

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SUBDIVISIÓN DE MAESTRÍAS Y DOCTORADOS
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
COORDINACIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN MÉDICA**

**RESPUESTA DEL ÓRGANO DE CORTI DE RATAS SORDAS, POSTERIOR A LA
APLICACIÓN DE CÉLULAS MADRE ADULTAS DE MÉDULA ÓSEA.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C. MANUEL MARTÍN FÉLIX TRUJILLO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. SYLVIA LETICIA VERDUGO DÍAZ



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.

COMITÉ TUTORIAL

DRA. SANDRA OROZCO SUÁREZ

DR. EFRÉN ISRAEL GRIJALVA OTERO

DRA. MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ GARCÍA

DRA. EDITH VALDÉZ MARTÍNEZ

COLABORADORES

DR. JORGE EDUARDO RAMÍREZ.

BIOL. LORENA ALLINE BECERRIL.

BIOL. VINNITSA BUZOIANU ANGUIANO.

Por su generosidad y confianza, mi permanente gratitud a:

Mi esposa: María del Carmen Jiménez Alcaráz.

Mis hijos: Andrés y Daniela

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioelectromagnetismo del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México y La Unidad de Investigación en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

No hubiera sido posible, sin el apoyo incondicional de la Dra. Sylvia Leticia Verdugo Díaz, Tutora.

CONTENIDO

1. Resumen	6
2. Antecedentes	9
3. Justificación	20
4. Planteamiento del problema	21
5. Objetivos	22
6. Hipótesis	23
7. Material y métodos	24
a) Diseño del estudio	24
b) Tipo de estudio	24
c) Animales de estudio	24
d) Identificación de variables	24
e) Tamaño de muestra.	25
f) Descripción del estudio	25
g) Análisis estadístico	35
8. Factibilidad	36
9. Resultados	37
10. Discusión	41
11. Conclusiones	47
12. Bibliografía	48
13. Figuras y Tablas	55
14. Anexos	73

RESUMEN.

Introducción. En los mamíferos, el daño y la pérdida de las células receptoras sensoriales (células ciliadas) del oído interno, resulta en una pérdida de audición sensorineural permanente.

Muchas de las pérdidas auditivas congénitas o adquiridas son causadas por daño o pérdida de las células ciliadas cocleares o de sus neuronas asociadas. La sordera irreversible en los mamíferos es causada por su incapacidad de sustituir las células perdidas, esta es la causa más frecuente y más importante de pérdida de audición ya que estas células a la fecha no son reemplazables.

El tratamiento de la pérdida auditiva consiste en la utilización de auxiliares auditivos o implante coclear, ambas opciones restauran la audición con resultados limitados.

Las investigaciones recientes enfocan sus esfuerzos a la manipulación genética (terapia genética) y al trasplante de células madre para reparar o reemplazar las células ciliadas cocleares dañadas en los mamíferos. Un avance importante en el uso de las células madre para sustituir las células del oído interno, fue el descubrimiento de la generación de células ciliadas a partir de células madre embrionarias, células madre adultas del oído interno, células madre adultas de médula ósea y neuronales, tales células se consideran pluripotentes y por consiguiente en teoría pueden originar todas las células del oído interno

Objetivo. Conocer el efecto producido por la administración de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea, sobre la respuesta del órgano de Corti, en oídos de ratas con sordera secundaria.

Animales, material y métodos. Se utilizaron 18 ratas adultas (machos) de la cepa Wistar, con peso de 180 a 210 g, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) seleccionadas al azar en tres grupos, 6 para el grupo de experimental,

6 para el grupo control y 6 como grupo simulado o sham. Como estudio basal y en condiciones de laboratorio, se corroboró en los tres grupos, el umbral auditivo en las frecuencias de 1000, 2000, 4000, 8000 Hz utilizando potenciales provocados auditivos de tallo cerebral (PPATC onda I, III y V) y potenciales provocados auditivos de estado estable (PPAEE con equipo Audix Neuronic). Corroborada la audición normal, el grupo experimental fue sometido a extracción de 500 μ L de médula ósea/sangre, para desarrollar el cultivo de células mesenquimales durante quince días. Así el injerto fue realizado en forma autóloga para evitar el rechazo inmunológico. Posteriormente los grupos de estudio fueron sometidos a aplicación intraperitoneal (i. p) de una dosis de sulfato de amikacina 125 mg/kg más furosemida 150 mg/kg. ⁽²⁹⁾ para producir sordera sensorineural profunda. A la 1^a y 2^a semana posterior a la aplicación del aminoglucósido y el diurético, se realizó (PPAEE) y (PPATC) para corroborar la sordera. Se consideraron sordos aquellos animales que presentaron umbrales sensoriales superiores a 110 dB nHL. Si una dosis no fue suficiente para producir la sordera, se aplicó una segunda dosis. Quince días después de colocado el aminoglucósido, la furosemida, establecido el diagnóstico de sordera y terminado los cultivos de células mesenquimales, se realizó la aplicación del trasplante (1×10^5 células / 20 μ L de PBS) a través del canal semicircular lateral derecho, previa determinación del fenotipo inmunológico de las células mesenquimales por citometría de flujo y su viabilidad por el método de exclusión con azul de tripano. El oído izquierdo fue destruido quirúrgicamente para evitar confusión durante la realización de los potenciales provocados del tallo cerebral de control.

El grupo simulado fue sometido al mismo procedimiento y recibió por la misma vía 20 μ L de PBS pero sin células mesenquimales.

En los tres grupos se realizaron (PPAEE) en 1000, 2000, 4000, 8000 Hz, así como (PPATC) para buscar la onda I, III y V a los 15 y 30 días posteriores a los implantes. ⁽⁵⁰⁾

Resultados. Diez y siete animales fueron revisados para valorar la respuesta del órgano de Corti. *En el grupo trasplantado* 5 de 6 animales (83.3%), mostraron respuesta de este órgano. El análisis entre

grupos, nos permitió corroborar una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.015$ (Prueba exacta de Fisher) posterior al trasplante a favor del grupo trasplantado, cuando se analizó respuesta presente o respuesta ausente, de igual forma se encontró una respuesta estadísticamente significativa, $p < 0.001$ (anova) entre los grupos de estudio, cuando se analizó respuesta medida en decibeles. *Grupo control y grupo simulado*. En estos grupos ningún animal mostró respuesta del órgano de Corti, no se encontraron diferencias en la respuesta de este órgano.

2. ANTECEDENTES

Uno de los mayores retos para las enfermedades del oído interno, es encontrar un tratamiento para la sordera causada por pérdida de células ciliadas o de neuronas del ganglio espiral. ⁽¹⁻⁴⁾

El término sordera describe la falta absoluta de respuesta al sonido amplificado. Los afectados con sordera bilateral son completamente incapaces de recibir y reaccionar al sonido incluso con una amplificación acústica máxima. Cuando uno de los oídos es capaz de reaccionar al estímulo sonoro no se puede hablar de sordera. ^(2,3)

La incidencia de sordera hereditaria es alta, se estima un caso por cada 1000 nacimientos y otro por cada 1000 llega a quedar sordo antes de ser adulto. ^(1,3) Dependiendo de la edad de inicio la pérdida de audición puede afectar la adquisición de lenguaje oral, desarrollo cognoscitivo y psicosocial. ^(4,5)

La prevalencia de sordera adquirida está aumentando a la par del incremento de la edad y la exposición a ruido por parte de la población. Se estima que uno de cada tres adultos mayores de 65 años presenta una hipoacusia invalidante por lo que la sordera constituye uno de los trastornos crónicos más frecuentes con más de 250, 000,000 afectados en todo el mundo. ⁽⁴⁻⁵⁾ En México solo en la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital General Centro Médico Nacional “La Raza” en cuyo interior se encuentra el primer y más grande centro otológico del país, el 62% de la consulta y cirugía se debe a patología de oído y de éstos casi el 23% tienen sordera profunda y severa. Según estadísticas del INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) el 2.61% de la población nacional padece alguna discapacidad y de éstas el 16.52% es auditiva, considerándola un problema de salud, por lo que la detección debería hacerse desde el nacimiento y junto a ésta la instalación inmediata de tratamiento para que el paciente esté en posibilidad de integrarse a la sociedad con éxito.

El sentido del oído está estrechamente ligado a nuestra interacción con nuestro medio. Los componentes celulares del oído interno son vulnerables a una gran variedad de agentes tóxicos. Todo el sentido de la audición está sustentado en una fina capa de células sensoriales un poco menos de 15,000 por oído interno. Esas células ciliadas son los transductores mecano-eléctricos del oído. La deflexión de los haces estereociliares induce a la producción de potenciales de acción en el nervio auditivo. Las células ciliadas son el elemento principal del órgano de Corti. Éste junto con la escala timpánica y vestibular conforman la cóclea membranosa rodeada por una cápsula de hueso llamada cóclea ósea. En conjunto la cóclea tiene forma de cono aplanado con base de 9mm de diámetro y altura de 5mm y una capacidad de aproximada de 2 mL. ⁽¹⁻³⁾

El diagnóstico de sordera es fácil de realizar. Lo podemos corroborar de manera objetiva ya sea por potenciales provocados auditivos trasientes del tallo encefálico (PPATC) y más recientemente por potenciales provocados auditivos de estado estable (PPAEE), ambos con una sensibilidad y especificidad superior al 96%. ⁽⁵⁾

Al hablar de sordera podemos percibir que los tratamientos son escasos. Uno de los más recientes es el implante de cóclea (implantes cocleares) y de tallo cerebral, los segundos altamente costosos y riesgosos para la vida; los primeros además de costosos, lo cuál los pone al alcance de apenas unos pocos, se encuentran con resultados todavía muy controvertidos y sin alguna utilidad en aquellos pacientes estrictamente sordos. ⁽⁶⁻⁸⁾

Subyacente a la irreversibilidad de la sordera en los mamíferos, está la incapacidad de reemplazar las células ciliadas perdidas; la sordera humana es en la mayoría de los casos, una consecuencia de la pérdida de las células ciliadas. ^(10,11)

En los últimos años ha surgido una nueva rama de la medicina denominada medicina regenerativa. Esta se encuentra basada fundamentalmente en los nuevos conocimientos sobre las células madre y su capacidad de diferenciarse a células de diferentes tejidos. ⁽⁹⁾ El objetivo en nuestro campo, es el estudio

y la aportación que estas células pueden dar sobre la capacidad para generar una respuesta del órgano de Corti posterior a ser implantadas en organismos con sordera. ^(10,11)

CÉLULAS MADRE O TRONCALES

Una célula madre se define como una célula que tiene capacidad de autorrenovarse mediante divisiones mitóticas o bien de continuar la vía de diferenciación para la que está programada y, por lo tanto, producir células de uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados en función de su grado de multipotencialidad. Es común que se las denomine stem cells, en inglés, donde stem significa tronco, traduciéndolo más a menudo como células troncales. ^(9,13)

El cigoto formado tras la fecundación de un óvulo por un espermatozoide es una célula capaz de generar un nuevo individuo completo. Esta corresponde a una célula madre totipotente: capaz de producir un espécimen completo con todos sus tejidos. Entre los días primero al cuarto del desarrollo embrionario, la célula original va dividiéndose en varias células más. Cada una de estas células, si es separada del resto, es capaz de producir un individuo completo. Son también células totipotente. A partir del cuarto día del desarrollo embrionario se forma el blastocito, formado por una capa externa que forma la placenta y las envolturas embrionarias, se llama trofoblasto y una masa celular interna que formará todos los tejidos del cuerpo humano, se llama embrioblasto. Las células de la masa celular interna del blastocito ya no son totipotentes, puesto que una sola de estas células ya no es capaz de generar un individuo completo. Las células de la masa celular interna del blastocito son células pluripotentes.

Existen cuatro tipos de células madre: células madre totipotentes; pueden crecer y formar un organismo completo (las tres capas embrionarias, linaje germinal, los tejidos que darán lugar al saco vitelino y la placenta), es decir todos los tipos celulares. Células madre pluripotentes; no pueden formar un organismo completo, pero sí cualquier otro tipo de célula correspondiente a las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo) así como el germinal y el saco vitelino, no así la placenta. Células madre multipotentes; solo pueden generar células de su misma capa (una célula madre

mesenquimal de la médula ósea, al tener naturaleza mesodérmica, dará origen a células de esa capa como miocitos, adipocitos entre otras). Células madre unipotentes; pueden formar solo un tipo de célula particular. Existen diferentes tipos de células madre de acuerdo a su fuente de obtención. Célula madre embrionaria (pluripotentes); se encuentran en la masa celular interna del blastocito. Célula madre germinales (pluripotentes); se trata de células madre que derivan de los esbozos gonadales del embrión que darán lugar a los óvulos y espermatozoides. Células madre adultas (multipotentes); son células no diferenciadas que se encuentran en tejidos y órganos adultos y que poseen la capacidad de diferenciarse para dar lugar a células adultas del tejido en el que se encuentran, por lo tanto se consideran células multipotenciales, las células madre adultas de médula ósea son las mas conocidas, aunque se conocen hasta ahora alrededor de veinte tipos distintos en diversos tejidos como piel, grasa, hígado, etc. (15, 17, 18, 19)

Durante varios años se consideró que la célula madre hematopoyética era la única célula en la médula ósea con capacidad generativa. Estudios recientes han mostrado que la composición de la médula ósea es más compleja, pues se han identificado varias células madre, entre las que se encuentran células hematopoyéticas y mesenquimales (estromales). (15 - 20)

Los trabajos recientemente publicados sugieren que la potencialidad de las células madre adultas de médula ósea es mayor de lo esperado, ya que se ha demostrado tienen capacidad de diferenciarse en tejidos derivados de cualquiera de las tres capas embrionarias; principalmente las de tipo mesenquimal. (9, 14, 15, 19, 23)

Estas células mesenquimales han mostrado en determinadas condiciones, la misma capacidad para diferenciarse que las células embrionarias, es decir diferenciarse en células derivadas de las tres capas embrionarias (musculares, vasculares, nerviosas, hematopoyéticas, óseas, etc.). Esto ha creado nuevas perspectivas para el tratamiento de diferentes enfermedades que inicialmente se pensaba solo podía hacerse con las células embrionarias. (9, 12, 13)

Un aspecto que se debe destacar y que conforma el elemento básico de la medicina regenerativa, es que el organismo emplea para su auto-reparación teóricamente los mismos factores intra e intercelulares, es decir la terapia celular, la administración de elementos subcelulares y la ingeniería de tejidos, se reemplazan las células dañadas por células sanas por medio de diversos procesos que semejan a los que se observan en determinados tejidos de los individuos sanos. ^(9, 11-13)

Numerosos estudios básicos han demostrado la existencia de una serie de controles internos que a modo de relojes marcan a las células el número de divisiones simétricas antes de empezar el proceso de diferenciación que dará lugar a una estirpe celular concreta, proceso que a su vez se complementa con proteínas específicas (activadoras/inhibidoras) implicadas en el ciclo celular. También se ha demostrado la existencia de controles externos como un conjunto de señales paracrinas y autocrinas entre la célula madre – hijas y las vecinas, entre estas señales se destacan:

1. Factores secretados como señales químicas entre los que se incluyen numerosas citocinas.
2. Interacción célula – célula a través de proteínas de membrana.
3. Interacciones de las células con la matriz extracelular por medio de proteínas de membranas, denominadas integrinas.

En muchos de estos casos, la señal externa interacciona con su receptor de membrana lo que se transduce en el interior de la célula como una cascada de señalizaciones, es decir, un conjunto de reacciones bioquímicas que finalmente acaba en la activación y/o desactivación de un grupo de genes. Aunado a lo anterior, existe la plasticidad de la célula progenitora y su concepto de transdiferenciación celular. ⁽⁹⁻¹³⁾ Las investigaciones actuales demuestran que las células madre tienen capacidad pluripotencial en respuesta a un estrés tisular, activando mecanismos de desdiferenciación y rediferenciación que darán como punto final otro tipo celular. Otro concepto reciente es el de la fusión celular. Este fenómeno ha sido demostrado en experimentos realizados con cultivos de células procedentes de la médula ósea con células del corazón, hígado o neuronales. La fusión entre estas

células provoca un aporte de material genético nuevo que permite la sustitución de las células que se están degenerando por otras nuevas. ⁽⁹⁻¹³⁾

El significado biológico y la función natural de las células madre adulta de médula ósea y de las células madre embrionarias son muy diferentes. Las terapias que puedan derivarse del uso de unas u otras no son opcionales desde el punto de vista técnico. En el caso de las células madre adulta de médula ósea se trata de inducir y potenciar *in vivo* la función que ya naturalmente poseen. El posible uso terapéutico de las células madre embrionarias supondrá siempre extraerlas de su contexto natural (un embrión en desarrollo), madurarlas y transferirlas al enfermo. Incluso si se pudieran evitar los problemas éticos graves de producción y uso de embriones como medio de procesos terapéuticos, la agresividad en sí de tales procesos los hace insolventes médicamente por desproporción de los riesgos. Las células embrionarias no son una alternativa tan accesible como lo pudieran ser las células madre de médula ósea de sujetos adultos. ^(12,14)

CÉLULA MADRE MULTIPOTENTES.

Clásicamente se ha definido como una célula especializada de un tejido específico en un organismo ya formado, capaz de generar células del tejido que representa, a las que debe recambiar de forma natural. Proviene de las células madre pluripotentes que a su vez provienen de las células madre totipotentes. Poseen a lo largo de la vida del tejido capacidad multipotencial, es decir, son capaces de originar células de un órgano concreto en el adulto. El ejemplo más claro de este tipo celular es el de las células madre adultas de la médula ósea. En la médula ósea se han identificado varios tipos de células madre: hematopoyéticas, las cuales expresan como marcador de superficie CD34 para la identificación de estas células, así como otros recientemente encontrados CD133+, CD38+, CD117+ c-kit, CD38, Lin- (marcador de linaje celular), población lateral (CD34+ y CD34-), ovoides (se transforman en hepatocitos y células del árbol biliar señalándose como una subpoblación de células CD34+ Lin-), mesenquimales o estromales (SH2, SH3 Y SH4, CD29, CD44, CD71, CD90 y CD117) pueden generar la mayoría de los tipos celulares derivados de cualquiera de las 3 capas embrionarias. ^(5, 6, 11, 14)

Investigaciones actuales dan una mayor evidencia de que las células madre adultas de médula ósea tienen capacidad pluripotencial en respuesta a un estrés tisular. Existen numerosos trabajos con rigor científico metodológico, que demuestran que posterior a la colonización por parte de las células madre circulantes en la sangre periférica de órganos sometidos a daño tisular se regenera /repara el tejido dañado. Esta fue la observación que dio lugar al uso de la terapia celular en músculo cardíaco. ^(16 - 18)

Estas células se pueden obtener de forma autóloga, a partir de médula ósea o bien de sangre periférica posterior a movilización utilizando aféresis. De esta manera se evita la reacción de rechazo que se puede producir debido a la expresión de antígenos de histocompatibilidad diferentes a los del receptor. No se ha observado en las células madre de la médula ósea de adultos, el potencial teratogénico que tienen las embrionarias. Se ha señalado que las células madre adultas autólogas son capaces de proliferar *in vitro* con más de 120 divisiones celulares sin un aparente envejecimiento. ^(5, 6, 11,14)

Bartsch en el 2006⁽¹⁹⁾, demostró la utilidad de las células madre adultas autólogas de médula ósea, en muchos pacientes con oclusión arterial periférica severa, donde el tratamiento invasivo o quirúrgico no es de utilidad. En un estudio piloto de diez pacientes con enfermedad por oclusión arterial periférica severa con una capacidad de marcha menor a 200 m, se obtuvieron 80mL de médula ósea autóloga. Posteriormente se separaron las células mononucleares y se aplicó 10mL en la arteria y 5mL en los músculos de las extremidades inferiores con lo cual el trasplante fue realizado, dos semanas mas tarde la capacidad de marcha mejoró significativamente en todos los pacientes, así como los parámetros de oxigenación venosa – capilar, sin efectos colaterales o complicaciones. ^(18 - 19)

Su L, en el 2006⁽²⁰⁾, en un estudio piloto de 15 pacientes con diagnóstico de esclerosis múltiple progresiva, evaluó la efectividad y toxicidad del trasplante de células madre autólogas de médula ósea de adultos, las células madre fueron obtenidas periféricamente posterior a la movilización de la médula ósea hacia la sangre periférica, los resultados obtenidos fueron una tasa de 63.8% libre de progresión de enfermedad a los 48 meses. ^(18, 20, 21)

Van Laar en el 2006⁽²¹⁾, reporta una revisión de 700 pacientes que durante 10 años sufrieron de enfermedad auto inmune severa y quienes recibieron un trasplante de células madre adultas de médula ósea como tratamiento de su desorden, los cuales presentaron una remisión de alrededor de un tercio.
(21)

Ejemplos similares con la aplicación de células madre en diversos padecimientos las podemos encontrar en tejidos tan diversos como hígado, páncreas, vejiga, colon, retina y corazón ^(22, 37)

REGENERACIÓN AUDITIVA.

Un avance importante para utilizar células madre y tratar de reemplazar células dañadas del oído interno ha sido el descubrimiento de que se pueden generar células ciliadas *in vitro*, a partir de células madre embrionarias, del oído interno y de células madre adultas de la médula ósea. ^(24 - 25)

Se ha demostrado que una vez implantadas pueden integrarse en el oído interno en fases tempranas del desarrollo. De esta manera se abre la posibilidad de regeneración del oído interno lesionado y la posibilidad de aplicarlos a la clínica en el tratamiento de la sordera. ^(24 - 25)

En los oídos lesionados se ha demostrado que después del trauma o estrés celular, macrófagos y otros leucocitos producen factores de crecimiento o citocinas que pueden ayudar a la regeneración. Los factores de crecimiento son sustancias que promueven el crecimiento y la supervivencia celular a través de la división celular. Los principales factores de crecimiento utilizados para la regeneración y la generación mitótica *in situ* de células ciliadas de células incluyen: factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de insulina (IGF), factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa).
(24 – 26, 35)

De los diversos estudios relacionados con la utilización de células madre de médula ósea de adultos, como terapia para la regeneración de las células del oído interno, Nakagama e Ito ⁽²⁷⁾ posterior a la aplicación de células madre alogénicas en el oído interno de ratas, demostraron una alta sobrevivencia de células madre provenientes de médula ósea y una gran capacidad de migración hacia la escala media,

vestibular y timpánica y señala que el trasplante provee un amplio campo para el desarrollo de tratamientos para desórdenes del oído. ^(27 - 28)

Por otro lado Nayto ⁽²⁹⁾ evaluó la capacidad de las células madre adultas alogénicas de la médula ósea implantadas en el oído interno de cinco chinchillas tratadas con amikacina. El análisis histológico tres semanas después del implante, reveló células vivas implantadas en múltiples regiones dentro de la cóclea. Las células implantadas en la región basal de la cóclea, migraron a la porción terminal apical o incluso dentro del ligamento espiral. Además pudo demostrar su diferenciación en tejido neural y glial expresando su habilidad para diferenciarse en células ciliadas. Así, su sobrevivida migración y diferenciación dentro de las cócleas dañadas, sugiere su capacidad como tratamiento de varias enfermedades degenerativas del oído interno. ⁽²⁹⁾

Lang y col, ⁽³⁰⁾ en un estudio con ratas, demostró que se pueden obtener células del oído (células ciliadas) interno a partir de células hematopoyéticas, utilizando trasplante de células madre de médula ósea. ⁽³⁰⁾

Jeon y col, ⁽³¹⁾ demostró que las células madre mesenquimales de médula ósea, son progenitores *en vitro* para células ciliadas de oído interno. ⁽³¹⁾

Iwai y col, ⁽³²⁾ utilizaron ratas homocigotas y demostraron que el trasplante con células madre de médula ósea puede ser usado como tratamiento de la hipoacusia sensorineural profunda secundaria a enfermedades inmunológicas. ⁽³²⁾

Iguchi y col, ⁽³³⁾ estudió el oído interno después del implante de células madre adultas de médula ósea a través del canal semicircular lateral y de la pared lateral coclear. Encontró dos semanas después, que las células trasplantadas por el canal semicircular lateral mostraban una excelente sobrevivida, principalmente en la escala media, por otro lado el trasplante por la pared lateral de la cóclea presentó pérdida considerable de audición y crecimiento celular sobre todo en la escala timpánica y vestibular.

⁽³³⁾

Yoshida y col,⁽³⁴⁾ demostró en ratas a los que previamente había ocluido la irrigación a oído interno y producido degeneración y muerte de las células ciliadas con pérdida de la audición, que al aplicar células madre adultas de médula ósea, en comparación con un grupo al que no le aplicó ningún tratamiento, se evita la degeneración y muerte celular del órgano de Corti del grupo transplantado. Además demostró la presencia de células madre aplicadas en la rampa media a lo largo del órgano de Corti, diferenciado en tejido nervioso, además pudo constatar, que el factor neurotrófico derivado de células gliales(GCDNF), se incrementa después de la isquemia coclear en el grupo tratado con células madre obtenidas de médula ósea. Lo anterior demuestra que las células madre obtenidas de médula ósea, no solo funcionan diferenciándose en los tipos de células requeridos, sino utilizando además efectos parácrinos para la regeneración y reparación.⁽³⁴⁾

Kamiya y col,⁽⁵⁰⁾ demostró en un modelo de ratas con hipoacusia sensorial profunda que se genera por la muerte de fibroblastos cocleares la que es inducida por la aplicación de toxinas mitocondriales, regeneración activa de fibrocitos cocleares posterior a la aplicación de células madre mesenquimales, obtenidas de médula ósea, el cual fue aplicado a través del canal semicircular lateral rescatando así la audición residual.⁽⁵⁰⁾

Actualmente la comunidad científica a nivel mundial señala que existen diez razones para utilizar células madre adultas autólogas de médula ósea.⁽⁴⁹⁾

1. Capacidad de formar células de todo tipo de tejidos (pluripotencial).
2. Capacidad de dividirse en cultivo indefinidamente.
3. Control de la diferenciación.
4. No se transforman en células cancerígenas.
5. No producen rechazo inmunológico.
6. Mínima dificultad técnica para obtenerlas.
7. Aplicación clínica real.
8. No se tiene necesidad de disponer de un banco de óvulos humanos.

9. Reducido costo de su aplicación clínica.

10. Inexistentes problemas éticos.

Por estas razones la mayoría de los trabajos están enfocados a determinar la viabilidad de las células madre mesenquimales de médula ósea dentro del órgano de Corti y su capacidad para regenerarse dentro de éste, como lo demuestran recientes hallazgos en experimentos sobre el trasplante de células al oído interno, sugiriendo que esta terapia es potencialmente aplicable para proteger o regenerar células ciliadas en conjunto con neuronas del oído interno. ^(11, 13, 25, 37)

Con el presente estudio pretendemos corroborar los resultados reportados en la literatura y avanzar un poco más al conocer la respuesta funcional del órgano de Corti en las frecuencias clínicas, utilizando equipo de potenciales auditivos clínicos, una vez que realicemos el trasplante de células madre mesenquimales. Lo anterior es muy importante ya que por primera vez se buscan las frecuencias clínicas útiles al ser humano a través de potenciales clínicos.

El propósito es determinar a través de un estudio piloto, la eficacia inicial de un autotrasplante de células madre adultas mesenquimales obtenidas de médula ósea, sobre la respuesta del órgano de Corti, en los oídos de ratas con sordera secundaria.

3. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento de la sordera es uno de los retos más importantes en la medicina clínica, para aquellos oídos sordos que no tienen otra posibilidad de manejo, dado que el implante de tallo cerebral es altamente costoso, con grandes posibilidades de fracaso y con grandes complicaciones extracraneales e intracraneales, incluso con riesgo real de muerte durante el acto quirúrgico.

Por este motivo, es necesario considerar terapias alternativas para mejorar la audición, como la utilización de células madre adultas de médula ósea en un modelo de sordera secundaria en ratas y en un futuro para el tratamiento del paciente irremediablemente sordo.

4. PREGUNTA

¿Cuál es la eficacia de la aplicación de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea, sobre la respuesta del órgano de Corti, en oídos de ratas con sordera secundaria?

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer el efecto de la administración de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea, sobre la respuesta del órgano de Corti, en oídos de ratas con sordera secundaria.

Objetivos específicos

Cuantificar el efecto de la administración de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea, sobre la respuesta del órgano de Corti, a través de potenciales provocados auditivos de estado estable (PPAEE), en oídos de ratas con sordera secundaria.

Cuantificar el efecto de la administración de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea, sobre la respuesta del órgano de Corti, a través de potenciales provocados trasientes de tallo encefálico (PPATC), en oídos de ratas con sordera secundaria.

6. HIPÓTESIS

La administración de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea, mejorará la respuesta del órgano de Corti, en oídos de ratas con sordera secundaria.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Diseño del estudio. Estudio piloto, experimental

7.2. Tipo de estudio. Estudio prospectivo, longitudinal y comparativo.

7.3. Animales de estudio. Se utilizaron 18 ratas adultas (machos) de la cepa Wistar, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con peso entre 180 – 210 gramos, y diagnóstico audiológico de sordera sensorineural profunda, posterior a aplicación de aminoglucósidos y furosemida. ^(36, 38)

7.4. Lugar del estudio. El estudio fue realizado en el departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina UNAM y la Unidad de Investigación en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.

7.5. Identificación de variables

Variable independiente. Administración de células madre adultas de médula ósea.

Variable dependiente. Respuesta del órgano de Corti.

Definición de las variables de estudio

Administración de células madre adultas de médula ósea.

Definición conceptual. Se ha definido como una célula especializada dentro de la organización de las células de un tejido específico de un organismo ya formado, que pueden generar nuevos tipos celulares derivados de cualquiera de las 3 capas embrionarias. ^(5, 6, 12,15)

Definición operacional. Para fines de este estudio definimos esta variable como: la administración de células madre adultas mesenquimales de médula ósea a través del canal semicircular lateral (1×10^5 células en 20 μL de PBS (buffer-amortiguador- salino de fosfato pH 7.4) x 10 minutos a un flujo de 2 μl / minuto).

Indicadores de la variable.

Con administración de células madre adultas mesenquimales de médula ósea.

Sin administración de células madre adultas mesenquimales de médula ósea.

Escala de medición. Nominal.

Respuesta del órgano de Corti.

Definición conceptual. Respuesta originada por el órgano de Corti. ^(38, 48)

1- **Definición operacional.** Para fines de este estudio, definimos esta variable como: la presencia de respuesta en PPAEE en las frecuencias de 1000, 2000, 4000, 8000 Hz, y en los PPATC a través de la onda de I, III y V.

Indicadores. Respuesta del órgano de Corti presente.

Respuesta del órgano de Corti ausente.

Escala de medición. Nominal.

7.6. Tamaño de muestra. ^(41 - 46)

Utilizamos 6 animales para el grupo experimental, 6 para el grupo control y 6 para el grupo simulado o sham.

7.7. Descripción del estudio

7.7.1. Animales de estudio.

Se utilizaron 18 ratas adultas (machos) de la cepa Wistar, proveniente del bioterio de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con peso entre 180-210 gr, los

animales fueron mantenidos en condiciones controladas en el laboratorio de Bioelectromagnetismo localizado en el 5° piso edificio A del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina UNAM. Estas condiciones son: luz-oscuridad (luz 6:00-18:00), temperatura $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$., alimento y agua *ad libitum*, sus cuidados y limpieza realizados dos veces a la semana supervisados por personal veterinario del departamento.

7.7.2. Consideraciones éticas para el uso de animales.

Todos los animales fueron utilizados según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de título “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”.

La UNAM a través de la Facultad de Medicina y su Departamento de Fisiología cuenta con instalaciones destinadas para el alojamiento de los animales de experimentación, diseñadas para cubrir las necesidades de los sujetos experimentales, de los usuarios y del personal que interviene en su cuidado diario, lo anterior sancionado por la opinión calificada de un médico veterinario y la comisión de bioética de la misma facultad, a fin de asegurar y favorecer niveles satisfactorios de cuidado animal, Así facilitamos el bienestar del animal, satisfacemos las necesidades de la investigación y reducimos o eliminamos las variables de confusión experimentales. El presente trabajo fue aprobado por la Comisión de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y la Comisión Nacional de Investigación y Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social e hicimos todos los esfuerzos para evitar el sufrimiento de los animales.

Las técnicas realizadas (incluyendo la quirúrgica) fueron aplicadas por personas con expertis y experiencia en cada una de ellas, la muerte del animal se indujo de manera humanitaria, evitando al máximo el dolor y sufrimiento. En general se proporcionó un espacio adecuado que permitió movimientos y adopciones de las posturas normales de la especie y las interacciones sociales entre los mismos. El espacio fue cerrado, a prueba de escape y protegió al animal de amenazas externas, además adecuado en ventilación y conforme a las necesidades biológicas de la especie. Favoreció que los

animales se mantuvieran limpios, secos y nos permitió realizar la limpieza adecuada y observación de los mismos.

El alimento (Rodent Laboratory Chow, 5001) y el agua fueron proporcionados a libre acceso, sin modificaciones a la dieta y forma de suministrar los alimentos.

El animal fue manejado siempre con cuidado pero con firmeza, procurando la seguridad del personal que lo manipula. Se evitó la lucha y el estrés en todo momento. Las técnicas de sujeción, manipulación e inmovilización que se realizaron en el bioterio fueron supervisadas por el médico veterinario responsable. Para evitar dolor o molestia en los animales utilizamos tranquilizantes, analgésicos o anestésicos, en este trabajo no necesitamos efectuar procedimientos dolorosos sin el uso de anestesia, analgésico o tranquilizante, no utilizamos relajantes musculares o drogas paralizantes del tipo de la succinilcolina, guayacolato de glicerol o curariformes, cloroformo o dietiléter. La muerte del animal fue inducida de manera humanitaria eliminando el dolor y estrés.

7.7.3. Anestesia utilizada.

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital 0.5mL /kg diluido en 1.5 mL de solución fisiológica, utilizando jeringa de insulina de 1mL, el anestésico fue aplicado vía i.p, corroborando su estado anestésico sin respuesta a la presión de su cola.

7.7.4. Formación de los grupos y obtención del umbral auditivo basal a través de potenciales provocados trasientes del tallo encefálico (PPATC) y de estado estable (PPAEE).

Los animales fueron seleccionados al azar en tres grupos, 6 para el grupo de experimental, 6 para el grupo control y 6 como grupo simulado o sham. En condiciones de laboratorio y bajo sedación, se colocaron tres electrodos a través de agujas. Dos en posición ventrolateral al oído y uno en la región frontal del animal. Se aplicó un estímulo máximo de 110 dB con intervalos de 5dB y se corroboró en

los tres grupos, el umbral auditivo en las frecuencias de 1000, 2000, 4000, 8000 Hz utilizando PPATC (onda I, III y V) y PPAEE con equipo Audix Neuronic.

7.7.5. Obtención de médula ósea / sangre de tibia de las ratas y preparación de las células madre mesenquimales de médula ósea de adultos.

Corroborada la audición normal y previa anestesia, el grupo de estudio (experimental) fue sometido a extracción de 500 μ L de médula ósea/sangre, para desarrollar el cultivo de células mesenquimales durante quince días. Así el injerto fue obtenido en forma autóloga para evitar el rechazo inmunológico. Una vez anestesiada la rata, se procedió a la limpieza del tercio superior de la tibia en su cara interna, con una gasa impregnada con isodine espuma y posteriormente con benzal. Se hizo tricotomía del área y una incisión longitudinal de 1cm utilizando un bisturí con hoja 14; con tijeras de iris se disecaron los planos hasta llegar a hueso; se retiró el periostio y se colocó el separador de Wellstein. Con la ayuda de taladro Dremell Multipro 395. Broca de 0.5mm y microscopio de disección Nova USA 816303-09 se realizó la perforación del hueso en posición perpendicular a la superficie de la tibia hasta llegar al canal de la médula ósea. Una vez en médula ósea utilizando una jeringa nueva de 3 mL y catéter de polipropileno # 30 G ambos previamente impregnados con 200 μ L de una solución de heparina (PISA 1000UI/mL), se introdujo el catéter en la médula ósea y se aspiraron 500 μ L de médula ósea/sangre, usadas como donadoras de células madre para desarrollar el cultivo de células mesenquimales. Posteriormente se hizo hemostasia, se corroboró la ausencia de sangrado, se cerró la perforación en hueso con músculo del mismo animal y suturó por planos con vicril 4-0 y dermalón del 4-0. Finalmente se realizó limpieza de la herida con isodine y benzal líquido y regresó al animal a su jaula donde se vigiló hasta que se recuperó de su anestesia.

7.7.6. Obtención de células mononucleares por gradiente de histopaque (metodo modificado a partir de Guerrero - Godinez y col. ⁽⁵²⁾)

Los 500 μ L de médula ósea/sangre obtenidos por aspiración, se mezclaron con 2 mL de solución de Hank sin calcio ni magnesio (Gibco) en tubos de cultivo de poliestireno estériles de 5 mL (Sarstedt). En otro tubo de cultivo de 5 mL con 1 mL de histopaque estéril (Sigma) se colocaron 2.5 mL de la mezcla de médula ósea/sangre y solución de Hank.

Se centrifugó la preparación a 400 x g (Eppendorf 5702) por 30 minutos a temperatura ambiente. La corrida se detuvo sin freno. Cuidadosamente se recogieron 200 a 300 μ L de la interface turbia que se formó entre el medio acuoso y la capa de histopaque (células mononucleares o capa linfocitaria). Posteriormente se eliminó el histopaque restante mezclando la fracción de células mononucleares con 5 mL de solución básica de fosfatos (PBS) en un tubo de cultivo. Se centrifugó la muestra a 250 x g por 10 minutos; la corrida se detuvo sin freno. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 300 mL de medio de cultivo DMEM (Gibco) ⁽⁵²⁾.

7.7.7. Cultivo celular de células madre de la médula ósea.

El método de cultivo a utilizar según Kamiya y col. ⁽⁵⁰⁾

Se obtuvieron 200 μ L de la suspensión de células mononucleares y se sembraron sobre 4 cajas de cultivo de poliestireno de alta calidad de 3.5 cm de diámetro (Falcón) previamente cubiertas con poli-L-lisina (Sigma). El medio de cultivo consiste en DMEM (medio elemental modificado por Dulbecco, GIBCO) adicionado con antibióticos y antimicóticos (100U7mL, Sigma) y 10% de suero bovino fetal (Sigma). Los cultivos se mantuvieron a 37°C dentro de una incubadora con ambiente húmedo de CO₂ (Co2 Incubator TC 2323) y 5% de CO₂ por 10 días en total. Diariamente se vigiló la viabilidad celular mediante microscopio invertido (Carl Zeiss Axiostarplus 3781 y cámara Canon Pc 1089), así como el volumen del medio de cultivo en cada pozo. Se cambió el medio de cultivo cada tercer día.

Al finalizar los días en cultivo se retiró el medio de cultivo. Las células que permanecieron adheridas (células mesenquimales) se lavaron con 500 mL de PBS sin calcio ni magnesio y fueron retiradas con mucho cuidado por raspado utilizando una cucharilla (Scroper cell. Costar-310). Se centrifugaron

durante 5 min a 400 x g y el botón celular se resuspendió en 200 mL de PBS completo. Antes del trasplante se realizó un conteo de viabilidad celular por medio del método de exclusión por azul de tripano (Sigma). A 40 mL de azul de tripano al 4% se añadieron 10 mL de la suspensión de células mesenquimales. Esta mezcla se pasó a la cámara de Neubauer (American Optical Company) para conteo de células viables. A la mitad de la suspensión celular se le realizó una citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales anti – humanos CD-34, CD-13 y CD-117.

7.7.8. Producción de la sordera

Los tres grupos fueron sometidos a la aplicación intraperitoneal (i. p) de una dosis de sulfato de amikacina 125 mg/kg más furosemida 150 mg/kg Naito y col.⁽²⁹⁾ para producir sordera sensorineural profunda, Si una dosis no fue suficiente para producir la sordera, se aplicó una segunda dosis. Se consideraron sordos aquellos animales que presentaron umbrales sensoriales superiores a 110 dB nHL. Ala 1° y 2° semana posterior a la aplicación del aminoglucósido y el diurético se realizó (PPAEE) y (PPATC) para corroborar la sordera.

7.7.9. Trasplante de células madre mesenquimales de médula ósea

Quince días después de colocado el aminoglucósido, la furosemida y concluido el tiempo de los cultivos de células mesenquimales, a seis ratas con sordera inducida se aplicó el trasplante de células de la médula ósea (1×10^5 células / 20 mLde PBS) en el oído derecho. Previa preparación del área y colocación de campos estériles y corroborada la anestesia, se colocó xilocaína al 2% con epinefrina en la región retro auricular. Inmediatamente después se realizó asepsia y antisepsia de la región con gasa impregnada con isodine espuma y posteriormente con benzal. Así se realizó la tricotomía retro auricular bilateral incluyendo la región inter-auricular. Este procedimiento consistió en hacer una incisión retro auricular de 1cm de longitud e interauricular comunicando ambos pabellones auriculares con hoja de bisturí # 14, con tijeras de iris y disector de hueso se amplió la incisión en la parte posterior

de ambas orejas. Una vez cerca del conducto auditivo externo, se realizó la disección hasta encontrar el nervio facial el cual se introduce en la bulla timpánica. Localizada esta área se realizó un pequeño orificio en el canal semicircular lateral y en el canal semicircular posterior con un taladro marca Dremell Multipro 395 estéril y micro - broca de 0.5 mm de diámetro también estéril con ayuda de microscopio quirúrgico para microcirugía de oído marca Carl Zeiss Opmi 99 y fuente de luz Eco-light-20 fiber optic Nova Instruments. El canal semicircular lateral se localiza en el ángulo posterior de la bulla (hueso temporal), y el canal semicircular posterior se localiza dorsal al foramen estilo mastoideo. A través del orificio del canal semicircular lateral se introdujo un catéter de polipropileno de diámetro 30 G previamente embebido en heparina, hasta llegar cerca de la ampulla. A través del tubo se perfundió la suspensión celular durante 10 minutos a una tasa de perfusión de 2 mL/ minuto usando una bomba de inyección. Se utilizó un drenaje a través del orificio realizado en el canal semicircular posterior, se removió el tubo y los orificios se sellaron con músculo autólogo. El lado contra lateral se destruyó con la broca, se aspiró el contenido perilinfa y endolinfa del oído interno y en su lugar se colocó 0.5mL de amikacina y se sella con músculo. Finalmente en ambos lados se realizó hemostasia, se corroboró ausencia de sangrado y se suturó, la capa muscular y aponeurosis se suturó con vicril 3 -0 y la piel con nailon o seda 3-0, se colocó isodine y benzal sobre la herida y se llevó al animal a su jaula donde se vigiló hasta que se recuperó de la anestesia.

El grupo simulado o sham (falso trasplante) fue sometido al mismo procedimiento, con aplicación de medio; pero sin células madre mesenquimales de médula ósea.

Ambos grupos de estudio recibieron posterior al trasplante y durante las siguientes 24 horas, difenidol I.M (intramuscular) a 0.5mg/kg de peso cada 12 horas, así como antibiótico de amplio espectro y paracetamol gotas 30mg/kg/dosis cada 8 hrs. V.0 (vía oral).

7.7.10. Potenciales provocados trasientes del tallo encefálico (PPATC) y de estado estable (PPAEE) posterior al trasplante.

En los tres grupos se realizaron dos mediciones una vez llevado a cabo el procedimiento quirúrgico, a los 15 y 30 días después del trasplante de acuerdo a Kamiya y col. ⁽⁵⁰⁾ Bajo sedación y los electrodos colocados a través de agujas ventrolateral al oído, se aplicó un estímulo máximo de 110 dB con intervalos de 5dB para (PPAEE) en 1000, 2000, 4000, 8000 Hz, además de PPATC a través de la onda de I, III y V con equipo Audix Neuronic.

7.7.11. Inyección de BrdU (Bromodeoxyurydina)

Con el fin de detectar la proliferación celular en las ratas transplantadas, se inyectó BrdU 30 mg/kg, i.p. después del trasplante y se repitió el procedimiento cada 12 horas durante tres días previos a finalizar el experimento, según el método de Kamiya y col. ⁽⁵⁰⁾

7.7.12. Preparación del tejido para inmunohistoquímica he inmunofluorescencia.

Después de realizar las pruebas auditivas, los grupos fueron sacrificados a los 32 días después del trasplante. Se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital a 0.8 mL aplicada como dosis única. Las ratas se perfundieron transcárdialmente con 0.01 mol/L de amortiguador de fosfatos pH 7.4 (PBS), adicionado con 8.6% de sacarosa (100mL) y después con un fijador que consiste de una solución de 4% de paraformaldehído en 0.1 mol/L de PBS (100mL), se utilizó una bomba de perfusión Masterflex L/S de velocidad variable modelo 7553-70/71. Posteriormente se decapitó a los animales y los lóbulos temporales se removieron e inmediatamente fueron colocados en el mismo fijador. Se disecaron los huesos temporales y con disección fina bajo microscopio Carl – Zeiss Opmi 99 Ok=198, Ft= 160 se obtuvo la cóclea. Bajo microscopio se abrió la ventana redonda y se fijó su interior con paraformaldehído a una concentración de 0.1 mol/L de PBS. En seguida las cócleas fueron descalcificadas por inmersiones en 5% de sacarosa, 5% de ácido etilendiametetracético pH 7.4 (EDTA, Sigma) durante 14 días a 4°C. El medio de descalcificación se cambió diariamente. A los 14 días se

corroboró la descalcificación y se rehidrataron los tejidos con concentraciones crecientes de alcohol y se montaron en parafina, para su posterior corte y estudio inmunohistoquímico (BrdU).

7.7.13. Técnica para inmunohistoquímica.

Una vez las cócleas descalcificadas se incluyeron en parafina y cortaron a 10 micras. Se desparafinaron e hidrataron en series de alcohol absoluto y alcohol xilol 1:1 y luego se lavaron en agua desionizada. Se utilizó el sistema de detección 4plus Universal immunoperoxidase de Biocare Medical, el cual consiste en los siguientes pasos: agregar peroxidasa de hidrógeno (bloquea la peroxidasa endógena) y se deja durante 5 minutos y lavar con agua desionizada. Posteriormente agregar ácido clorhídrico (HCL2 molar) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente agregar carezyme II durante 5 minutos, lavar en agua y otro lavado con PBS. Se continúa con la solución de bloqueo eraser T durante 5 minutos, posteriormente se agrega el anticuerpo monoclonal antibromouxiuridina (Murino monoclonal IU-4 Mouse igG1 Caltag laboratorios) diluido 1:100 en PBS durante una hora. Se realizan dos lavados con PBS durante dos minutos cada uno y luego se agrega el segundo anticuerpo (universal Link) durante 10 minutos, nuevamente se hacen dos lavados con PBS. Se amplifica la reacción con la mezcla de streptavidina-HRP durante 10 minutos, se lava dos veces con PBS y agrega DAB (diaminobenadina con agua oxigenada como cromógeno), finalmente se hace un lavado con agua desionizada y se agrega la hematoxilina, durante 30-60 segundos, se lava con PBS y se montan los portaobjetos.

7.7.14. Técnica de inmuno para fluorescencia

Se fijaron por inmersión las cócleas en paraformaldehído al 4% por 72 horas, luego se Crioprotegieron los tejidos en sacarosa al 30% por 24 horas a 4 °C, inmediatamente después se sumergieron en metil – butano para congelarlos en hielo seco, luego se montaron en la platina con Tissue –Teck OCT dentro del criostato y realizamos cortes coronales de la cóclea de 6 micras, posteriormente se montaron en serie en laminillas con adhesivo Poli-l-lisina y se almacenaron a 4°C hasta su proceso, luego los

sumergimos en amortiguador de fosfatos 0.12 M – tritón 0.1% por 5 minutos y bloqueamos con suero normal de caballo por media hora a T.A. dilución 1:200 y escurrimos el exceso. Posteriormente colocamos los anticuerpos primarios de la siguiente forma por 24 hrs. CD34 con IFTC y CD117 anti Mouse, o CD13 con ficoeritrina, lavamos con PBS (amortiguador de fosfatos) y colocamos el anticuerpo secundario anti-mouse Alexa 568 por 2 horas y lavamos con PBS para luego hacer una segunda incubación con Nestina (Chemicon) dilución 1:500 y/o Neurofilamento (Dako) por 24 hrs. Posteriormente lavamos con PBS para incubar con anti.mouse con Alexa 468 1:200 por 2 hrs. Lavamos con PBS (amortiguador de fosfatos) y montamos con vectashield, y sellamos con barniz para observar en microscopio de epifluorescencia con analizador de imágenes (Image Pro-plus).

7.8. **Análisis estadístico.** ^(40 - 47)

Se obtuvo media y desviación estándar, cuantificamos las frecuencias absolutas y relativas, así como, razones y proporciones.

Utilizamos Prueba exacta de Fisher para el análisis de variables nominales, además utilizamos Anova para variables cuantitativas.

8. FACTIBILIDAD

El presente trabajo pudo realizarse ya que se contó con la disponibilidad por parte de los investigadores, los recursos materiales y físicos necesarios por parte de la Facultad de medicina UNAM a través del Departamento de Fisiología específicamente del laboratorio de Bioelectromagnetismo, así mismo la Unidad de investigación en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

9. RESULTADOS

Se estudiaron dieciocho ratas adultas (machos) de la cepa Wistar, con peso de 180 – 210g provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a todas se les realizó exploración física y otológica, lo anterior nos permitió corroborar la integridad del oído y de la membrana timpánica.

Se formaron tres grupos de animales con sordera inducida: seis para el grupo experimental (con trasplante celular), seis para el grupo simulado (con falso trasplante) y seis para el grupo control (sin trasplante).

Durante el transcurso del trabajo perdimos por muerte a tres animales, todos pertenecían al grupo simulado, el primero se perdió durante la determinación del umbral auditivo basal y secundario a la anestesia, este animal fue repuesto de inmediato, la segunda pérdida se presentó durante el procedimiento quirúrgico para colocar el medio con PBS a través del canal semicircular, su muerte también se debió a la anestesia, en ambos se presentó paro respiratorio que no logramos superar, este animal no pudo ser repuesto, y la tercera pérdida se presentó 6 semanas después de realizado el procedimiento de colocación de PBS sin células madre en el conducto semicircular, en éste animal a las cuatro semanas se presentó absceso de cuello el cual se extrajo de forma exitosa a través de lavado quirúrgico, sin embargo dos semanas después lo perdimos y al realizar autopsia encontramos absceso de cuello y mediastino, debido al avance de la investigación al momento de su muerte, este animal no fue considerado pérdida, pues ya contábamos con la respuesta post – trasplante y las cócleas fueron procesadas.

Así el grupo experimental y control terminaron con seis animales, mientras que el grupo simulado terminó con cinco animales

Determinación del umbral auditivo basal.

A todos los animales de los tres grupos se les realizaron potenciales auditivos de estado estable (PPAEE) en las frecuencias de 1000, 2000, 4000, 8000 Hz, así como potenciales provocados auditivos trasientes de tallo encefálico (PPATC) a través de la onda de I, III y V. Las 18 ratas mostraron audición presente y normal en ambos estudios, con una media auditiva de 10.41 dB a 10.83 dB y una desviación estándar de ± 1.29 a ± 2.04 , así mismo mostraron una audición mínima de 8.75 dB y una audición máxima de 13.75 dB, el análisis de la respuesta basal del órgano de Corti entre los tres grupos de estudio nos corroboró que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de estudio ($p < 0.902$) anova (figura I, tabla II).

Producción de la sordera secundaria.

A los dieciocho animales se les aplicó una dosis de Sulfato de amikacina 125 mg/kg más furosemida 150 mg/kg ambos intraperitoneal (i. p) de acuerdo a Naito y col, ⁽²⁹⁾ para producir sordera sensorineural profunda, cinco animales requirieron una segunda dosis de aminoglucósidos más diurético para provocar la sordera, diez días después de aplicado el aminoglucósido y el diurético, se realizaron PPAEE y PPATC. Se pudo corroborar la producción de sordera sensorial profunda en los 18 animales, ya que no se encontró respuesta del órgano de Corti a un estímulo máximo de 110 dB (figura II y IV, tabla II).

Obtención de médula ósea / sangre de tibia de las ratas y preparación de las células madre adultas mesenquimales.

Seis (grupo experimental) animales fueron sometidos a extracción de médula ósea / sangre de tibia de las ratas.

La extracción se realizó de forma satisfactoria, se obtuvieron los 500 μ L de médula ósea/sangre, ninguna complicación se presentó durante el procedimiento, las heridas alcanzaron la cicatrización completa y la marcha de los animales no se vio afectada (figura V).

Realizamos la separación celular y la obtención de mononucleares e iniciamos su cultivo, una vez terminados los cultivos y obtenidas las células mesenquimales, realizamos antes del trasplante un conteo de viabilidad celular por medio del método de exclusión por azul de tripano (Sigma), encontrando en promedio 74.1% de células cultivadas viables (figura VI, tabla I).

De igual forma antes del trasplante y como un segundo control, realizamos un conteo de células mesenquimales a través de citometría de flujo, utilizamos anticuerpos monoclonales anti – humanos CD-34, CD-13 y CD-117, logrando obtener el 34 % de CD34, 61% de CD13 y 5.25% de CD117 de una población de 1, 000,000 de células (figura VII-IX, tabla I).

Trasplante celular.

Ninguna complicación se presentó durante el procedimiento en éste grupo de estudio.

El grupo simulado, fue sometido al mismo procedimiento quirúrgico, con la aplicación del mismo volumen de medio pero sin células madre mesenquimales adultas de médula ósea. En este grupo, un animal murió al término del procedimiento por paro respiratorio secundario a la anestesia, este caso fue considerado para fines del análisis como un fracaso (figura X).

Obtención de la respuesta del órgano de Corti, posterior al trasplante autólogo de células madre mesenquimales adultas de médula ósea.

Diez y siete animales fueron revisados. Para valorar ésta respuesta, realizamos potenciales provocados trasientes del tallo encefálico (PPATC- en onda I, III, V) y de estado estable (PPAEE- en 1000, 2000, 4000 y 8000 Hz), a los 15 y 30 días post- trasplante en los tres grupos de estudio.

Grupo trasplantado

En éste grupo, 5 animales (83.3%) mostraron respuesta del órgano de Corti. El análisis entregrupos de la respuesta del órgano de Corti como presente o ausente, nos corroboró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.015$, IC. = 0.015 – 0.018) (Fisher) a favor del grupo que recibió el

trasplante de células madre adultas de médula ósea, así mismo la respuesta del órgano de Corti posterior al trasplante mostro una media en decibeles de 82.29 ± 14.08 , con un valor mínimo de 71 y un máximo de 110 dB, lo anterior nos corroboró una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.001$, I.C = (-39.90) – (-15.51) (anova) a favor del grupo trasplantado ya que el grupo simulado o sham y el grupo control no mostraron ninguna respuesta al estímulo máximo de 110 dB (figuras XIX-XXIII, tabla III y IV).

Obtención y procesamiento de Cócleas.

Una vez obtenida la respuesta del órgano de Corti y colocada i.p (intraperitoneal) la BrdU (Bromodeoxyurydina), las cócleas fueron extraídas del hueso temporal y procesadas para su revisión y análisis histológico e Inmunohistoquímico.

La revisión y análisis histológico e inmunohistoquímico, nos permitió corroborar la destrucción completa del órgano de Corti en el grupo simulado (figura XI y XII), de igual forma pudimos observar que el órgano de Corti del grupo experimental, mostró presencia de células madre mesenquimales, con migración de éstas hacia el túnel de Corti, membrana basal y estría vascular, lo anterior a través de células BrdU+ (figura XIV-XV), y la presencia de células CD13+ y CD117 que identifican linaje mesenquimal (azul) que colocalizan con el marcaje para células de origen neuronal nestina+ (verde) (figura XVI, XVII), así como células de origen hematopoyético sin diferenciar a mesenquimal CD34+ y algunas nerviosas inmaduras nestina+ (rojas) (figura XVIII) utilizando la inmunofluorescencia.

10. DISCUSIÓN

La necesidad de encontrar la manera de revertir la sordera, nos ha llevado a utilizar células madre mesenquimales de médula ósea como una herramienta más, que en la literatura médica ha demostrado ser capaz de coadyuvar en la regeneración de prácticamente todos los tipos celulares.⁽⁹⁻¹³⁾

Para provocar la sordera, utilizamos amikacina 125 mg/kg más furosemida 150 mg/kg (Naito y col.)⁽²⁹⁾, ambos intraperitoneal (i. p), como sabemos, los aminoglucósidos (amikacina) y los diuréticos (furosemida) son dos de los medicamentos más ototóxicos que existen, ambos se combinan a receptores de membrana de las células ciliadas cocleares. Estos receptores compuestos de polifosfoinosítídeos intervienen en los mecanismos bioeléctricos de la permeabilidad celular al interactuar con iones calcio, de esta manera bloquean los canales de calcio, en consecuencia los canales de potasio con pérdida de magnesio en las mitocondrias y la depleción del glutatión coclear que al agotarse, inicia el daño causado por los radicales libres con destrucción y muerte celular. Se ha visto que existe cierto grado de susceptibilidad de cada sujeto a la ototoxicidad de estos medicamentos, ya que mientras algunos responden con grandes lesiones a la aplicación de una dosis terapéutica, otros requieren grandes dosis y tiempo prolongado de administración (Gardner y col.)⁽⁵³⁾. En este estudio a las dos semanas de aplicado la amikacina y el furosemida, las ratas mostraron falta de respuesta del órgano de Corti a través de los potenciales provocados auditivos de estado estable y de tallo cerebral, sin embargo casi 13% de los animales, requirieron dos dosis de amikacina mas furosemida para alcanzar la sordera sensorineural profunda. Aunque éste dato no esta reportado, es perfectamente explicado por el grado de susceptibilidad que cada sujeto presenta (Gardner y col.)⁽⁵³⁾.

La revisión histológica de las cócleas disecadas un mes después de la aplicación de estos medicamentos, muestra que la falta de respuesta del órgano de Corti, se debe a la destrucción completa

de éste y no solo al bloqueo o falta de respuesta eléctrica, pues no se evidencia presencia de alguno de los tipos celulares que lo conforman, corroborando que estos medicamentos provocan muerte celular y destrucción de las mismas, es decir barren por completo con el órgano de Corti (Rodríguez y col.)⁽⁵⁴⁾

La obtención de la línea celular, es sin duda el primer paso como lo muestra la literatura, la utilización de ratas de la cepa Wistar como donantes y receptores de células madre en el estudio de la sordera, facilita el proceso, por ser éstos de fácil manejo cuando se cuenta con la experiencia necesaria. Nuestros resultados concuerdan con los de Guerrero y colaboradores⁽⁵²⁾, la cepa Wistar permite la obtención y aplicación de las células como autotrasplante, con lo cual evitamos cualquier rechazo inmunológico.⁽⁵²⁾

El método para el cultivo de células progenitoras de la médula ósea, nos permitió la obtención de la cantidad adecuada para el trasplante. Aunque la mayoría de los estudios no menciona el porcentaje de células cultivadas viables, nosotros utilizando el método de Kamiya y cols.⁽⁵⁰⁾ logramos obtener en promedio casi 80% de viabilidad celular, lo anterior es resultado del uso de cajas de cultivo hechas de poliestireno que permite a las células mesenquimatosas una mejor adhesión al plástico (Steele y col)⁽⁵⁵⁾, facilitando su proliferación y diferenciación en comparación con células precursoras obtenidas de cordón umbilical, que como sabemos, tienen además menor supervivencia (Mareschi y col).⁽⁵⁶⁾

El cultivo a diez días muestra dos poblaciones celulares de acuerdo a su forma (Figura VI), unas tipo fibroblasto bipolares con prolongaciones en ambas direcciones del cuerpo celular que se observan en menor cantidad y unas segundas células con fenotipo inmaduro, de menor tamaño y sin prolongaciones, las cuales se observaron en mayor cantidad.

Si bien la citometría mostró una buena población de células CD13, también mostró una alta concentración de células CD34, esto puede explicar la baja concentración de CD117, aunque al ser este un marcador mucho mas específico para células mesenquimales, esto puede explicar su baja concentración, aunque por otro lado es probable que más días de cultivo mejoraran la diferenciación celular (Figura VII, VIII y IX).

La pérdida de los sujetos durante la anestesia es algo común, si bien las pérdidas se deben a la tolerancia de cada sujeto a la anestesia, es probable que el abordaje del oído influya en el porcentaje de mortalidad. El abordaje retroauricular del oído es el más utilizado, porque permite la exposición rápida de la bulla timpánica a través de la localización del nervio facial (Richard y col).⁽⁵⁷⁾ En este estudio solo perdimos dos animales y de estos logramos reponer uno, esta mortalidad tan baja probablemente se deba a que realizamos una incisión transversa que une el pabellón derecho con el pabellón izquierdo, lo anterior nos permitió abordar ambos oídos en un solo acto, acortando el tiempo del procedimiento y evitando mayor traumatismo y estrés quirúrgico, así se favoreció la recuperación y supervivencia de los animales, pero sobre todo, logramos realizar el trasplante y la destrucción quirúrgica a través de una sola incisión (Figura X).

A diferencia de lo reportado en la literatura; el propósito de este estudio fue encontrar la respuesta clínica, es decir, si existe respuesta del órgano de Corti, posterior al trasplante de células madre mesenquimales autólogas de médula ósea a través de los potenciales clínicos, en el rango de frecuencias útiles para el ser humano (1000 a 8000 Khz), y trabajando con equipo clínico. Llama la atención que cinco de los seis animales trasplantados mostraron en diverso grado respuesta auditiva en éstas frecuencias, y que todos los animales aceptaron el trasplante sin mostrar efectos colaterales importantes tales como: rechazo o nistagmos acompañados de vómito o pérdida de la postura, creemos que el abordaje quirúrgico y la aplicación del trasplante a través del canal semicircular lateral al tiempo que abrimos el canal semicircular posterior como drenaje, favoreció los buenos resultados obtenidos, ya que el espacio peri linfático favorece la llegada del trasplante a la cóclea, al tiempo que se regula la presión en éste espacio evitando la lesión del órgano de Corti por compresión y distensión de las estructuras, así la conformación del oído medio y la cóclea permanece intacto, esto contribuye a minimizar la pérdida de la función del órgano de Corti, al evitar el daño del microambiente por el traumatismo quirúrgico. A diferencia de esta vía de aplicación, el trasplante a través de la pared lateral de la cóclea implica la destrucción de la pared aumentando el traumatismo quirúrgico, la destrucción

del microambiente y la considerable pérdida de la función coclear, además que en la práctica clínica es mucho más difícil realizarlo (Iguchi F y col) ⁽³³⁾ .

El estudio histológico de la cócleas corroboró la destrucción del órgano de Corti, sin embargo podemos apreciar que aun existen las estructuras que corresponden a los procesos periféricos (ganglio espiral) que inervan este órgano, así como membrana basal, lo anterior puede explicar la respuesta obtenida a través de los potenciales auditivos ya que tanto las fibras nerviosas (ganglio espiral) como las células de soporte de la membrana basal son esenciales para la integración de las células trasplantadas, pues constituyen el microambiente básico (Kiyohiro F y col).⁽⁵⁸⁾ La presencia de ganglio espiral y membrana basal se explica porque el efecto del aminoglucósido potenciado con furosemida solo se aplicó durante dos semanas, está demostrado que para la destrucción del ganglio espiral y la membrana basal con las células de soporte, se requiere cuando menos de cuatro semanas de aplicación de ototóxicos (Rodríguez S y col). ⁽⁵²⁾

La presencia de células BrdU + en la cóclea del grupo trasplantado, indica que existe mitosis celular y por lo tanto regeneración celular. Si bien encontramos células CD34+ las cuales corresponden a células hematopoyéticas que no alcanzaron la diferenciación a células mesenquimales, la mayor proporción de células que encontramos fueron CD13+ y CD117+ (figura XV-XVIII) las cuales corresponden a marcadores específicos para el tipo mesenquimal y que previo al trasplante habían sido identificadas por citometría de flujo (figura VII- IX).

En este estudio utilizamos nestina como marcador de células neuronales en proliferación, como sabemos, la nestina fue descrita originalmente como un marcador de células madre en cerebro, específicamente en la cara ventricular en cerebros de mamíferos. Es una proteína de filamento intermedio clase cuatro que se encuentra intracelular, se le ha relacionado con la regulación de células diferenciadas en los tejidos, donde se encuentra jugando un papel importante en la proliferación y migración de las células progenitoras. Las células nestina positiva se caracterizan por tener una

plasticidad elevada, en *vitro* bajo la influencia de factores genéticos y/o epigenéticos, pueden ser diferenciadas a neuronas. ^(60-63, 74- 77)

Los resultados obtenidos muestran células de origen neuronal nestina+ en la cóclea de las ratas trasplantadas, específicamente a nivel de rampa media y rampa vestibular, estas células colocalizan con el marcaje de las células CD13+ y CD117 que identifica linaje mesenquimal, no así con las células CD34+ que identifica linaje hematopoyético sin diferenciar a células mesenquimales.

Estos hallazgos, corroboran que las células madre mesenquimales autólogas de médula ósea aplicadas por el canal semicircular lateral, logran sobrevivir en la cóclea de las ratas durante al menos cuatro semanas, además diferenciarse en células de origen neuronal. ^(64,65-79)

No está claro como llegan las células trasplantadas a la cóclea, se sabe que las células aplicadas por perfusión perilinfática por el canal semicircular lateral, pueden viajar hasta la perilinfa coclear, como: migrando a la escala vestibular, de ahí, hasta la porción apical de la cóclea y entonces pasar a través del helicotrema a la escala timpánica, y de ahí a la porción basal y la perilinfa coclear.⁽²⁹⁾ Lo anterior puede darse por el movimiento fisiológico del líquido en el oído interno, el cual fluye dentro de la cóclea a una tasa de 1.6nL/minuto en dirección apical ⁽⁵⁹⁾, además, varios estudios han demostrado la capacidad de migración de las células madre con ayuda de factores tróficos y quimokinas^(66, 76) como la citoquina A2 la cual ha sido reportado induce la migración de células madre.

El mecanismo preciso por el cual se produce la respuesta en los potenciales provocados auditivos, no está claro. Hay varias posibilidades que ayudan a explicar esta respuesta. Es probable que las células trasplantadas induzcan una respuesta coclear endógena con la regeneración del órgano de Corti, aunque en nuestro estudio no logramos apreciar la regeneración de células ciliadas, si apreciamos la existencia de membrana basal, terminaciones nerviosas neuronales del ganglio espiral y la presencia de células trasplantadas en estas zonas con marcadores de BrdU+, CD13+, CD117+ así como Nestina+. Varios estudios demuestran la habilidad de las células madre de diferenciarse y transdiferenciarse *en vivo* y *en vitro* en diferentes tipos de células del oído interno ^(67,10), así como en una variedad de linajes en

múltiples órganos. Otra explicación sería que las células madre trasplantadas promueven la reparación de las células y tejidos dañados secretando factores tróficos, esta reportado que la producción de éstos factores por parte de las células madre, puede conferir resistencia a la enfermedad o promover la supervivencia, resistencia, migración y diferenciación de precursores endógenos, además el trasplante de células madre puede ser ligado a la sobre regulación de factores tróficos, de hecho se conoce que al igual que las células madre neurales secretan interleucinas y factores neurotróficos (NGF, BDNF y GDNF), así mismo se ha reportado su capacidad para secretar factor de crecimiento con propiedades neurotróficas, tales como Ang1, es bien conocida la capacidad de los factores tróficos incluyendo GDNF en la supervivencia de las células ciliadas y neuronas auditivas⁽⁶⁸⁻⁷³⁾.

Creemos probable que se hayan desarrollado o regenerado conexiones nerviosas a nivel de membrana basal y en la región del ganglio espiral, la presencia de nestina+ en esta área así lo señala, aunque sabemos que cualquiera de estos mecanismos o incluso todos juntos, pueden estar actuando para producir la respuesta en los potenciales provocados.

Este es el primer estudio que busca la respuesta del órgano de Corti en las frecuencias clínicamente útiles para el ser humano usando equipo clínico. La respuesta en las frecuencias de 1000 a 8000 Hz, son muy importantes ya que corresponden a las frecuencias auditivas útiles para el paciente, y por lo tanto para aquellos que han perdido la posibilidad de volver a escuchar. Sin embargo, es necesario aumentar el número de animales estudiados y en una etapa posterior probar esta estrategia en especies superiores del tipo de primates.

Aun quedan muchas preguntas y trabajos por realizar para responder esas respuestas.

11. CONCLUSIÓN

Los presentes resultados demuestran que se pueden obtener células madre mesenquimales de médula ósea para autotrasplante, evitando así la respuesta de rechazo inmunológico. Éstas se pueden colocar en el oído interno utilizando microcirugía, y realizar potenciales auditivos clínicos en las frecuencias de 1000 a 8000 Hz y corroborar la respuesta del órgano de Corti en animales previamente sordos.

El presente estudio demuestra que las células madre de médula ósea trasplantadas sobreviven un mes después del trasplante, además son capaces de migrar y diferenciarse de acuerdo al microambiente donde son requeridas.

Los Resultados obtenidos aumentan las posibilidades de usar la terapia celular, como parte del tratamiento de las enfermedades degenerativas del oído interno.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Huawei L, Roblin G, Liu H, Heller S. Generation of Hair Cell By Stepwise Differentiation of Embryonic Stem Cell. *Medical Sciences* 2003; 100: 13495 – 13500
2. Huawei L, Eduardo C, Albert E, Stefan H. Stem Cell as therapy for hearing loss. *Trends in Molecular Medicine* 2004; 10: 309 – 15
3. Pellicer M, Giraldez F, Pumarola J, Barquinero J. Celulas Progenitoras en el tratamiento de la sordera. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2005; 56: 227 - 232
4. Fraser G. Profound Childhood deafness. *J Med Genet* 1964; 38: 118 – 151
5. Thiringer K, Kankkunen A, Lidén G, Niklasson A et al. Perinatal Risk factors in the aetiology of hearing loss in preschool children. *Dev Med Child Neurol* 1984; 26: 799 – 807
6. Chapekar MS. Tissue engineering: Challenges and opportunities. *J Biomed Mater res* 2000; 53: 617-20
7. Spector M. Biomaterial failure. *Orthop Clin North Am* 1992; 23: 211-17
8. Anderson JM. Inflammation and the foreign body response. *Prob Gen Surg* 1994; 11: 101-07
9. Hernández p, Dorticos E, Medicina regenerativa, Célula madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana de Hematología* 2004; 20: 84 – 91
10. Li H, Liu H, Heller S et al. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Neuroreport Nat Med* 2003; 9: 1293 - 1299
11. Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F et al. Fate of neural ítem cells grafted into injured inner ear of mice. *Neuroreport* 2003; 14: 1677 – 1681
12. Kadereit S. Cancer Stem Cells or Stem Cell cancer ?. *International Society for Stem Cell Research* 2004; 1-3
13. Lopez N. La Racionalidad Terapéutica en la Medicina Regenerativa con Células Troncales Embrionarias o de Adulto. *Conferencia en la Real Academia de Farmacia* 2003; 1 – 16

14. Vats A, Bielby R, Tolley N, Nerem R, Polak M. Stem Cells. *Lancet* 2005; 366: 592 – 602
15. Mato M. Enfoque actual. Célula madre : Un nuevo concepto de medicina regenerativa. *Revista Cubana de Endocrinología* 2001; 1 – 10
16. Petersen BE. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cell. *Science* 1999; 284: 1168 -70
17. Alison MR. Hepatocyte from non – hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257 – 60
18. Ferrari G. Muscle regeneration by bone marrow – derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528 – 30
19. Bartsch T, Falke T, Brehm M, Zeus T, Kogler G, Wernet P, Strauer BE et al. Transplantation of autologous adult bone marrow stem cells in patients with severe peripheral arterial occlusion disease. *Med klin* 2006; 101: 195 -7
20. Su L, Xu J, Ji BX et al. Autologous peripheral blood stem cells transplantation for severe multiple sclerosis. *Inter J Hematol* 2006; 84: 276 – 81
21. Van L, Tyndall A. Adult stem cells in the treatment of autoimmune diseases. *Rheumatology* 2006; 45: 1187 - 93
22. Prosper F, Verfaillie C. Célula madre Adultas. *An Sist Sanit Navar* 2003; 26: 345 – 356
23. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swergiel JJ, Marshall VS, Jone JM. Embryonic Stem Cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145 – 1147
24. Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY et al. Realistic prospects for ítem cell therapeutics. *Hematology* 2003; 398 – 418
25. Randazzo J, Warchol M. Injection of Adult Mouse, Mesenchymal Stem Cells Into The Developing Chick Inner Ear. *Progam In Audiology and Communication. Sciences* 2006; 1 – 21
26. Matsui J, Ryals B. Hair Cell Regeneration. *Journal of rehabilitation Research and Development* 2005; 42: 187 – 198
27. Nakagawa T, Ito J. Application of cell therapy to inner ear diseases. *Acta Otolaryngol Suppl* 2004; 551: 6 – 9

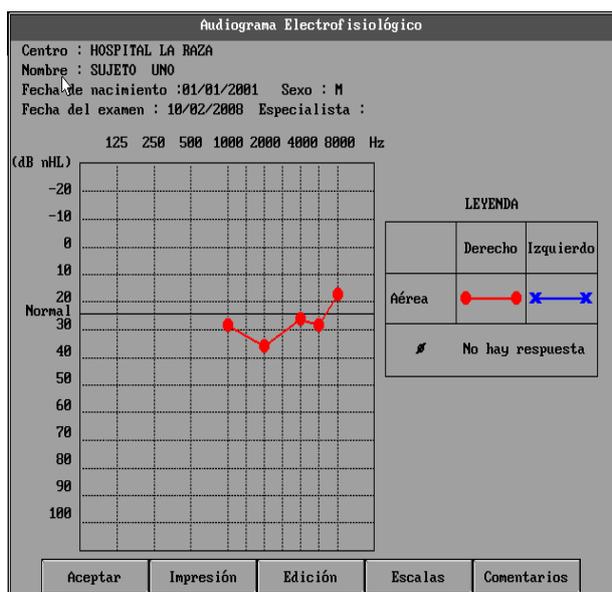
28. Nakagawa T, Ito J. Cell therapy for inner ear diseases. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 1203 – 7
29. Naito Y, Nakamura T, Nakayama T et al. Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport* 2004; 15: 1 – 4
30. Lang H, Ebihara Y, Schmiedt RA. Contribution of bone marrow hematopoietic stem cells to adult mouse inner ear: Mesenchymal cells and fibrocytes. *The journal of comparative Neurology* 2006; 496: 187 – 201
31. Jeon SJ, Oshima K, Heller S, Edge A. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells are progenitors in vitro for inner ear hair cells. *Moll. Cell. Neuroscience* 2007; 34: 59 – 68
32. Iwai H, Lee S, Inaba M, Baba S, Yamashita T, Ikehara S. Bone marrow transplantation as a strategy for the treatment of autoimmune hearing loss in MLR/MP-1pr/1pr Mice. *Journal of Neuroimmunology* 2005; 168: 76 - 82
33. Iguchi F, Nakayama T, Tateya I et al. Surgical techniques for cell transplantation into the mouse cochlea. *Acta Otolaryngol suppl* 2004; 551: 43 – 7
34. Yoshida T, Hakuba N, Morizane I, Fujita K et al. Hematopoietic stem cells prevent hair cell death after transient cochlear ischemia through paracrine effects. *Neuroscience* 2007; 145: 923 - 30
35. White P, Doetzlhofer I. Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans – differentiate into hair cell. *Nature* 2006; 441: 984 – 987
36. Sackett DL, Haynes BR, Guyatt HG, Tugwell P. Decidir la mejor terapéutica. *Epidemiología Clínica: Ciencia básica para la medicina clínica*. Argentina: Editorial Medica Panamericana. 1994: 191-249.
37. Pagani FD, Dersimonian H, Zawadzka A, Wetzel K. Autologous skeletal myoblasts trasplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. *Histological analysis of cell survival and differentiation*. *J Am Cell Cardiol* 2003; 41:879-888.
38. Lee KJ. *Audiología. Lo esencial en Otorrinolaringología*. Colombia: Editorial Prentice Hall Hispanoamericana. 1996:25-68.

39. Braier L. Diccionario Enciclopédico de Ciencias Médicas. Argentina: Editorial Panamericana. 1968: 400.
40. Mervyn S. Variables de distorsión. Conceptos y estrategias en Epidemiología, el pensamiento causal en las Ciencias de la salud. México: Fondo de Cultura Económica (ed). 1991: 104.
41. Last JM. A Dictionary of Epidemiology. 6 edición, New York: Oxford University Press. 1998: 120.
42. Armitage P, Berry G. Comparación de varios grupos. Arcourt Brace, editores Estadística para la Investigación. España: Arcourt Brace. 1997: 195-224.
43. Moreno AL, Cano VF, García RH. Selección del Análisis Estadístico. MacGraw-Hill editores. Epidemiología Clínica. México: Interamericana. 1994: 237-246
44. Hulley SP, Cummings RS. Estimación del tamaño de muestra y de la potencia. Williams Wilkins editores. Diseño de la investigación clínica. España: 1993: 153-167.
45. Ignacio MR. Lineamientos para su elaboración y análisis. El protocolo de Investigación. Ed.Trillas. 2da.Edición,77-78, México 1990
46. Armitage P, Berry G. Inferencia estadística. Arcourt Brace editores. Estadística para la Investigación Biomédica. España: Publicaciones Arcourt Brace. 1997: 125-133.
47. MacMahon B, Pugh FT. Características de las personas. Epidemiología copilco editores. Principios y Métodos de Epidemiología. México. La Prensa Médica Mexicana. S.A. 1988: 97-103.
48. Paparella M, Shumrick DA. Otosclerosis. Otorrinolaringología. Argentina: Editorial Médica Panamericana. 1982: 1597-1637.
49. [http://www. Bioeticaweb.com/Bioética en la red/](http://www.Bioeticaweb.com/Bioética en la red/) Célula madre de tejidos adultos, Diez razones para su utilización. Dr. Justo aznar, Jefe del departamento de biopatología clínica, hospital universitario la Fe valencia.

50. Kamiya K, Fujinami Y, Hoya N, Okamoto Y, Kouike H, Komatsuzaki R, Kusano R, Nakagawa S, Satoh H, Fujii M, Matsunaga T. Mesenchymal stem cell transplantation accelerates hearing recovery through the repair of injured cochlear fibrocytes. *Am J Pathol* 2007; 171: 214-26.
51. Ley General de Salud; Reglamento en Materia de Investigación para la Salud, artículo 17 (Febrero 1983).
52. Guerrero M, Franco R, Guizar G, Cervantes G. Estandarización de la técnica para la obtención de células mesenquimales de médula ósea de rata para su aplicación en el manejo de lesiones medulares. *Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación* 2005; 17: 84-90.
53. Gardner JC, Goliath R, Viljoen D, Sellars S. Familial streptomycin ototoxicity in a South African Family: a mitochondrial disorder. *J Met Genet* 1997; 34: 904-6.
54. Rodríguez S, Coro RM, Ancheta O, Valdes T, Harvey Y. Preparación histológica de cócleas de ratas y su aplicación a estudios de sordera. *Revista CENIC ciencias biológicas* 2006; 37: 385-88.
55. Steele JG, McFarland C, Dalton BA, Jhonson G, Evans MD, Howlett CR, Underwood PA. Attachment of human bone cells to tissue cultura polystyrene and to unimodified polyistyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment. *J Biomater Sci Polym Ed* 1993; 5: 245-57.
56. Mareschi K, Brasin E, Piacibello W, Anglietta M, Madon E, Fagidi F. Isolation of human mesenchymal stem cells: Bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 2001; 86: 1099-100.
57. Richard A, Maxwell A, Ward B. Surgical anatomy of the guinea pig ear. *Ann Otol* 1975; 84: 250-255.
58. Kiyohiro F, Tae – Soo K, Akiko T, Nishida T, Takayuki N, Koichi O, Yasushi N, Juichi I. Trasplantation of neural stem cells into explants of rat inner ear. *Acta Otolaryngol* 2004; 551: 31-3.
59. Ohyama K, Salt AN, Thalman R. Volumen flow rate of perilymph in the ginea – pig cochlea. *Hear Res* 1988; 35: 119-29.

60. Lendhal G, Zimmerman L, McKay R. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990; 60: 585-95.
61. Wang X, Xu J, Zhao D et al. Nestin^{neg} CD 34^{low} population from fetal nestin-EGFP transgenic mice enriches the pancreatic endocrine progenitor cells. *Pancreas* 2005; 31: 385-91.
62. Mokry J, Nemecek S. Immunohistochemical detection of intermediate filament nestin. *Acta med* 1998; 41: 73-80.
63. Chou Y, Khuon S, Herrman H, Goldam R. Nestin promote the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filament during mitosis. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 1468-78.
64. Habener J, Stoffers D. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 12-21.
65. Schawardz R, Reyes M, Koodie L et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-302.
66. Widera D et al. MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *Eur J Cell Biol* 2004; 83: 381-87.
67. Wang X, Willenbring H, Akkan Y, Torimaru Y et al. Cell fusion is the principal source of bone marrow derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901.
68. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 2002; 1: 92 – 100.
69. Mahmood A, Lu D, Choop M. Intravenous administration of marrow stromal cells increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2004; 21: 33-39.
70. Takakura N, Watanabe T, Suenabu S, Yamada Y et al. A role of hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 2000; 102: 199- 209.
71. Gillespie LN, Shepherd RK. Clinical application of neurotrophic factors: the potential for primary auditory neuron protection. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 2123-2133.

72. Roehm PC, Hansen MR. Strategies to preserve or regenerate spiral ganglion neurons. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 13: 294-300.
73. Matinez MR, Oshima K, Heller S, Edge AS et al. The potential role of endogenous stem cells in regeneration of the inner ear. *Hear Res* 2007; 227: 48-52.
74. Beisel K, Hansel L, Soukup G, Fritsch B. Regenerating cochlear hair cells: quo vadis stem cell. *Cell Tissue Res* 2008; 333: 373-9.
75. Backhouse S, Coleman B, Shepherd R. Surgical access to the mammalian cochlea for cell-based therapies. *Exp Neurol* 2008; 214: 193-200.
76. Hu Z, Ulfendahl M, Prieskorn DM, Oliver P et al. Functional evaluation of a cell replacement therapy in the inner ear. *Otol Neurotol* 2009; 30: 551-8.
77. Kesser BW, Lalwani AK. Gene therapy and stem cell transplantation: strategies for hearing restoration. *Adv Otorhinolaryngol* 2009; 66: 64-86.
78. Xue T, Qiao L, Quiu JH, Lu LJ, Zha DJ, Chen FQ. Improve clinical outcomes for cochlear implant recipients by mimicing the viable cochlear environment to induce neural stem cells to differentiate into auditory neurons. *Otol Neurotol* 2010; 31: 178-9.
79. Bogaerts S, Clements JD, Sullivan JM, Oleskevich S. Automated threshold detection for auditory brainstem responses: comparison with visual stimulation in a stem cell transplantation study. *BMC Neurosci* 2009; 10: 114.

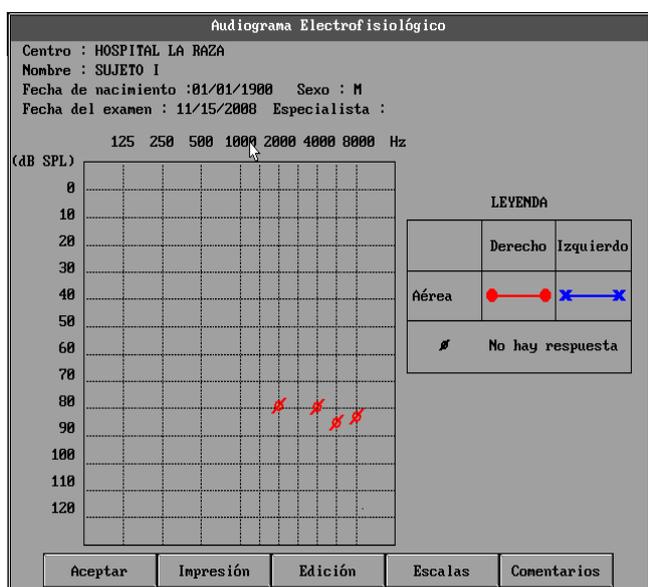


A. PPAEE

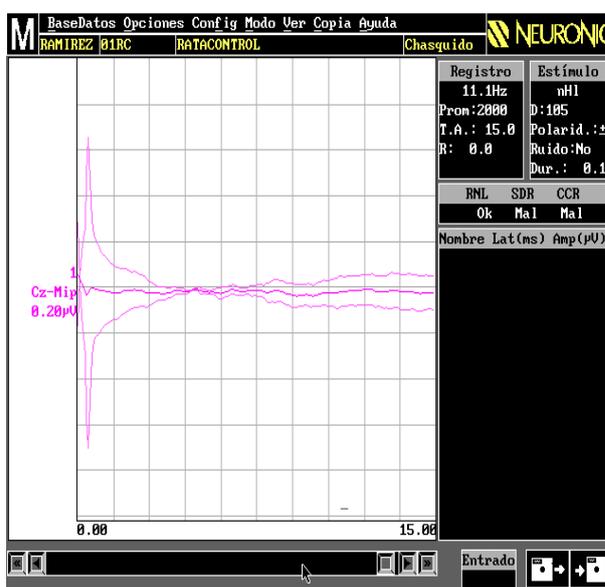


B. PPATC

Figura I. Grupo Control. . Gráficas que muestran el estudio basal que corrobora la audición normal a través de potenciales provocados auditivos de estado estable (A), y (B) potenciales provocados auditivos trasientes de tallo cerebral.

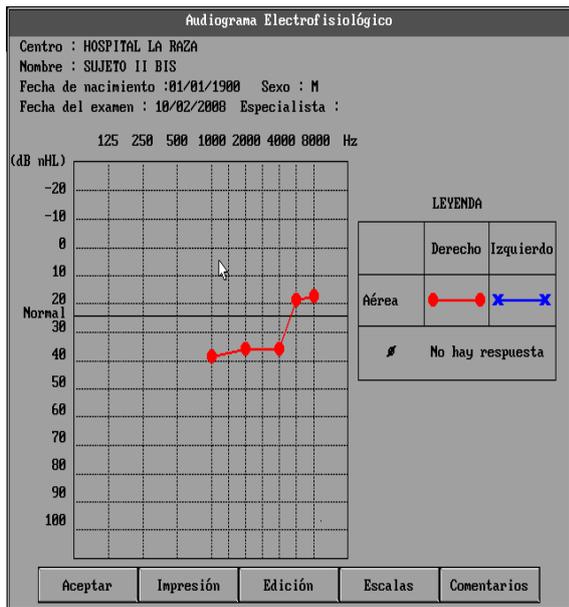


A



B

Figura II. Grupo control. Gráficas que muestran los potenciales provocados auditivos de estado estable en un control (Figura A) y los potenciales provocados auditivos trasientes del tallo cerebral (Figura B), en ambos se corrobora la producción de sordera sensorial profunda, posterior a la aplicación de aminoglucósidos más furosemida.

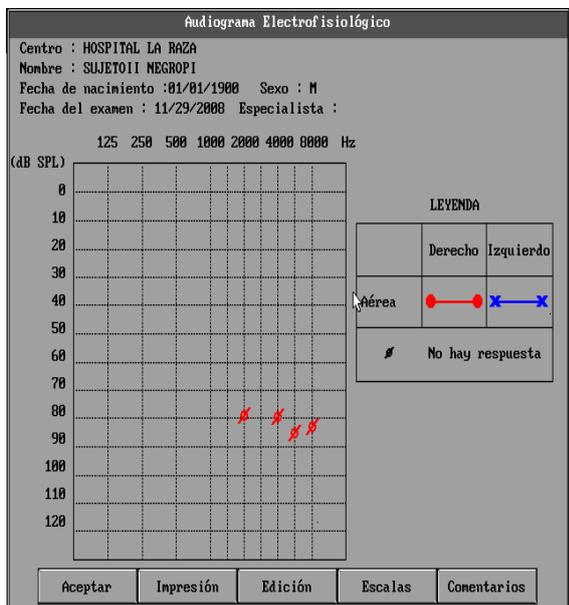


A

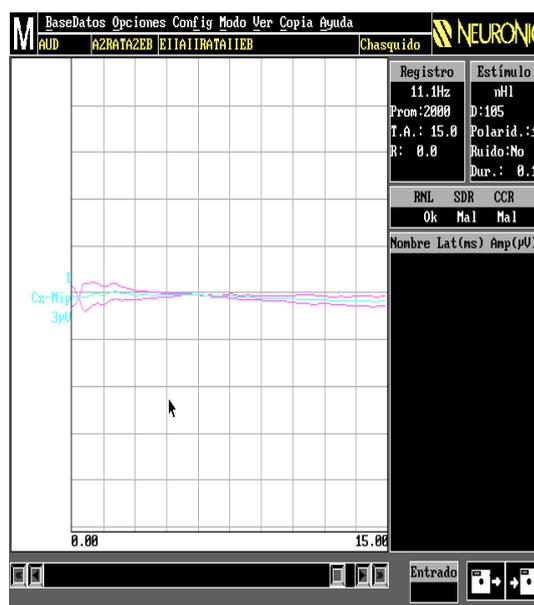


B

Figura III. Gráfica que muestra en el grupo experimental el estudio basal que corrobora la audición normal a través de potenciales provocados auditivos de estado estable (Figura A), y potenciales provocados auditivos trasientes de tallo cerebral (Figura B).



A



B

Figura IV. Gráfica que muestra en el grupo experimental los potenciales provocados auditivos de estado estable (Figura A) y los potenciales provocados auditivos trasientes del tallo cerebral (B), en ambos se corrobora la producción de sordera sensorial profunda, posterior a la aplicación de aminoglucósidos más furosemida. .



Figura V. Obtención de sangre / médula ósea.

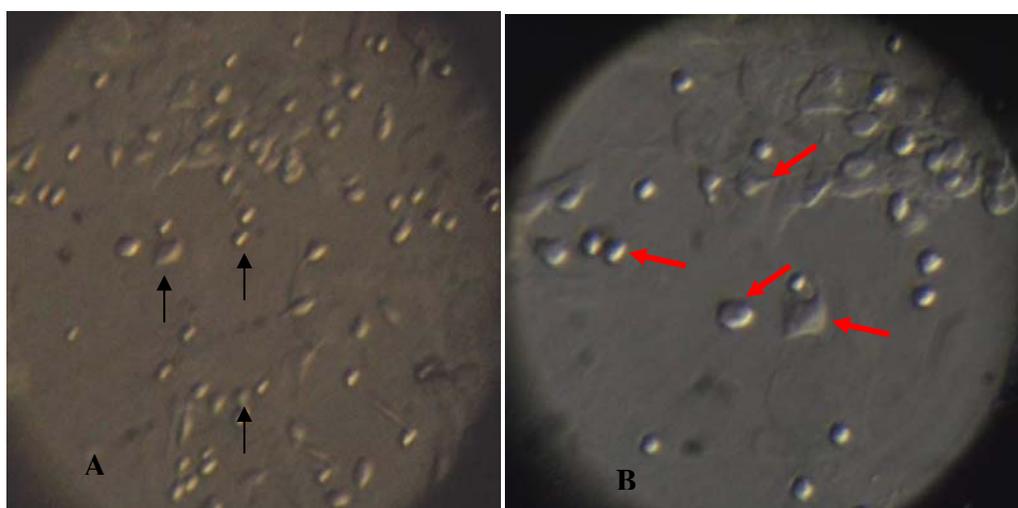


Figura VI. Fotomicrografías que muestra la morfología de las células a los 10 días de cultivo, esta población de células se utilizó para la citometría de flujo y el trasplante. A (10 X) y B (40X) se observan 2 poblaciones celulares (flecha).

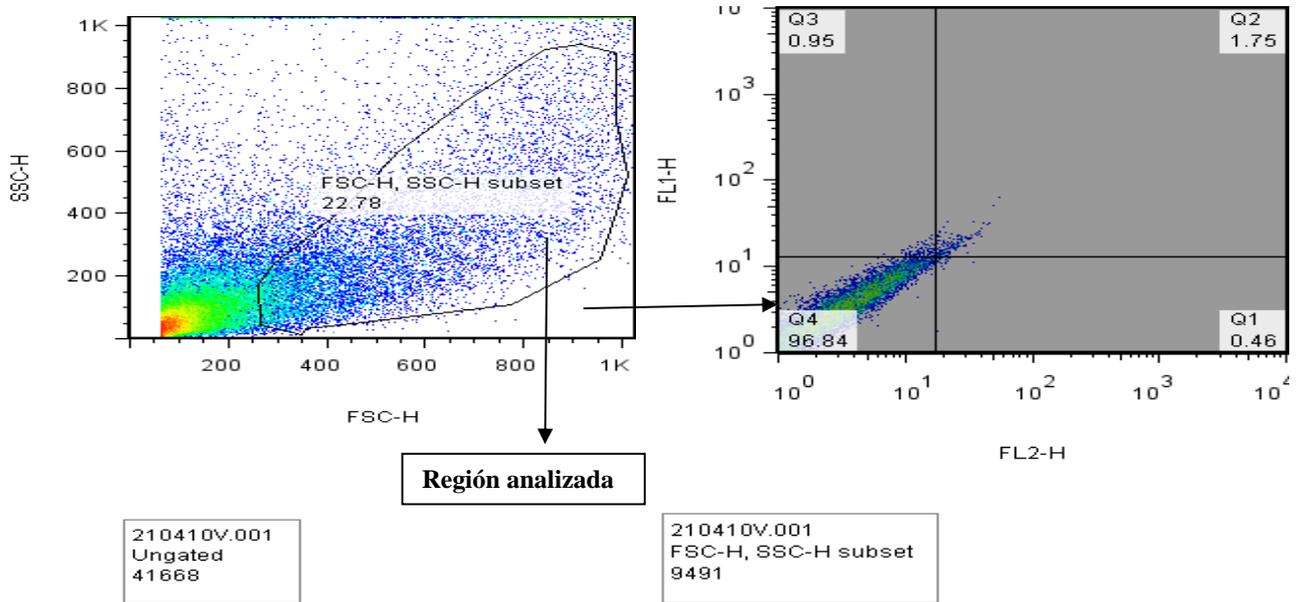


Figura VII. Citometría de flujo para identificar los linajes celulares pre-implante

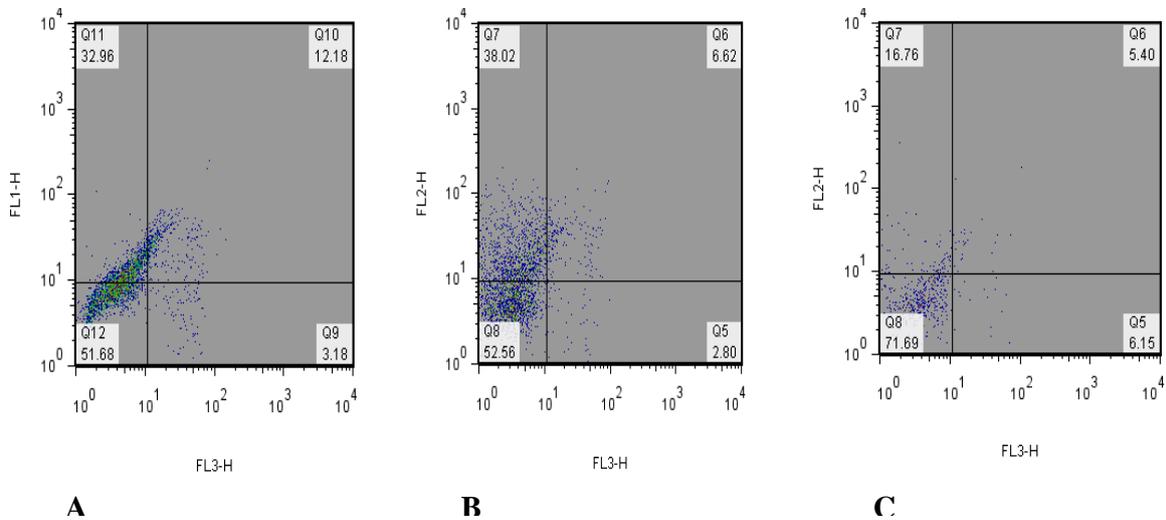


Figura VIII. Citometría de flujo: Se muestra en azul el linaje celular hematopoyético (CD34 +: 32.96%) (FL1)(A), se observa en verde el linaje celular mesenquimal (CD13+: 38.02%) (FL2)(B), se observa en verde el linaje celular mesenquimal (CD117+: 6.15%) (FL3) (C)

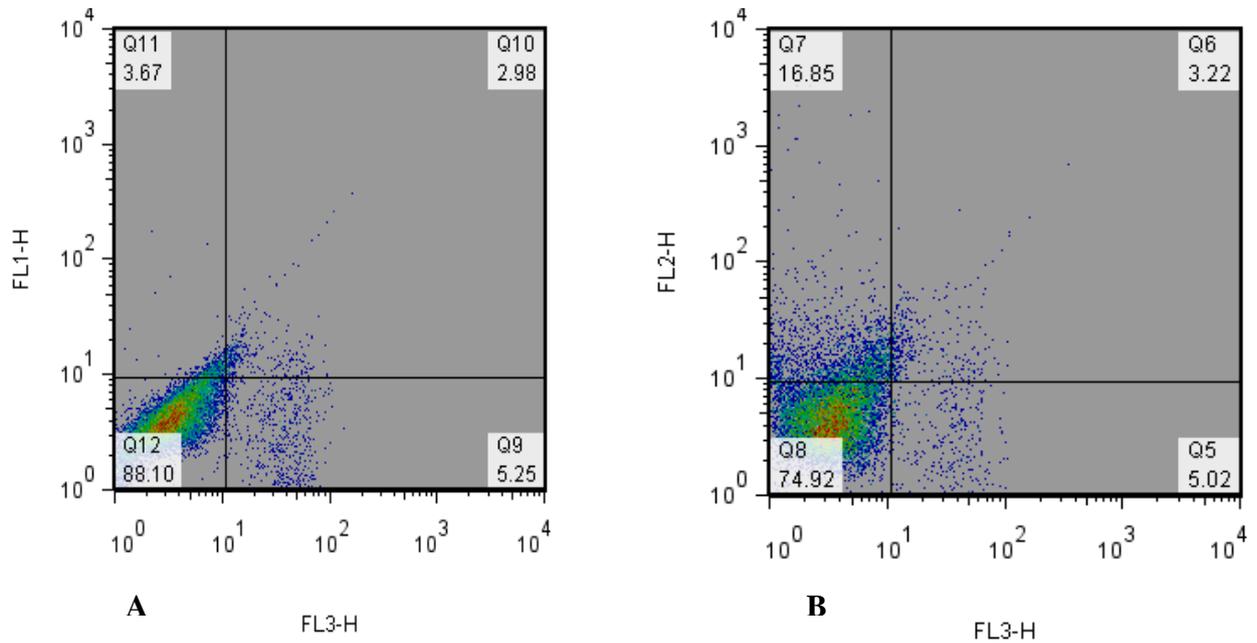


Figura IX. (A). Citometría de flujo. CD 34 fitc (fl1) vs CD117 Alexa 546 (fl3). Doble marcaje CD34 vs CD117: 3.67% células positivas para CD34, 5.25% de células positivas para CD117 y 2.98% de células doble positivas para CD34 y CD117. (B). CD 13pe (fl2) vs cd117 Alexa 546 (fl3). Doble marcaje CD13 vs CD117; se obtuvieron 16.85% de células positivas para CD13, 5.02% células positivas para CD117 y 3.22 % de células doble positivas para CD13 y CD117.

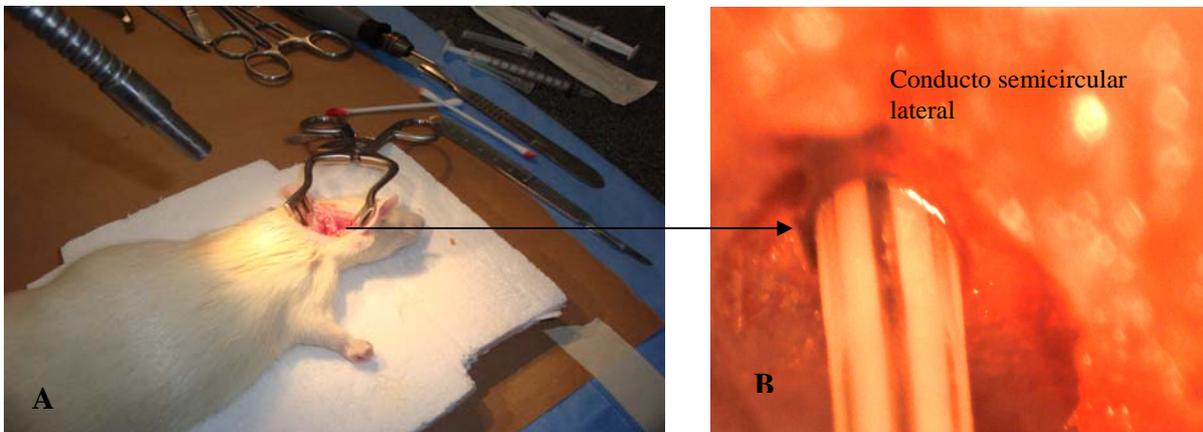


Figura X. Fotografías que muestran la colocación de células madre (mesenquimales) de médula ósea, al oído interno del animal a través del conducto semicircular lateral (B).

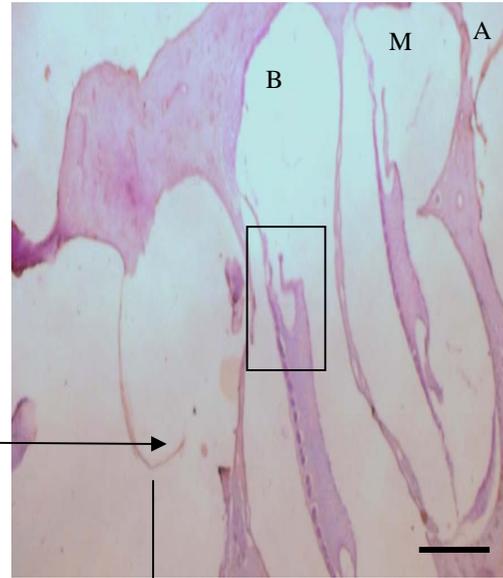
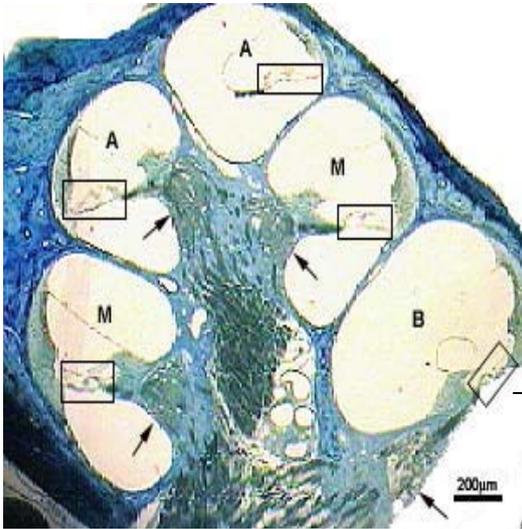


Figura XI.

Figura XI. Corte longitudinal de cóclea donde podemos apreciar la porción apical (A), media (M) y basal (B) de este órgano. El recuadro muestra la rampa media con el órgano de Corti. (Barra de calibración 200 μ m)

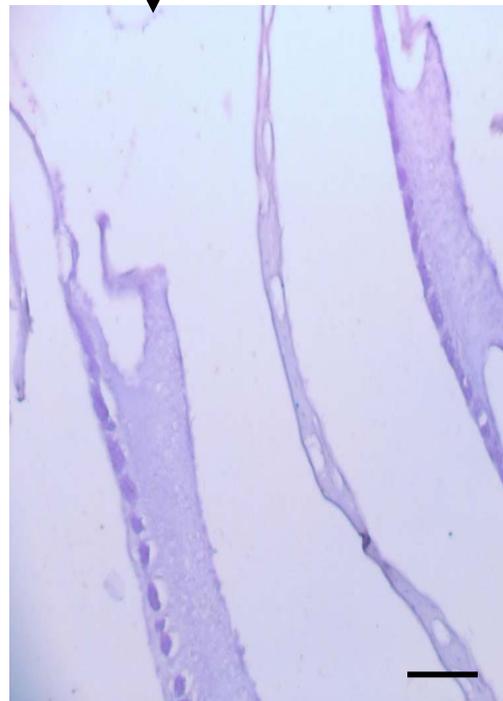


Figura XII. Control. Porción apical, media y basal de cóclea, el recuadro muestra el órgano de Corti bajo tinción con hematoxilina - eosina.(barra de calibración 50 μ m)

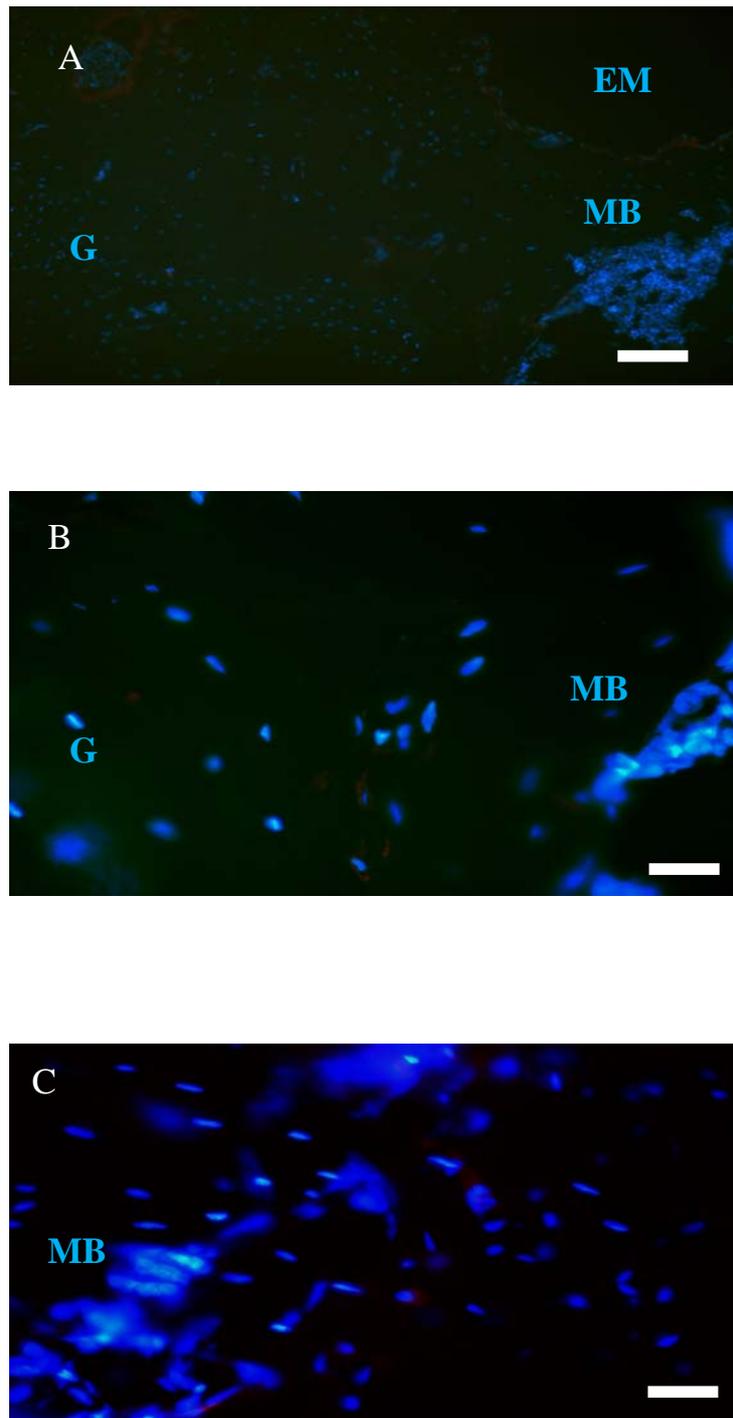


Figura XIII. Fotomicrografías del órgano de Corti correspondiente a animales del grupo control. A) 10x, B) 40x y C) 100X. Se observa la escala media (EM), Membrana Basal (MB) y Ganglio Geniculado (G). Negativo a CD13, CD117 y Nestina (azul Hoescht para tinción nuclear). Barra de calibración en A 100 μm , B 20 μm , 10 μm

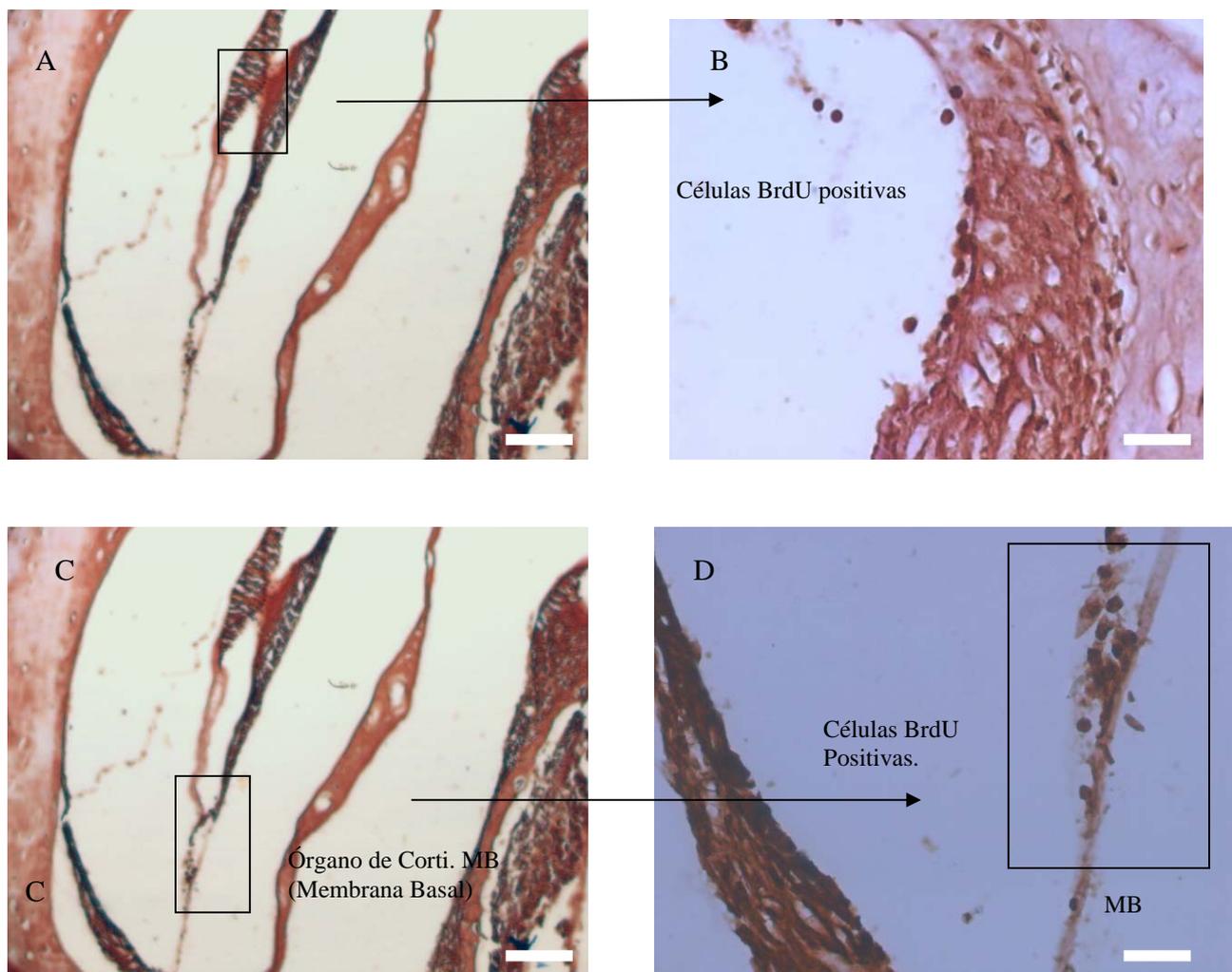


Figura XIV. Fotomicrografías del órgano de Corti correspondiente a animales del grupo experimental. Células mesenquimales trasplantadas BrdU positivas, con fenotipo indiferenciado. C) Membrana basal y D) mayor amplificación de de la membrana basal donde se observan las células implantadas BRdU positivas. Barra de calibración en A y C 100 μ m, B y D10 μ m

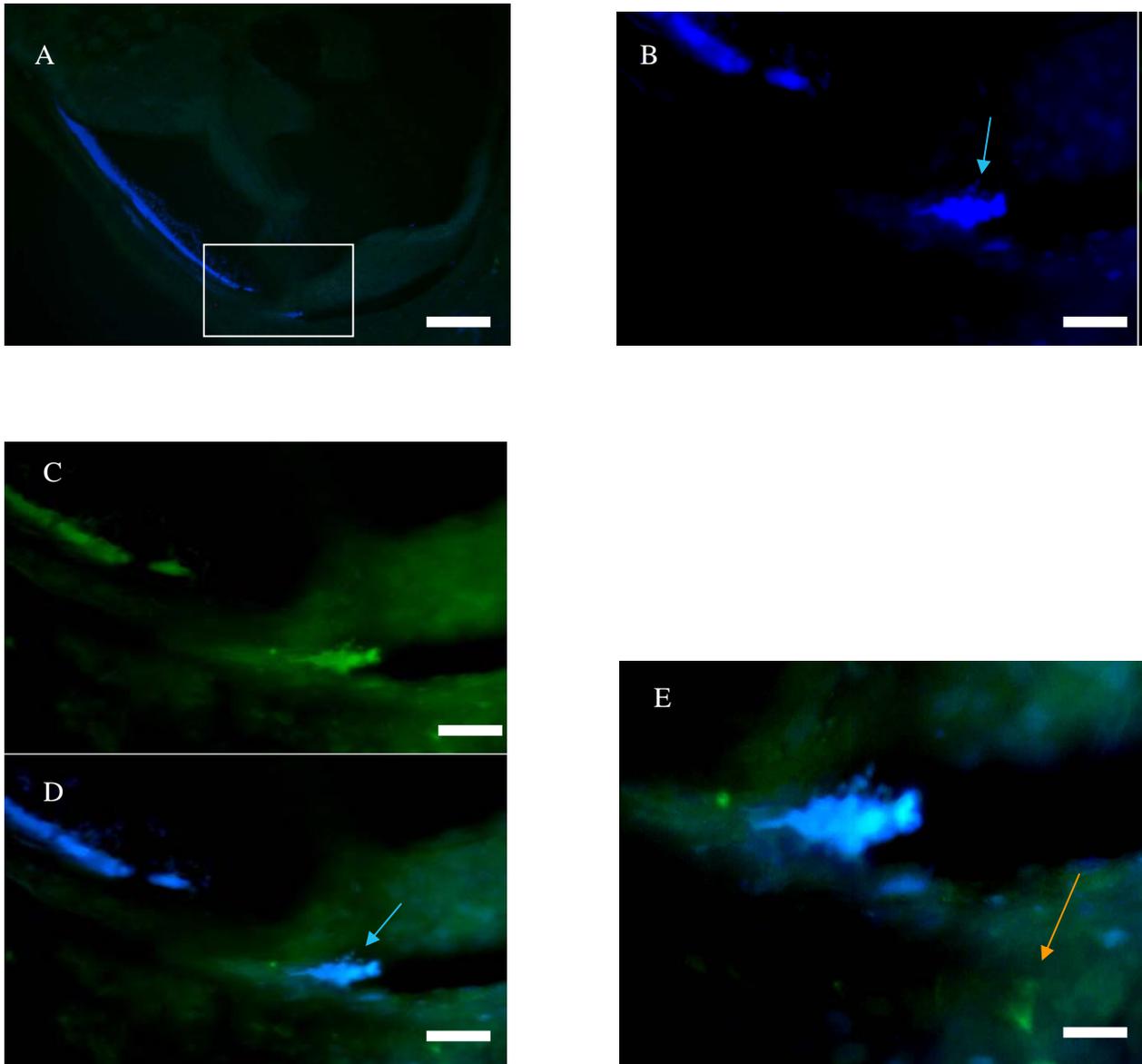


Figura XV. Fotomicrografías del órgano de Corti correspondiente a animales del grupo experimental con células mesenquimales implantadas. A células CD13+ (mesenquimal, azul); colocalizan con el marcaje con nestina que identifica células inmaduras de origen neural (verde) y células nestina. Barra de calibración en A 100 μ m, B, C y D 20 μ m, E 10 μ m

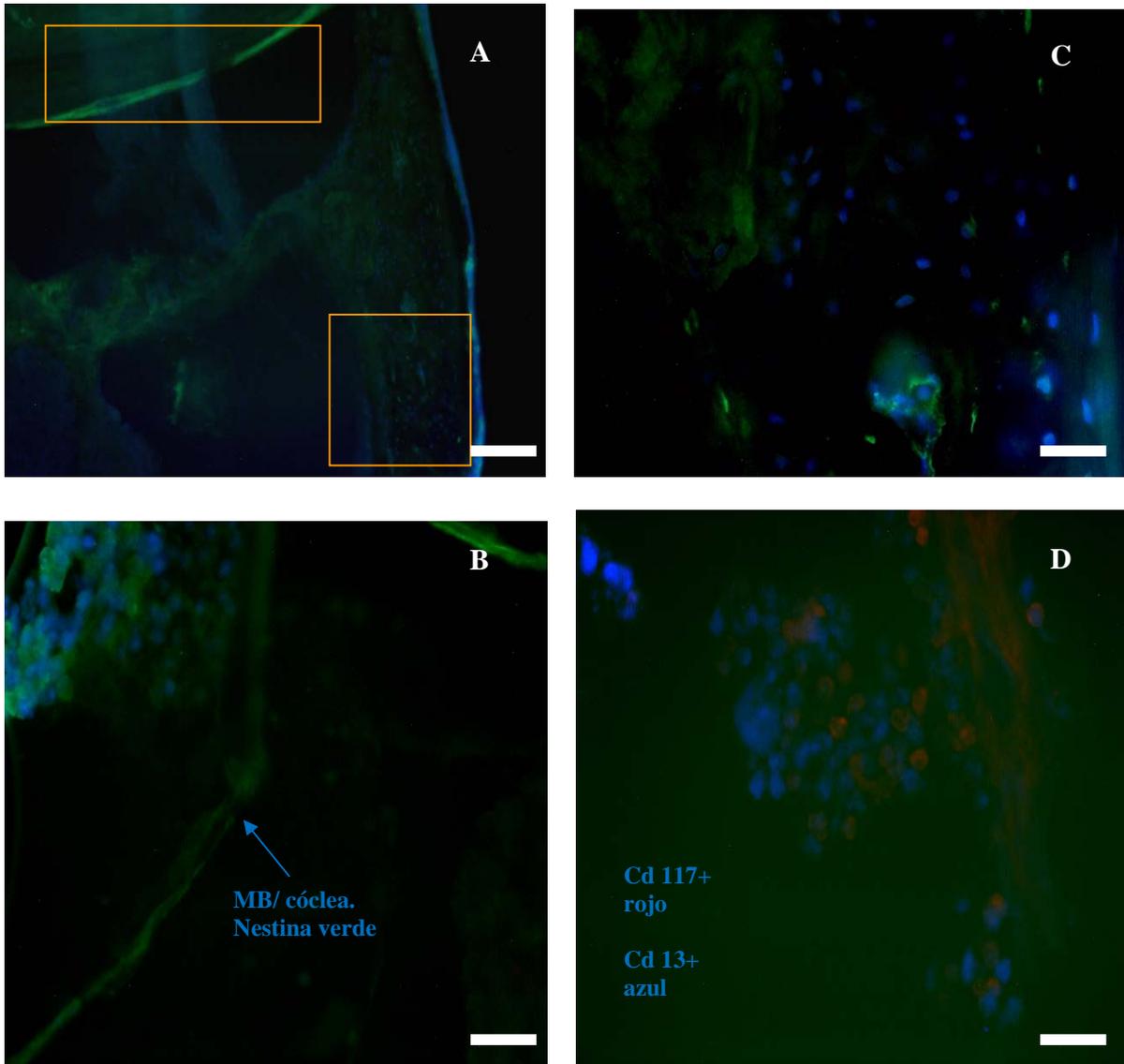


Figura XVI. Fotomicrografías del órgano de Corti correspondiente a animales del grupo experimental con células mesenquimales implantadas. Corte longitudinal a nivel de la porción media de cóclea. Estría vascular (A), membrana basal (B). Las células CD13+ y CD117+ que identifican linaje mesenquimal (azul CD13+ y rojo CD117+) (D) colocalizan con el marcaje para células de origen neuronal nestina+ (verde) (A, B, C). Barra de calibración en A 100 μ m, B 20 μ m, C y D 10 μ m.

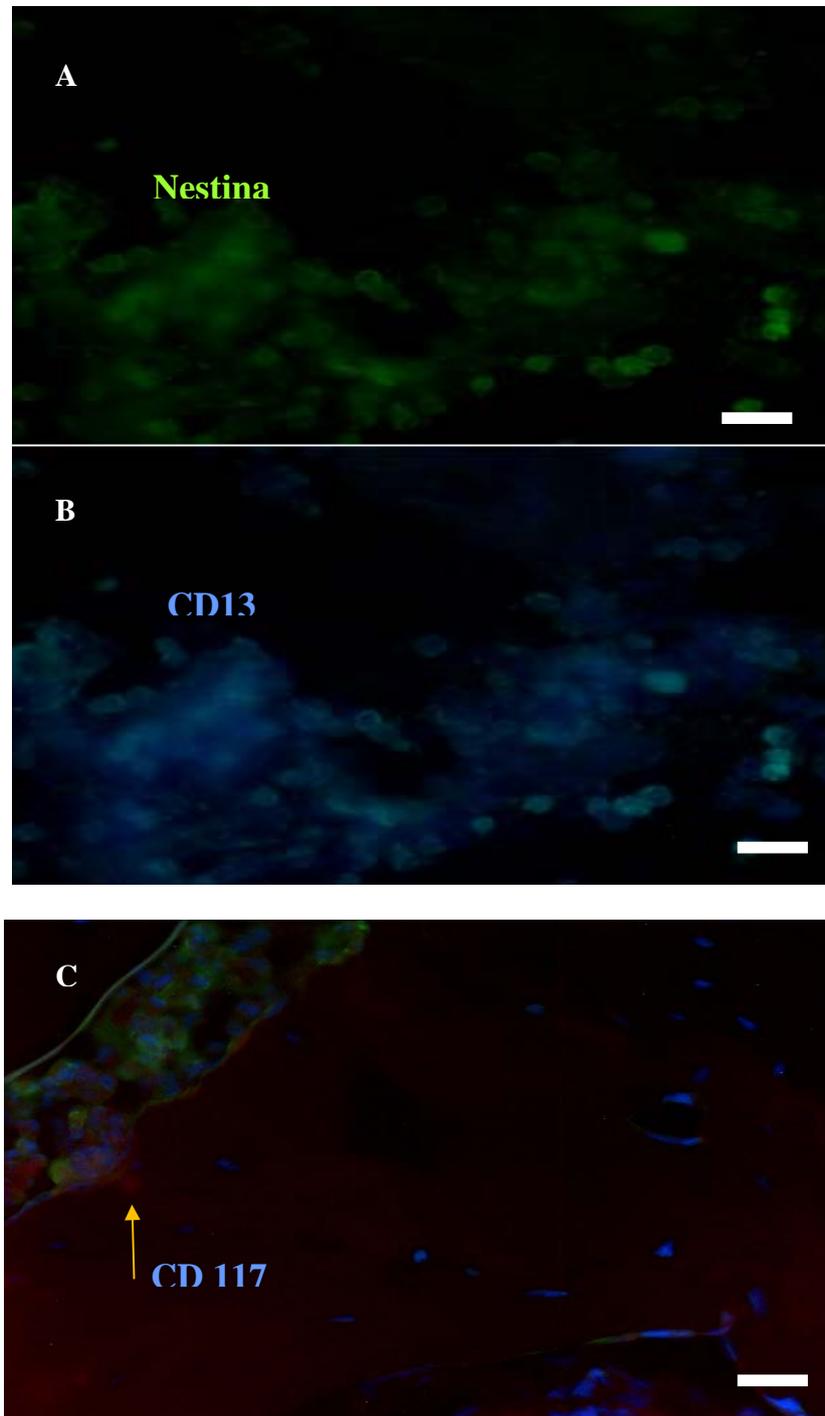


Figura XVII. Fotomicrografías del órgano de Corti correspondiente a animales del grupo experimental con células mesenquimales implantadas. Las células CD13+ que identifica linaje mesenquimal (azul) (figura B), colocalizan con el marcaje para células de origen neuronal nestina+ (verde) (figura A), además se observan otras células CD117+ (mesenquimal+) (figura C) flecha amarilla. Barra de calibración en A y B 20 μ m, C 10 μ m.

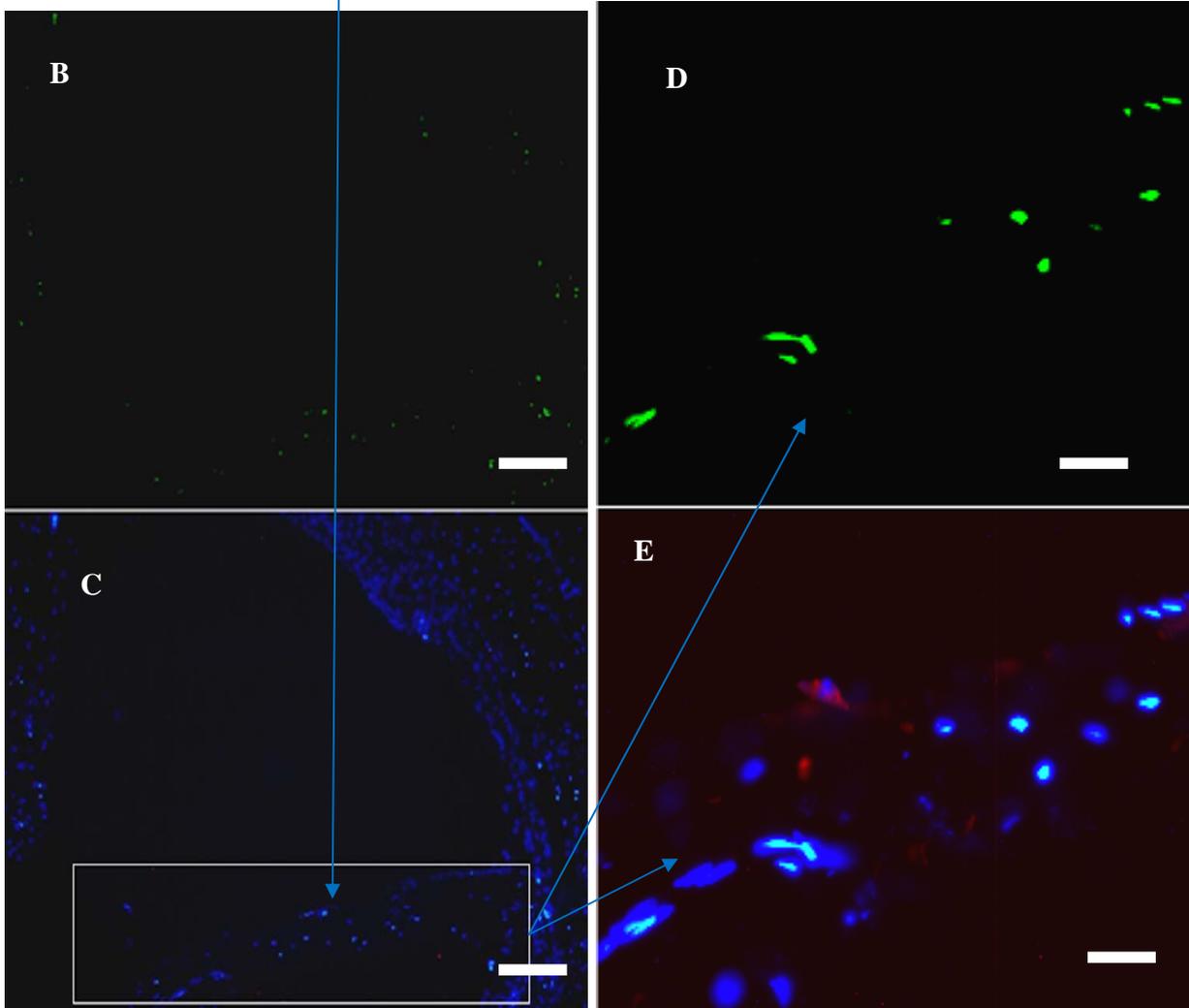
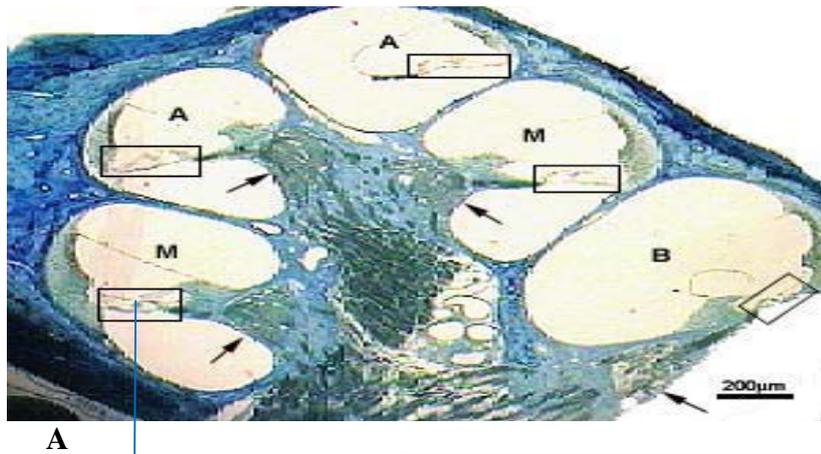
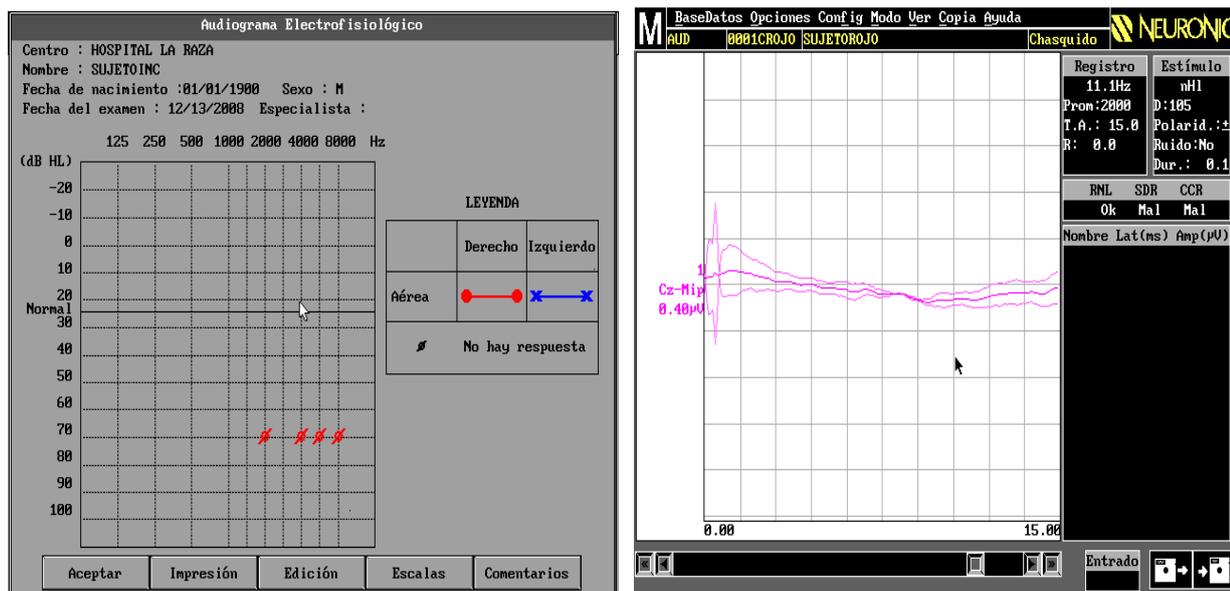


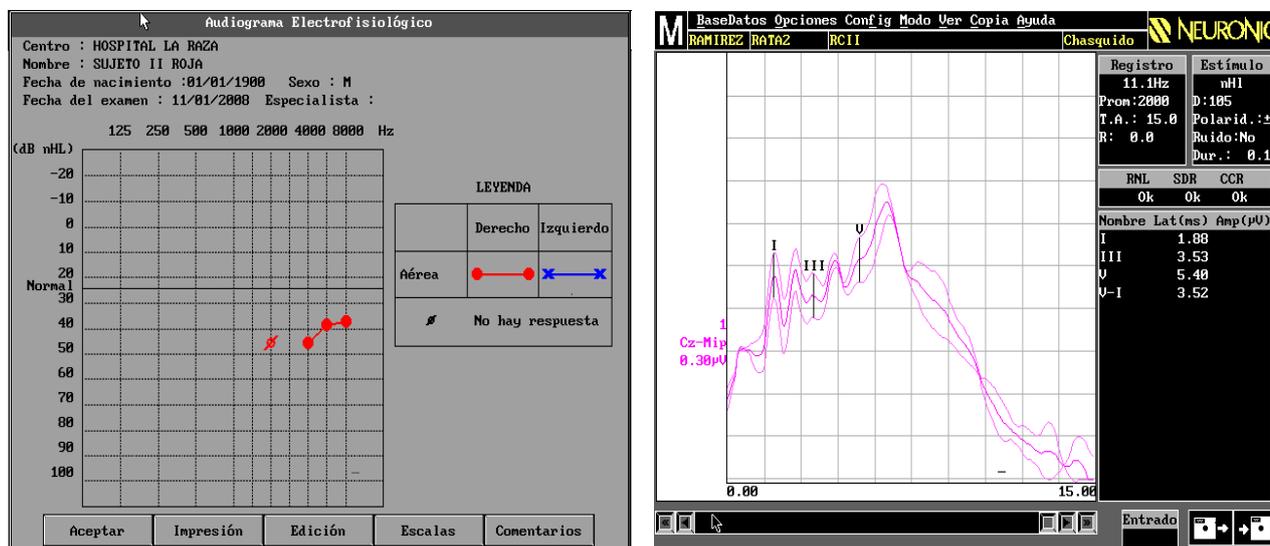
Figura XVIII. Fotomicrografías del órgano de Corti correspondiente a animales del grupo experimental con células mesenquimales implantadas. Órgano de Corti en la región medial (cuadro). Aun se observan células de origen hematopoyético sin diferenciar a mesenquimal (CD34+) (Figura C), algunas nerviosas inmaduras nestina+ (rojas) (Figura E) Hoesch (tinción nuclear, azul). Barra de calibración en A 200 y B y C 20 μ m, D y E 10 μ m



A

B

Figura XIX. Gráficas que muestran los potenciales provocados auditivos de estado estable (A) y los potenciales provocados auditivos trasientes del tallo cerebral (B) un mes después de realizar el falso trasplante (sin células madre), en ambos se corrobora sordera profunda, no hay mejoría auditiva y por lo tanto existe ausencia de respuesta del órgano de Corti.



A

B

Figura XX. Gráficas que muestran los potenciales provocados auditivos de estado estable (A) y los potenciales provocados auditivos trasientes del tallo cerebral (B) un mes después de realizar el trasplante con células madre, en ambos se corrobora la respuesta del órgano de Corti y la mejoría auditiva posterior a la aplicación del trasplante con células madre mesenquimales de médula ósea.

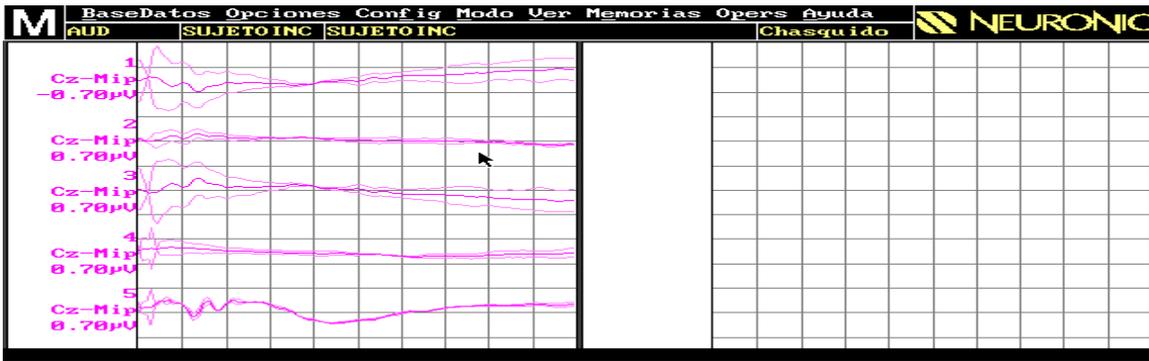


Figura XXI. Grupo Control. Gráfica que muestra los potenciales provocados auditivos trasientes del tallo cerebral un mes después de realizar el falso trasplante (sin células madre), se muestra ausencia de respuesta del órgano de Corti.

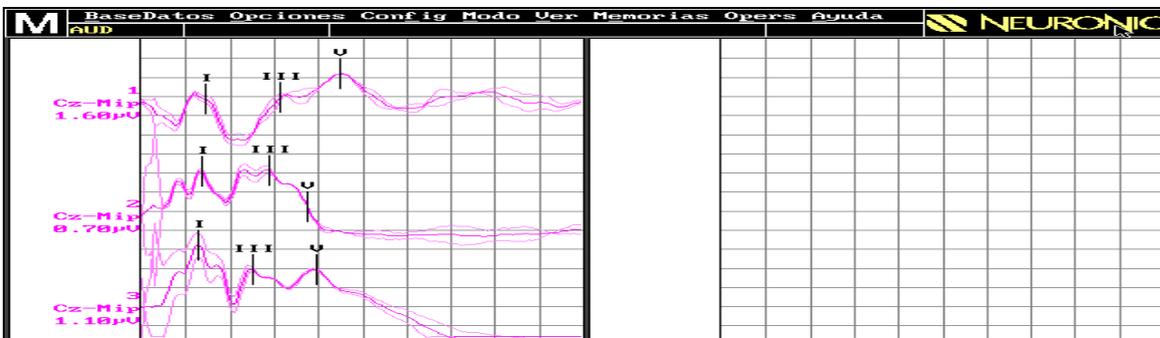


Figura XXII. Grupo Experimental. La gráfica muestra los potenciales provocados auditivos trasientes del tallo cerebral en los sujetos I- III, un mes después de realizar el trasplante con células madre, se corrobora la respuesta del órgano de Corti posterior a la aplicación del trasplante con células madre mesenquimales de médula ósea.

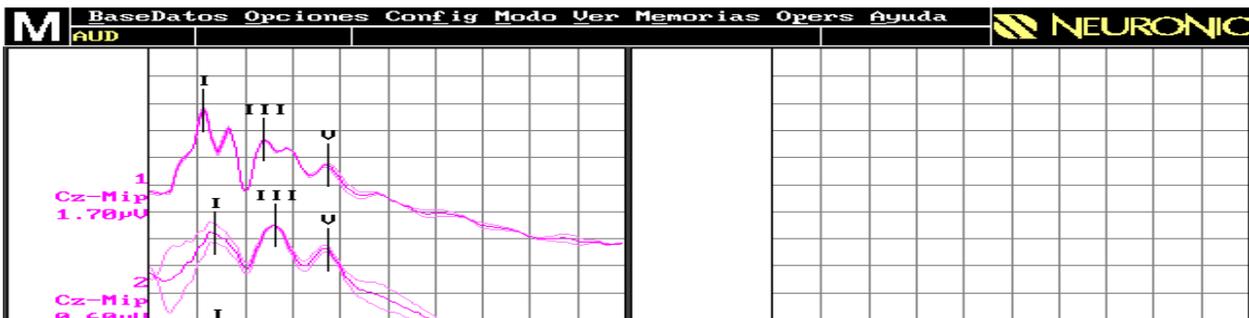


Figura XXIII. Grupo Experimental. La gráfica muestra los potenciales provocados auditivos trasientes del tallo cerebral en los sujetos IV-V, un mes después de realizar el trasplante con células madre, se corrobora la respuesta del órgano de Corti posterior a la aplicación del trasplante con células madre mesenquimales de médula ósea.

Tabla I. Obtención de médula ósea/ sangre de tibia de las ratas y preparación de las células madre adultas mesenquimales

Grupo	Cantidad	Viabilidad por azul de tripano, posterior a cultivo	Concentración de células madre mesenquimales por citometría *
Experimental	500µl de médula ósea/sangre por animal	74.1% (50 – 82.5%)	32.96% de CD34 38.02% de CD13 6.15% de CD117

µl = Microlitros.

* = En un millón de células madre

Tabla II. Determinación de la respuesta del órgano de Corti antes y después de la aplicación de A + F

Basal				Post aminoglucósidos + furosemida	
Grupo	R.O.C	Respuesta auditiva Media ± dS (dB) Mínimo – Máximo(dB)	P*	R.O.C	Falta de respuesta auditiva Media (dB)
Experimental	Presente	10.62±1.31(8.75 – 12.50)	0.902	Ausente	105
Simulado	Presente	10.83 ±2.04(8.75 – 13.75)		Ausente	105
Control	Presente	10.41 ±1.29(8.75 – 11.25)		Ausente	105

R.O.C. = Respuesta del Órgano de Corti.

dB = Decibel. dS= Desviación estándar.

A= Amikacina 125 mg/kg intraperitoneal (i.p).

F= Furosemida 150mg/kg i.p.

P*= Anova (Tukey)

Tabla III. Análisis entre grupos de la respuesta del órgano de Corti medida como presente o ausente, treinta días después del trasplante de células madre adultas de médula ósea.

	N	R.O.C, 30 días Post-Implante		p [*]	I.C 99%
		Presente	Ausente		
Grupo Control	6	0	6(100%)	} p< 0.015	0.015 – 0.018
Grupo Simulado	5	0	5(83%)		
Grupo de Estudio	6	5 (83.3%)	1(16.7%)		

R.O.C.= Respuesta del Órgano de Corti.

P^{*} = Prueba exacta de Fisher.

N = Muestra.

% = Porcentaje.

Tabla IV. Análisis entre grupos de la respuesta del órgano de Corti medida en decibelios, treinta días después del trasplante de células madre

	N	% R	Respuesta auditiva Media ± dS (dB) Mínimo – Máximo(dB)	P [*]	I.C = 95%
Grupo de Estudio	6	100	82.29±14.08(71 – 110)		
Grupo Simulado	5	83	110(0 R)	p<0.0001	(-39.90) – (-15.51)
Grupo Control	6	100	110(0 R)	p<0.0001	(-39.90) – (-15.51)

dB = Decibel

dS = Desviación estándar

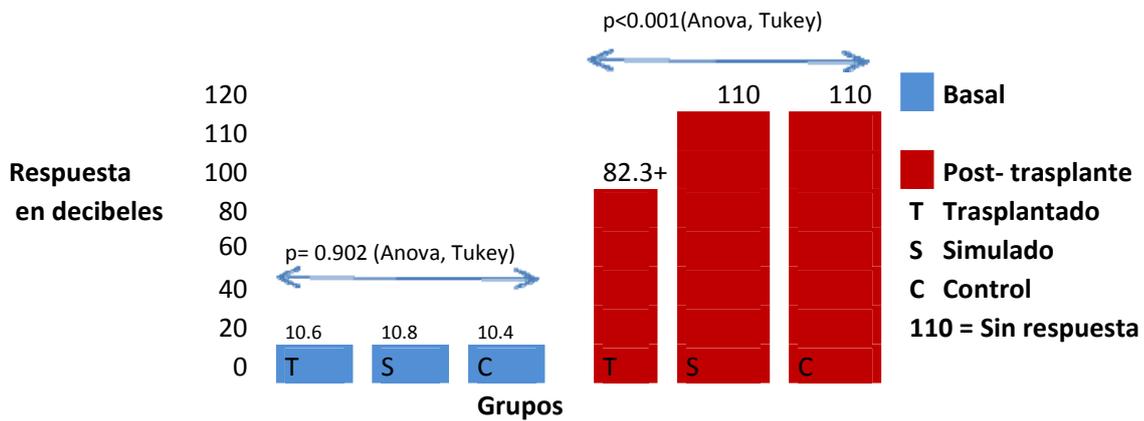
I.C = Intervalo de confianza

P^{*} = Anova (Tukey)

N = Muestra, % = Porcentaje

R= Respuesta

**Análisis entre la respuesta basal del órgano de Corti
y la respuesta 30 días después del trasplante
entre los grupos de estudio**



Gáfica I. La gráfica muestra los resultados auditivos (respuesta del órgano de Corti), a treinta días de realizado el trasplante, tanto el grupo simulado como el grupo control carecen de respuesta a 110 dB (decibeles), mientras que el grupo trasplantado muestra respuesta a 82.3 dB.

9. Potenciales Provocados de Tallo Cerebral posterior a aplicación de aminoglucósidos

Onda.	1. Presente	2. Ausente	Post – Implante.	1. Presente	2. Ausente
I.	_____	_____		_____	_____
III	_____	_____		_____	_____
V	_____	_____		_____	_____

10- Emisiones Otoacústicas posterior a colocación de aminoglucósidos.

Basal.	Post - aminoglucósidos
1. Presente. _____	_____
2. Ausente. _____	_____

11. Fecha de colocación de células progenitoras adultas de médula ósea __\ __\ __\

Día/ mes/ año

12. Potenciales Provocados de Tallo Cerebral posterior a aplicación de Células Madre

Onda.	1. Presente	2. Ausente	Post – Implante.	1. Presente	2. Ausente
I.	_____	_____		_____	_____
III	_____	_____		_____	_____
V	_____	_____		_____	_____

13. Emisiones Otoacústicas posterior a colocación de Células Madre .

Basal.	Post – Stem Cells 1000, 2000, 4000, 8000 y 10000Hz
1. Presente. _____	_____
2. Ausente. _____	_____

14. Cambios Histopatológicos del órgano de Corti. 1. Presentes 2. Ausentes
15. Cambios Inmunohistoquímicos del órgano de Corti. 1. Presentes 2. Ausentes.
16. Presentó alguna complicación 1-SI 2.NO
17. Presentó algún efecto adverso inmediato 1. SI 2. NO
18. Si su respuesta fue afirmativa señale cual. _____
19. Presentó algún efecto adverso durante el seguimiento 1.SI 2.NO
20. Si su respuesta fue afirmativa señale cual. _____
21. Presentó algún efecto adverso inesperado inmediato 1.SI 2.NO
22. Si su respuesta fue afirmativa señale cual. _____

Anexo II. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

1.- Desparafinar los cortes en la estufa toda la noche, 50 60 C

2.- Xilol 10-15 min X2

3.- Alcohol absoluto 5 min X2

4.- alcohol 96 5 min X2

5.- Agua corriente

6.- Hematoxilina de Harris 3 min.

7.- Alcohol ácido 1 min.

8.- Agua amoniacal 1min

9.- Agua corriente

10.- Eosina ½ min.

11.- alcohol 96 5min X2

12.- Alcohol absoluto 5 min X2

13.- Alcohol xilol 5 min

14.- Xilol 5 min X2

15.- Montar con resina o bálsamo de Canadá.

Xilol alcohol: concentración 1:1

Alcohol ácido: Alcohol 96 + 5-6 gotas de ácido clorídrico

Água amoniacal: Água destilada + 5 gotas de amoníaco

Fijación.

Después de la extracción de la muestra:

Perfusión perilinfática

Descalcificación

Lavados en PBS

Deshidratación.

Alcohol 70% 45min X2

Alcohol 80% 45min X2

Alcohol 96% 45 min X2

Alcohol absoluto 45 min X2 *

Xilol- etanol 1:1 45 min X2

Xilol 45 min X2

Inclusión en parafina.

2- 3 horas parafina I *

2-3 horas parafina II

* Puede permanecer toda la noche en este paso.

Anexo III. TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA POR CITOMETRIA DE FLUJO

Técnica usada para detectar Ag (antígenos) presentes en la superficie celular de la serie blanca por medio de AcMo (anticuerpos moleculares) marcados con un fluorocromo. Las células son primeramente marcadas con los Ac Mo conjugados con fluorocromos.

PROCEDIMIENTO

- 1) Poner en cada tubo un volumen de muestra que contenga 1×10^6 células.
- 2) Poner el anticuerpo monoclonal (la cantidad dependerá de la casa comercial que lo sirva debido a la concentración y el fluorocromo utilizado) (5 ul)
- 3) Agitar e incubar durante 10-15 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- 4) Añadir 2 ml de solución lisante comercial (dietilenglicol y formaldehido).
- 5) Agitar e incubar durante 5-7 min. a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 6) Centrifugar a 300g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 7) Decantar el sobrenadante.
- 8) Resuspender el botón celular.
- 9) Añadir 5 ml de PBS.
- 10) Centrifugar a 300g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 11) Decantar el sobrenadante.
- 12) Resuspender el botón celular.
- 13) Añadir 0.5-1 ml de PBS o Isoton.
- 14) Leer en el citómetro. BD FACS Aria de Becton Dick.