



## DIFERENCIACIÓN DIRIGIDA DE CÉLULAS CILIADAS DEL OÍDO INTERNO A PARTIR DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS DE RATÓN, EN UN MEDIO QUÍMICAMENTE DEFINIDO Y LIBRE DE CÉLULAS ALIMENTADORAS

Juárez-Mancera Miguel Ángel.\*\*; Navarro – Meneses Rafael Manuel\*.; Mondragón-Terán Paul\*\*.

\*Dirección Médica del ISSSTE; \*\* Laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos, Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE. México D.F. C.P. 03100. [p.mondragonteran@gmail.com](mailto:p.mondragonteran@gmail.com)

*Palabras clave: Células Troncales Embrionarias, Diferenciación, Células Ciliadas del Oído Interno*

**Introducción.** Las células troncales embrionarias (CTE) por definición poseen dos características: autorenovación conservando su capacidad pluripotente y la habilidad para diferenciarse en diversos linajes celulares, bajo condiciones apropiadas (1). La capacidad para dirigir la diferenciación de las CTE hacia determinados tipos celulares específicos es una alternativa viable en medicina regenerativa (2). La sordera es una afección muy común e involucra la pérdida de las células ciliadas del oído interno (CCOI) y sus neuronas asociadas (neuronas ganglionares en espiral) (3). Debido al nulo potencial regenerativo de las CCOI en mamíferos, muchos tipos de desórdenes auditivos congénitos y adquiridos tienen su origen en la pérdida de estas células; teniendo como consecuencia la pérdida de la audición (4). Investigaciones recientes, basadas en la terapia celular; se han enfocado en el reemplazo o restauración de las CCOI. Las CTE son excelentes candidatos para la implantación biológica, ya que tienen el potencial para proliferar y diferenciarse en ese tipo de células especializadas (5).

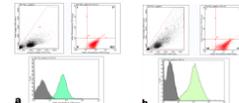
**Objetivo.** Obtener células ciliadas del oído interno a partir de células troncales embrionarias de ratón a través de un proceso de diferenciación dirigida en cultivo de monocapa utilizando un medio químicamente definido y libre de células alimentadoras.

**Metodología.** Mantenimiento de las CTE: Cultivo en medio GMEM adicionado con LIF, realizando el pasaje de las células durante la fase exponencial.

Diferenciación: Se utilizaron CTE de ratón (E14Tg2a, donadas por UCL). Se inocularon  $1 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>, cultivadas en medio GMEM sin suero fetal bovino (FBS) y sin LIF durante 16h para promover la adhesión. El método propuesto para la diferenciación de las CTE hacia CCOI involucra 3 etapas; todas en medio químicamente definido, cultivo en monocapa y libres de células alimentadoras; **1) Generación de CPN**, cultivo en medio GMEM adicionado con IGF-1 (50 ng·mL<sup>-1</sup>), EGF (20 ng·mL<sup>-1</sup>) y suplemento N2, renovando el medio cada 48h. Se cultivaron bajo estas condiciones durante 240h; **2) Expansión de las CPN**; el medio fue sustituido por GMEM adicionado con IGF-1 (50 ng·mL<sup>-1</sup>), EGF (20 ng·mL<sup>-1</sup>), bFGF (10 ng·mL<sup>-1</sup>) y suplemento N2, renovando el medio cada 48h durante 192h. **3) Especialización de los CPN hacia CCOI**, cultivo en

ausencia de los factores de crecimiento durante 240h en medio GMEM sin suero y adicionado con suplemento N2. La evaluación del estado pluripotente y de la diferenciación celular se llevó a cabo por inmunocitoquímica y citometría de flujo, utilizando marcadores específicos: Nanog y OCT3/4 para las CTE; Math1 y Myosin VIIa para las CCOI.

### Resultados.



**Fig1.** Citometría de flujo de las CTE. Se observa un porcentaje de pluripotencia mayor a 95%. a) Nanog; b) OCT3/4.



**Fig2.** Inmunocitoquímicas después de 672h de diferenciación. a) Campo claro; b) Núcleos teñidos con DAPI; c) Expresión de Math1 utilizando el fluoróforo TRIT-C; d) Expresión de Myosin VIIa con el fluoróforo FIT-C; e) Coexpresión de ambos marcadores, dicha coexpresión es fundamental para determinar la presencia de células ciliadas del oído interno.

**Conclusiones.** De acuerdo al procedimiento propuesto; es posible generar CCOI, a través de cultivo en monocapa, sin utilizar células alimentadoras y en un medio químicamente definido. La coexpresión de Math1 y Myosin VIIa nos permitió determinar la presencia de CCOI.

**Agradecimiento.** Trabajo financiado por el Programa E015 – Investigación Científica y Tecnológica - ISSSTE.; a la MC Rebeca Pérez, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por su apoyo con el microscopio de epifluorescencia.

### Bibliografía.

- (1) Ramakrishna V., Janardhan P.B., Sudarsanareddy L. Annual Review & Research in Biology 2011; 1(4): 79 – 110.
- (2) 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. Nature Genetics 2006, 38(4): 431-440.
- (3) Chen W., Johnson S., Marcotti W., Andrews P., Moore H., Rivolta M. Stem Cells 2009; 27: 1196 – 1204.
- (4) Glavasky-Joksimovic A., Thonabulsombat C., Went M., Eriksson M., Ma H. y Olivius P. Neuroscience 2009; 162: 472 – 481.
- (5) Rivolta M. N. British Medical Bulletin 2013; 105: 69 – 84.