1/Atho1 y Miosina VIIa durante todo el proceso, y así poder reforzar los resultados obtenidos. La traslación de este proceso de diferenciación en células troncales embrionarias humanas, células pluripotentes inducidas de origen humano podrían derivar a células ciliadas del oído interno con potencial aplicación clínica.

10. Conclusiones

La tasa de crecimiento específico durante la fase exponencial de proliferación de las células troncales embrionarias (E14Tg2a) de ratón en una superficie de 10 cm² es de 0.024 h⁻¹ y su tiempo de duplicación es de 28.8 días.

El medio GMEM suplementado con EGF, IGF-1, bFGF y suplemento N2, parece ser más óptimo para diferenciar CTER a CCOI en comparación con el medio F-12K adicionado con los mismos factores de crecimiento a concentraciones iguales.

Es posible derivar CCOI *in vitro* a partir de CTER en cultivo en monocapa, utilizando un medio químicamente definido sin hacer uso de CE, células alimentadoras o transfección viral.

A través del método propuesto, podemos obtener CCOI a partir de CTER en un periodo relativamente corto (240 h).

El tasa de crecimiento específico en la fase exponencial de proliferación de las CCOI cultivadas *in vitro* tiene un valor de 0.003005 h⁻¹ con un tiempo de duplicación de 9.6 días.

11. Bibliografía

Albranches E., Bekman E., Henrique D., Cabral J.M.S. Expansion and neural differentiation of embryonic stem cells in adherent and suspension cultures. *Biotechnol Lett* 2003; 25: 725-730.

Avasti S., Srivastava R.N., Singh A., Srivastava M. Stem Cell: Past, Present and Future – A Review Article. *IJMU* 2008; 3(1): 22 – 30.

Avilion A., Nicolis S., Pevny L., Perez L., Vivian N., Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003; 17: 126-140.

Bermingham N., Hassan B.A., Price S.D., Vollrath M.A., Ben – Arie N. Eatock R.A., Bellen H.J., Lisakowski A., Zoqbi H.Y. Math1: An essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 1999; 284: 1837 – 1841.

Berrill A., Tan H.L., Wang S.C., Fong W.J., Choo A.B.H., Oh S.K.W. Assessment of stem cell markers during long-term culture of mouse embryonic stem cells. *Cytotechnology* 2004; 44: 77 – 91.

Chen W., Johnson S., Marcotti W., Andrews P., Moore H., Rivolta M. Human Fetal Auditory Stem Cells Can Be Expanded In Vitro and Differentiate Into Functional Auditory Neurons and Hair Cell-Like Cells. *Stem Cells* 2009; 27: 1196 – 1204.

Coleman B., Hradman J., Coco A., Epp. S., de Silva M., Crook J., Shepherd R. Fate to Embryonic Stem Cells Transplanted into the Deafened Mammalian Cochlea. *Cell Transplant* 2006; 15(5): 369 – 380.

Dallos P. The Active Cochlea. *J Neurosci* 1992; 12(12): 4575 – 4585.

Fernández J. & Hernández T. 2010, Fisiología Humana, McGraw Hill, 4^{ta} Edición, México, 1256 páginas.

Gearing D. P., Thut C.J., VandenBos T., Gimpel S. D., Delaney P.B., King J., Price V., Cosman D., Beckman M. P. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J* 1991; 10(10): 2839 – 2848.

Glavasky-Joksimovic A., Thonabulsombat C., Went M., Eriksson M., Ma H. y Olivius P. Morphological Differentiation of Tau –Green Fluocescent Protein Embryonic Stem Cells Into Neurons After Co-Culture with Auditory Brain Stem Slices. *Neuroscience* 2009; 162: 472 – 481.

Hardie NA, Shepherd RK. Sensorineural hearing loss during development: morphological and physiological response of the cochlear and auditory brainstem. *Hearing Res* 1999; 128:147–165.

Hasson T., Unconventional Myosins, the Basis for Deafness in Mouse and Man. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 801 – 805.

Hasson T., Gillespie P.G., Garcia J.A., McDonald R.B., Zhao Y., Yee A. G., Mooseker M.S., Corey D.P. Unconventional Myosins in Inner-Ear Sensory Epithelia. *J Cell Biol* 1997; 137(6): 1287 – 1307.

Izumikawa M., Minoda R., Kawamoto K., Abrashkin K.A., Swirdeski D.L., Dolan D.F., Brought D.E., Raphael Y. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by *Atoh1* gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 2005; 11(3): 271 – 276.

Kawaguchi A., Miyata T., Sawamoto K., Takashita N., Murayama A., Kamatsu W., Ogawa M., Okabe M., Tano Y., Goldman S.A., Okano H. Nestin – EGFP Transgenic Mice:

Visualization of the Self-Renewal and Multipotency of CNS Stem Cells. *Mol Cell Neurosci* 2001; 17(2): 259 – 273.

Kawamoto K., Ishimoto S.I., Minoda R., Brough D.E., Raphael Y. *Math1* Gene Transfer Generates New Cochlear Hair Cells in Mature Guinea Pig *In Vivo*. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23(11): 4394 - 4400.

Kelly M.C., Chang Q., Pan A., Lin X., Chen P. *Atoh1* Directs the Formation of Sensory Mosaics and Induces Cells Proliferation in the Postnatal Mammalian Cochlea *In Vivo*. *J Neurosci* 2012; 32(19): 6699 – 6710.

Kumar S. Stem Cells: A New Paradigm. *Indian J Hum Genet* 2006; 12(1): 4-10.

Kuroda T., Tada M., Kubota H., Kimura H., Hatano S., Suemori H., Nakatsuji N., Tada T. Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional *cis* Regulation of *Nanog* Gene Expression. *Mol Cell Biol* 2005; 25(6): 2475-2485.

Leake PA, Hradek GT. Cochlear pathology of long term neomycin induced deafness in cats. *Hearing Res* 1988; 33:11–33.

Lee E.H., Hui J.H.P. The potencial of stem cells in orthopaedic surgery. *Bone Joint J* 2006; 88 - B(7): 841 – 851.

Li H., Roblin G., Liu H., Heller S. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *P Natl Acad Sci USA* 2003; 100(3): 13495-13500.

Li H., Liu H., Heller S. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 2003; 9(10): 1293 – 1301.

Loebel D. A. F., Watson C. M., De Young R. A., Tam P. P. L. Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. *Dev Biol* 2003; 264: 1 – 14.

Loh Y., Wu Q., Chew J., Vega V., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J., Wong K., Sung K., Lee C., Zhao X., Chiu K., Lipovich L., Kuznetsov V., Robson P., Stanton L., Wei C., Ruan Y., Lim B., Ng H. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006; 38(4): 431-440.

Millimaki B.B., Sweet E.M., Dhasan M.S., Riley B.B. Zebrafish *atoh1* genes: classic proneural activity in the inner ear and regulation by Fgf and Notch. *Development* 2007; 134: 295 – 305.

Murray P., Edgar D. The topographical regulation of embryonic stem cell differentiation. *Philos T Roy Soc B* 2004; 359: 1009 – 1020.

Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Schöler H., Smith A. Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* 1998; 95: 379 – 391.

Niwa H., Burdon T., Chambers I., Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Gene Dev* 1998; 12: 2048 – 2060.

Oshima K., Shin K., Diensthuber, Peng A.W., Ricci A. J., Heller S. Mechanosensitive Hair Cell-Like Cells from Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* 2010; 141: 704 – 716.

Okumura S., Saito M., Niwa H., Ishikawa F. Oct-3/4 and Sox2 Regulate *Oct-3/4* Gene in Embryonic Stem Cells. *J Biol Chem* 2005; 280(7): 5307 – 5317.

Parker T.J. & Haswell W.A., 1987, Zoología. Cordados, Editorial Reverte, México, 981 páginas.

Peciller M., Giráldez F., Pumarola F., Barquinero J. Células madre en el tratamiento de la sordera. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2005; 56: 227 – 232.

Raphael Y. Cochlear pathology, sensory cell death and regeneration. *Brit Med Bull* 2002; 69:25 – 38.

Raphael Y. & Altschuler R.A. Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull* 2003; 60: 397 – 422.

Ramakrishna V., Janardhan P.B., Sudarsanareddy L. Stem Cells and Regenerative Medicine – A Review. *Annu Rev Res Biol* 2011; 1(4): 79 – 110.

Rani S.B., Mahadevan A., Anilkumar S.R., Raju T.R., Shankar S.K. Expression of nestin – a stem cell associated intermediate filament in human CNS tumors. *Indian J Med Res* 2005; 124: 269 – 280.

Rivolta M. N. New strategies for the restoration of hearing loss: challenges and opportunities. *Brit Med Bull* 2013; 105: 69 – 84.

Rodda D.J., Chew J., Lim L.H., Loh Y.H., Wang B., Ng H.H., Robson P. Transcriptional Regulation of *Nanog* by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* 2005; 280(26): 24731-24737.

Sahly I., El – Amraoui A., Abitbol M., Petit C., Dufier J.L. Expression of myosin VIIA during mouse embryogenesis. *Anat Embryol* 1997; 196: 159 – 170.

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

Silva J., Nichols J., Theunissen T.W., Guo G., van Osten A.L., Barrandon O., Wray J., Yamanaka S., Chambers I., Smith A. Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell* 2009; 138: 722 – 737.

Smith A. G. Embryo – Derived Stem Cells: Of Mice and Men. *Annu Rev Cell Dev Bi* 2001; 17: 435 – 462.

Tomioka M., Nishimoto M., Miyagi M., Katayanagi T., Fukui N., Hitoshi N., Muramatsu M., Okuda A. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct3/4 – Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(14): 3202 – 3213.

Torres M. & Giráldez F. The development of the vertebrate inner ear. *Mech Develop* 1998; 71: 5 – 21.

Tortora G. – Derrickson B., 2006, Principios de Anatomía y Fisiología, Editorial Médica Panamericana, 11ª Edición, México, páginas 60 – 62.

Viswanathan S., Benatar T., Rose-John S., Lauffenburger D.A., Zandstra P.W. Ligand/Receptor Signaling Threshold (LIST) Model Accounts for gp 130-Mediated Embryonic Stem Cell Self-Renewal Responses to LIF and HIL-6. *Stem Cells* 2002; 20: 119 – 138.

Wilkinson D.G., Bhatt S., McMahon A.P. Expression pattern of the FGF-related proto-oncogene *int-2* suggests multiple roles in fetal development. *Development* 1989; 105: 131 – 136.

Wolpert L., Jessell T., Lawrence P., Meyerowitz E., Robertson E., Smith J., 2007, Principles of Development, Tercera Edición, Oxford University Press, Estados Unidos, 551 páginas.

Xing Q.L., Stavridis M., Griffiths D., Li M., Smith A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 183 – 186.

Yamashita H., Oesterlet E.C. Induction of cell proliferation in mammalian inner – ear sensory epithelia by transforming growth factor α and epidermal growth factor. *P Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3152 – 3155.

Yan Y., Yang D., Zarnowska E.D., Du Z., Werbel B., Valliere C., Pearce R.A., Thomson J.A., Zhang S. Directed Differentiation of Dopaminergic Neuronal Subtypes from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 2005; 23: 781 – 790.

Ying Q.L., Nichols J., Chambers I., Smith A. BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cells Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell* 2003; 115: 281 – 292.

Ylikoski J, Pirvola U, Moshnyakov M, Palgi J, Arumae U, Saarma M. Expression patterns of neurotrophin and their receptor mRNAs in the rat inner ear. *Hearing Res* 1993; 65: 69–78.

Zheng J.L., Helbig C., Gao W.Q. Induction of Cell Proliferation by Fibroblast and Insulin-Like Growth Factors in Pure Rat Inner Ear Epithelial Cell Cultures. *J Neurosci* 1997; 17(1): 216 – 226.