

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.

**“EFICACIA DE LA FENITOINA EN EL CIERRE DE LAS PERFORACIONES
TIMPANICAS EXPERIMENTALES EN RATAS WISTAR”**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TITULO EN LA ESPECIALIDAD DE

OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO

P R E S E N T A

DRA. CLAUDIA SOFIA TABOADA SAAVEDRA

TUTOR DE TESIS

DRA. ADRIANA CAROLINA LÓPEZ UGALDE

COTUTOR DE TESIS

FIACRO GIMÉNEZ PONCE

MEXICO DF, JULIO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
UNIDAD DE OTORRINOLARINGOLOGIA Y CIRUGIA DE CABEZA Y CUELLO

TESIS

**EFICACIA DE LA FENITOINA EN EL CIERRE DE LAS PERFORACIONES
TIMPANICAS EXPERIMENTALES EN RATAS WISTAR**

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TITULO EN LA:

**ESPECIALIDAD DE OTORRINOLARINGOLOGIA Y CIRUGIA DE CABEZA Y
CUELLO**

Presenta:

DRA CLAUDIA SOFIA TABOADA SAAVEDRA

DR ROGELIO MARCO ANTONIO CHAVOLLA MAGAÑA

Profesor titular del curso de posgrado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y
Cuello

Hospital General de México

DRA ADRIANA CAROLINA LOPEZ UGALDE

Profesor adjunto del curso de posgrado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza
y Cuello

Hospital General de México

AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

Por todo el gran amor que siempre me han brindado, por su apoyo incondicional sobre todas las cosas, por siempre creer en mí, hacerme una persona feliz y haberme dado la confianza, carácter y fuerza suficiente para lograr todo lo que me proponga.

A mis hermanas Celeste y Yolanda, a mi tía Celeste:

Por su amor, por su cariño, por confiar en mí, por saber que siempre cuento con ustedes a pesar de tenerlas tan lejos.

A Aicela, Malinalli y Frida.

A mis niñas hermosas, por su gran cariño, por siempre recordarme y quererme, por los momentos tan felices que me han dado.

A cesar:

Por su gran amor, cariño y su enorme paciencia, por ser mi apoyo incondicional en estos últimos años y por estar conmigo siempre que te he necesitado.

A la Dra. Adriana Carolina López Ugalde:

Gracias por su amistad, por todo su cariño, por siempre confiar en mí y defenderme, por ser mi gran maestra durante estos cuatro años, por siempre estar dispuesta a poner todos sus enormes conocimientos a nuestro alcance, por corregirme y regañarme todas las veces que fue necesario, gracias por ser mi ejemplo a seguir, el mejor que pude haber encontrado, y hacerme sentir orgullosa y segura de lo que se y de haberlo aprendido de usted.

A mis compañeros de generación.

A los Doctores Ana Ayala, José Albarran, y en especial a Luis Ortiz, gracias por haberme permitido compartir estos 4 años con ustedes.

Al Dr. Rogelio Chavolla Magaña.

Por su gran confianza al aceptarme en su servicio y haberme permitido realizar la residencia en este gran hospital.

A los Doctores Sandra Raya, Fiacro Jiménez, Javier Rogero y Ludwig González.

Por su gran apoyo en la realización de esta tesis, sin el cual no hubiese sido posible.

A mis compañeros residentes:

Diana Zamora, Mariana Saltos, Eva Puga, Álvaro Takane, Valdemar Valdespino, Natalia Rivera, Regina De la Paz, Paola Pérez, Miguel Ángel Rico, Karla Chávez, Joselyn Ávila, Montserrat Reyes, Edith Hernández, Oliver Valenzuela, Rodolfo Leal, Daniel Guerrero, Alfredo Carrillo, Diego Cariño, Gabriela Espinoza, Angélica León gracias por convivir conmigo estos 4 años en los buenos y malos momentos.

A los doctores:

Alejandro Espinosa, Cristina Alarcón, Fabricio del Rio, Antonio Martínez Cardona, Jorge Moisés, Pilar Canseco, Alma Anaya, Jorge Rizo, Enrique Lamadrid, Víctor Alarcón, Laura Domínguez, Juan Fajardo⁺, por ser parte importante en mi formación como especialista.

Dr. Tomás Martínez, Dr. Alberto Torres, Dr. Jorge Ballesteros:

Por convivir conmigo estos cuatro años, gracias por su confianza y su paciencia.

Al personal de enfermería:

En especial a chelita y a lulu, gracias por facilitarnos las cosas, y gracias por apoyarnos cuando lo necesitábamos.

INDICE

1.-Resumen Estructurado	1
2.-Marco teórico	2
3.-Pregunta de Investigación	6
4.-Planteamiento del problema	6
5.-Justificación	6
6.-Objetivos	
6.1 Objetivo General	7
6.2 Objetivo Secundario	7
7.-Hipotesis	8
8.-Metodologia	
8.1 Tipo y diseño del estudio	9
8.2 Población y Tamaño de Muestra	9
8.3 Criterios de Inclusión	10
8.4 Criterios de Exclusión	10
8.5 Variables y definición	10
8.6 Material y métodos	11
9.-Aspectos Éticos	13
10.-Análisis estadístico	15
11.-Resultados	15
12.-Conclusiones	21
13.-Discusión	21
14.-Bibliografía	22

RESUMEN ESTRUCTURADO

Marco teórico: La perforación aguda de la membrana timpánica generalmente es resultado de infección o trauma. El principal cambio en el cierre de la perforación es el movimiento de queratina hacia el centro de la perforación, la proliferación epitelial y la neovascularización sobre todo en la capa fibrosa. Las técnicas quirúrgicas para reconstrucción de la membrana timpánica utilizan distintos materiales, requiriendo a menudo de anestesia general y la morbilidad que esto conlleva, la fenitoína se ha utilizado tópicamente en la cicatrización de úlceras varicosas por su efecto sobre la proliferación epitelial, siendo un agente de fácil aplicación, bajo visión microscópica.

Objetivos: Determinar la eficacia de la fenitoína aplicada tópicamente en el cierre de perforaciones timpánicas, realizadas previas a la aplicación del medicamento en membranas timpánicas de ratas wistar.

Diseño de estudio: Ensayo clínico experimental prospectivo longitudinal realizado en 30 ratas wistar machos

Métodos: El estudio se realiza en 30 ratas adultas wistar macho de la misma camada con un peso aproximado cada una de 250 a 350 gr. Los animales fueron anestesiados con ketamina a dosis de 60 mg/kg y xilacina a 20 mg/kg en forma intramuscular, en muslo derecho y se les realizó perforación timpánica en forma bilateral en cuadrantes inferiores. Después de este procedimiento los animales fueron divididos en 6 grupos por medio de una asignación aleatoria con 5 ratas en cada grupo (1, 2, 3, 4, 5, 6). Todos los animales fueron observados en jaulas con acceso libre al alimento y agua y revisados bajo visión microscópica a los 3, 7 y 14 días después de realizada la perforación.

Variables: Variable independiente, categórica ordinal: Aplicación tópica de fenitoína. Variables intercurrentes: Oído perforado, Cualitativa nominal dicotómica; Sitio de la perforación, cualitativa y nominal dicotómica. Variable dependiente, cualitativa nominal dicotómica: Cierre de la perforación.

MARCO TEORICO

La perforación aguda de la membrana timpánica generalmente es resultado de la infección o trauma. Después del trauma agudo la membrana timpánica se engrosa como resultado del edema, inflamación, y neovascularización sobre todo en la capa fibrosa. ⁽¹⁾ Sin embargo el principal cambio en el cierre de la perforación es el movimiento de queratina hacia el centro de la perforación, la proliferación epitelial y la neovascularización sobre todo en la capa fibrosa. ⁽²⁾⁽⁴⁾

En la práctica clínica, perforaciones timpánicas crónicas son secuelas de otitis media aguda, otitis media serosa, otitis media crónica, o lesión traumática. Clínicamente, una perforación se puede describir como crónica después de 3 meses. Perforaciones timpánicas agudas curan generalmente en 7-10 días. La curación espontánea de perforaciones traumáticas está cerca del 80% (78.7%). En marcos experimentales, una perforación es crónica cuando dura 8 a 15 semanas después de ser creada.

La membrana timpánica es única ya que es una estructura suspendida en aire. Comprende dos segmentos de tamaño y constitución diferentes, la pars tensa y la pars flácida. La pars tensa es de naturaleza fibroelástica, poco móvil; La pars flácida es la porción de membrana del tímpano situada encima de los pliegues maleares anterior y posterior.

Las dimensiones de la membrana timpánica son 10 mm de altura y 9 mm de anchura. Su grosor es de 0,05 a 0,09 mm y su superficie, de 65 mm². La membrana está orientada hacia delante, abajo y afuera.

Está compuesta por la unión de tres capas. La capa externa es cutánea (stratum cutaneum) y se continua con la piel del conducto auditivo externo. La capa interna mucosa (stratum mucosum) está constituida por la mucosa de la cavidad timpánica. La capa intermedia es fibrosa y se distinguen varios tipos de fibras: una capa externa de fibras radiadas que se extienden entre el anillo fibrocartilaginoso y el mango del martillo, donde se insertan en el lado opuesto a su origen; una capa interna de fibras circulares; fibras parabólicas anteriores y posteriores y fibras arciformes o semilunares.⁽³⁾

En su periferia, la capa fibrosa de la membrana está engrosada y forma el anillo fibrocartilaginoso (annulus), que se encaja en el surco timpánico excavado en la parte timpánica del hueso temporal. Este surco no es visible desde el exterior pues su borde externo es más alto que el interno. ⁽⁵⁾

La capa externa es una capa epitelial queratinizada típica, se compone de 3 a 5 capas celulares. La capacidad de esta de migrar lateralmente tiene características únicas. Las vías de migración son específicas, más rápidas en algunas partes de la membrana timpánica. La capa migratoria tiene disminución de la adherencia intercelular en las capas profundas y disminución de la diferenciación en todas las capas. La migración ocurre en alguna parte del estrato basal y el espinoso debido a la presencia de espacios intercelulares, procesos citoplasmicos, y pocos desmosomas. Aunque es posible que la migración ocurra en la membrana basal. La perforación incrementa la actividad mitótica, no en el borde de la perforación, pero en las células a 2mm después del punto de lesión.

La pars flácida de la membrana timpánica se compone de tres capas. Tiene dos capas epiteliales con una capa gruesa de tejido conectivo entre ellas. Similar a la pars tensa. Contiene una mayor proporción de fibras elásticas, y carece de tejido conectivo altamente organizado separando las capas. El epitelio de la membrana mucosa en esta región carece de cilios. Se continua con la piel del CAE y el tejido conectivo.

Las primeras etapas de curación de la membrana timpánica siguen a las etapas de curación de heridas convencionales de hemostasia e inflamación. Las etapas proliferativas y migratorias son diferentes. Los principales cambios que producen el cierre de la perforación es el movimiento de la queratina hacia el centro de la perforación, proliferación epitelial y la eventual formación de la nueva capa fibrosa, se produce alrededor de los márgenes de la perforación una reacción exudativa compuesta de líquido intersticial, linfocitos y sangre, a esta formación se le llama "costra", la cual protege al tejido subyacente previniendo la deshidratación y provee de un medio ideal para la migración de células y el proceso de reparación. En pocos días ocurre en la capa epitelial de la membrana timpánica junto con la proliferación celular un exceso en la producción de queratina que es la llave de la dirección de la migración hacia el centro de la perforación. Debido a que el epitelio escamoso hiperplásico descansa sobre tejido de granulación, el cual es infiltrado por polimorfonucleares el cierre del defecto inicialmente ocurre en la capa epitelial de queratina pero después el tejido conectivo que lo soporta termina por cerrarla, la mucosa de la cavidad timpánica tiene una importancia mínima en el proceso de reparación debido a que es la más lenta. (11)

El estímulo de queratina inicial tiende un puente producido por una capa escamosa hiperplásica. Los puentes de queratina sirven como andamio para el epitelio. Esto es seguido por la capa de tejido conectivo. De esta manera, la curación de la perforación timpánica es única, con la capa epitelial siendo la primera, no la última capa para tender un puente sobre la perforación. La capa de células mucosas puede tener un rol proporcionando el andamio. El epitelio queratinizado y las células suprabasales migran sobre esto. Por tinciones de actinia

F, una proteína citoesquelética contráctil, se ha demostrado que las células basales se separan y emigran en las primeras 24 horas. Esto es seguido por su proliferación y entonces migración suprabasal. La respuesta proliferativa máxima de las células basales es a 2mm del borde de la perforación.

El grosor promedio en el borde de la perforación es 0.114mm comparados con el grosor normal de la membrana timpánica que es de 0.05-0.09 milímetros.

Una timpanoplastia implica reconstrucción del mecanismo auditivo del oído medio, creando una cavidad libre de infección con una membrana timpánica intacta. La sistemática reconstrucción de la membrana timpánica se inicia en la era moderna con los reportes de Wullstein y Zollner utilizando piel de espesor parcial y total colocado sobre una membrana timpánica desepitelizada, pero desafortunadamente se presentó eccema del injerto, inflamación y finalmente re-perforación. Muchos materiales han sido utilizados en la reparación de la membrana timpánica incluyendo piel, cartílago, fascia de temporal, pericondrio, grasa, papeles como el de arroz, y recientemente dermis acelular humana.

Una desventaja de las técnicas quirúrgicas de la timpanoplastia es la necesidad a menudo de anestesia general, la realización de incisiones para ampliar la exposición quirúrgica, y la necesidad de reposo en el postoperatorio limitando las actividades normales del paciente. Un abordaje favorable para el cierre de perforaciones timpánicas sería la administración de agentes bioabsorbibles que favorezcan el cierre de las perforaciones timpánicas, proporcionando un andamio, para la migración epitelial, sin los efectos nocivos de la cirugía. Tal agente podría ser colocado bajo visión microscópica en un consultorio.

La fenitoína oral fue introducida en 1937 para el control de las crisis convulsivas, se relaciona a los barbitúricos por su estructura química, afectando la corteza motora del cerebro donde inhibe la actividad convulsiva por acción de los canales de sodio y calcio en el tejido neural. Muchos de los pacientes manejados con este fármaco (20%) presentaban hiperplasia gingival cuando era utilizada por largo tiempo, lo cual causo interés para su utilización en la reparación de heridas.⁽⁵⁾

La hiperplasia gingival causada por fenitoína se vincula con hiperplasia pronunciada del tejido conectivo y el epitelio. Hay acantosis en el epitelio y prolongaciones epiteliales elongadas se extienden en la profundidad del tejido conectivo, el cual muestra haces de colágena en forma densa, con un aumento en el número de fibroblastos y nuevos vasos sanguíneos.⁽⁷⁾

Los experimentos en cultivo de tejidos, indican que la fenitoína estimula la proliferación de fibroblastos y del epitelio. Los fibroblastos de la hiperplasia

inducida por fenitoína muestran una síntesis mayor de glucosaminoglucanos sulfatados.

Estudios en vitro y en vivo han demostrado que la célula predominante en el tejido hiperplásico sometido a fenitoína es el macrófago. Los macrófagos gingivales expuestos a fenitoína secretan niveles incrementados de factor B de crecimiento derivado de plaquetas, además de estimular la secreción de IL 1 en tejidos inflamados. (8) (9)

Para valorar la efectividad de la fenitoína tópica en preservar la viabilidad de injertos de piel se realizó un estudio en 42 ratas divididas en dos grupos iguales, a quienes se le produjo una herida en el dorso. Un grupo tratado con fenitoína en ungüento al 10%, y otro con vaselina, se realizó injerto una semana después de la aplicación diaria. Se registró la presencia de tejido de granulación sano, la reducción de la superficie de la herida y el tiempo de la integración de injerto. El ungüento de fenitoína tuvo un incremento significativo en la viabilidad y aceptación del injerto en el grupo de fenitoína contra 3 de la vaselina (6).

Pregunta de Investigación

¿Será efectiva la aplicación tópica de fenitoína para promover el cierre completo de las perforaciones centrales de la membrana timpánica?

Planteamiento del Problema

La perforación de la membrana timpánica, es un problema común en la otorrinolaringología, esta pueda ser causada por una otitis media aguda, traumatismo o bien por otitis media crónica, la mayoría de las perforaciones agudas (90%) cierran con o sin intervención quirúrgica (1), sin embargo en el 10% de los casos el cierre de la perforación no ocurre, creando una morbilidad la cual incluye hipoacusia, otorrea crónica o bien la formación de colesteatoma. Las perforaciones timpánicas que persisten requieren habitualmente la necesidad de un evento quirúrgico con la morbilidad que esto significa.

Justificación

La utilización de agentes bioabsorbibles como lo es la fenitoína, es de fácil aplicación, la cual puede realizarse bajo visión microscópica directamente en la perforación sin la necesidad de anestesia general y a un bajo costo, en un procedimiento sencillo y sin efectos adversos conocidos.

La realización de un modelo animal de perforación timpánica, el cual sea similar a la perforación en humanos, permitiría el estudio de nuevas opciones de tratamiento para el cierre de perforaciones timpánicas sin la necesidad del evento quirúrgico. La rata podría ser el animal seleccionado debido a la similitud de su membrana timpánica con la del humano y a su fácil disponibilidad con un bajo costo.

Objetivos

Objetivo General

- ❑ Demostrar la eficacia de la fenitoína en el cierre de perforaciones timpánicas, así en un estudio piloto realizado en ratas.

Objetivo secundario

- ❑ Encontrar la dilución adecuada para el cierre de perforaciones timpánicas con la menor cantidad de fármaco.
- ❑ Conocer la anatomía del oído externo, oído medio y membrana timpánica en roedores para diseños experimentales posteriores.

HIPOTESIS

- Las perforaciones timpánicas agudas en ratas en relación directa a la concentración del fármaco aplicado presentaran cierre de la perforación posterior a la aplicación de fenitoína sin presentar efectos secundarios a su aplicación.

METODOLOGIA

Tipo y diseño del estudio

- ❑ Estudio experimental en animales
- ❑ Estudio Longitudinal
- ❑ Aleatorio
- ❑ Consecutivo
- ❑ Analítico
- ❑ Concurrente
- ❑ Homodemico
- ❑ Prospectivo
- ❑ De Novo
- ❑ Abierto

Se trata de un estudio observacional abierto, el cual describe los resultados de la aplicación de fenitoína en el cierre de perforaciones timpánicas por medio de su aplicación tópica en ratas realizadas en el servicio de medicina experimental en el Hospital General de México.

Población y tamaño de la muestra

- ❑ Población Diana: el estudio se realizara en 60 membranas timpánicas sanas a las cuales se realizara perforación timpánica traumática previa a la aplicación del medicamento.
- ❑ Población accesible: ratas adultos machos sanas, en las cuales se pueda realizar aplicación de fenitoína tópica en perforaciones de membrana timpánica.

Criterios de Inclusión

- ❑ Ratas Wistar
- ❑ Machos
- ❑ Adultos
- ❑ Ratas con membranas timpánicas integra al inicio del estudio
- ❑ Con vacunas y bajo condiciones de cuidados e higiene establecidas en el bioterio
- ❑ Peso de 250 a 350 gr.

Criterios de Exclusión

- ❑ Ratas que no cumplan con el periodo de seguimiento posterior a la aplicación de fenitoína.
- ❑ Ratas muertas durante el procedimiento.
- ❑ Perforación en cuadrantes superiores
- ❑ Ratas con infección u afección ótica

Definición de las variables a evaluar y formas de medirlas

Variable independiente, categórica ordinal

- ✚ Aplicación tópica de fenitoína
 - Grupo A: Control, solo se perfora el oído sin aplicación de medicamento
 - Grupo B: se aplica 100 mg de fenitoína en un mililitro de hipromelosa
 - Grupo C: 50 mg/ 1 ml
 - Grupo D: 25 mg/1 ml
 - Grupo E: 12.5 mg/ 1ml
 - Grupo F: solo se aplica solución salina en la perforación

Variables intercurrentes

- ✚ Oído perforado, Cualitativa nominal dicotómica
 - Derecho
 - Izquierdo
- ✚ Sitio de la perforación, cualitativa y nominal dicotómica
 - Cuadrante Anteroinferior
 - Cuadrante Posteroinferior
 - Se toma como criterio de exclusión las perforaciones realizadas en cuadrantes superiores

Variable dependiente, cualitativa nominal dicotómica

- ✚ Cierre de la perforación
 - Si: cierre completo de la perforación a los 14 días de haber sido creada
 - No: presencia de perforación a los 14 días de haber sido creada.
 - Se entenderá como cierre de la perforación la ausencia de solución de continuidad en la membrana timpánica observada clínicamente al microscopio, a los 14 días de la aplicación del medicamento
- ✚ Tiempo de cierre de la perforación
 - 3 días
 - 7 días
 - 14 días

Métodos

- ✚ Previo a la realización del procedimiento, se realizó una disección de oído en una rata adulta, la cual fue sacrificada, disecando por completo el hueso temporal y desarticulándolo de su unión al cráneo, observándose, un conducto auditivo externo amplio, con un trayecto poco sinuoso, el cual estaba formada por una porción cartilaginosa externa de aproximadamente 13 mm de longitud y una porción ósea interna de aproximadamente 2 mm de longitud, la cual terminaba con el inicio del oído medio delimitado por la membrana timpánica la cual tenía un diámetro de aproximadamente 2 mm, se realizó revisión histopatológica de la pieza previa fijación en formol, seguido de descalcificación en ácido nítrico al 10% durante una hora y alcalinización en solución carbonatada durante 10 minutos, realizándose múltiples cortes de 3 a 5 micras en forma transversal a la membrana timpánica.
- ✚ Las ratas se encuentran bajo los cuidados del bioterio con agua y alimento a libre demanda.
- ✚ Se realiza división de las ratas en seis grupos de 10 oídos cada uno, distribuidos aleatoriamente.
- ✚ Se realizan diluciones del medicamento a partir de cápsulas de difenilhidantoína de 100 mg realizando las siguientes preparaciones en 1 ml de hipromelosa: 12.5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml. Se vacía el contenido de una cápsula de difenilhidantoína y se pesa en una balanza analítica, dividiendo el peso total se divide en fracciones equivalentes a la cantidad que se desea preparar; y se adiciona el polvo a 0.5 ml de hipromelosa y se mezcla en un agitador vortex a 2000 rpm por 2 minutos, después se deja reposar el tiempo suficiente para que desaparezcan las burbujas que se han formado y se lleva a 1 ml de volumen con la hipromelosa. La porción restante de esa cápsula se divide nuevamente en dos porciones iguales y se lleva a cabo el mismo procedimiento, y así sucesivamente para las siguientes dosis. Se mantiene en refrigeración para evitar la oxidación del fármaco y de esa manera permitir que la duración de la preparación se prolongue.
- ✚ Día 1: Bajo efectos de anestesia utilizando ketamina a 40 mg por kg. + xilacina a dosis de 10 mg/kg intramuscular se lleva a cabo bajo técnica estéril y visión microscópica una perforación de la membrana timpánica de la rata en cuadrantes inferiores de 1 mm. de diámetro.

- ✚ Se aplica el medicamento correspondiente según el grupo al cual pertenezca la rata designado previamente al azar. El medicamento se aplicara a los 10 minutos posterior a la realización de la perforación.
- ✚ Al día 3 después de realizarse la perforación se lleva a cabo la primera exploración de la membrana timpánica bajo visión microscópica con efectos de anestesia utilizada anteriormente.
- ✚ Al día 7 de la perforación se lleva a cabo la segunda exploración bajo visión microscópica.
- ✚ A los 14 días posteriores al cierre de la perforación se realiza sacrificio de las ratas con una megadosis de pentobarbital, observándose la membrana timpánica al microscopio, y se realiza disección de hueso temporal en una rata de cada grupo, enviando dicha pieza al servicio de patología del Hospital general de México, para corroborar hallazgos patológicos de cicatrización.

Material

- ✚ 30 ratas wistar que cumplan con criterios de selección
- ✚ 1 microscopio Carl Zeiss modelo OPMI9
- ✚ Laboratorio experimental
- ✚ Consumibles
 - Fenitoína
 - Hipromelosa
 - Ketamina y xilacina
 - Punzocat número 16
 - Jeringas insulina

ASPECTOS ETICOS

Respecto a los aspectos éticos, estos se siguieron de acuerdo a la NOM 062-ZOO-1999, considerando las siguientes especificaciones éticas:

Confinamiento o encierro primario.

El equipo en el cual se alojara a las ratas:

- a) Proporciona el espacio adecuado para permitir movimientos y posturas normales de la especie.
- b) Cerrado a prueba de escape y protege al animal de amenazas externas.
- c) Adecuado en ventilación y conforme a las necesidades biológicas de la especie.
- d) Resistente al lavado y desinfección frecuente.

Los confinamientos cumplen las siguientes características:

- a) Cubren las necesidades fisiológicas (alimentación, defecación, micción u otros) y conductuales de los animales, permitiendo los movimientos normales y ajustes posturales característicos de la especie.
- c) Permite interacciones sociales entre los individuos de la especie, establecimiento de jerarquías y conductas de escape.
- d) Brinda una ventilación e iluminación adecuadas.
- e) Favorece que los animales se mantengan limpios y secos.
- f) Seguras, impidiendo el escape de los animales o el entrapamiento de sus extremidades.
- g) De bordes y aristas redondeadas.
- h) Fácil de limpiar rutinariamente, así como cambio, llenado y suministro de agua y alimento.
- i) Permite la observación de los animales.
- j) Hechos de materiales resistentes, durables e impermeables.

Salud animal.

- a) Los roedores se mantienen libres de enfermedades zoonóticas y parásitos externos. El bioterio cuenta con las medidas sanitarias y de control que aseguran el control absoluto de los animales en experimentación (escape, contacto con roedores silvestres, eliminación de cadáveres u otros), así como protección del personal en contacto con los animales, sus partes o sus desechos.
- b) El personal del bioterio se somete una vez al año a un examen de salud.

Alimentación y provisión de agua.

- a) El alimento se proporciona a libre acceso, con los requerimientos nutricionales adecuados según la especie.
- b) Se proporciona agua potable a libre acceso durante toda la vida del animal.

Cama y nido.

Los roedores se alojan en cajas con piso sólido con aserrín que garantiza la absorción de su orina, excremento y desperdicio de agua y favorece su aislamiento térmico.

Agrupamiento de animales.

Con excepción de las indicaciones justificadas ante el Comité, los roedores deben alojarse en grupos. En ratones no deben alojarse más de un macho con una hembra o varias hembras en reproducción.

Manipulación e inmovilización.

Las técnicas de sujeción, manipulación e inmovilización que se realicen en el bioterio deben estar acordes con los principios humanitarios internacionales aceptados, aprobados por el Comité y supervisadas por el Médico Veterinario responsable.

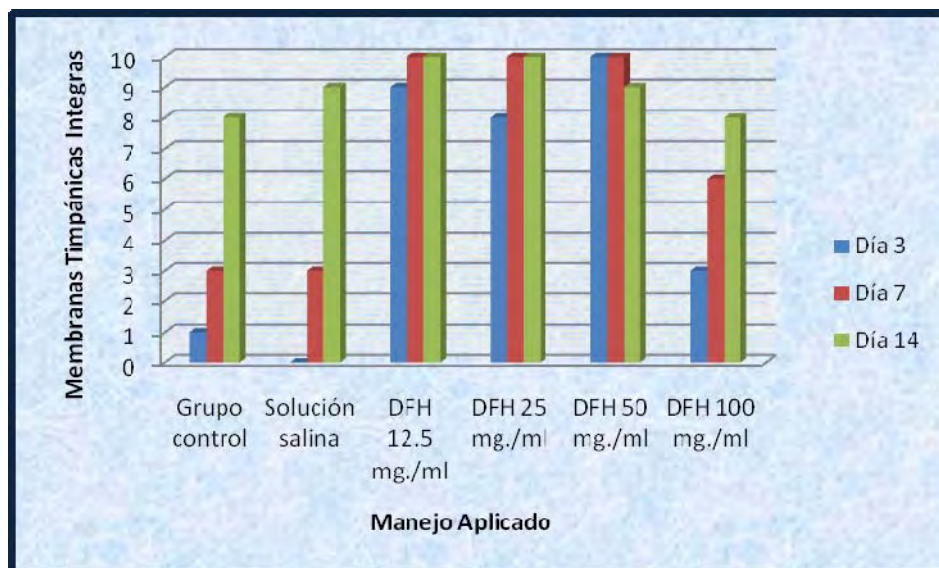
ANALISIS ESTADISTICO

Se recabara información en hoja de calculo SPSS. Se realizara estadística descriptiva con frecuencias, porcentajes, medidas de tendencia central. Se realiza estadística analítica con chi cuadrada comparando el grupo control, con solución salina y las distintas diluciones.

RESULTADOS

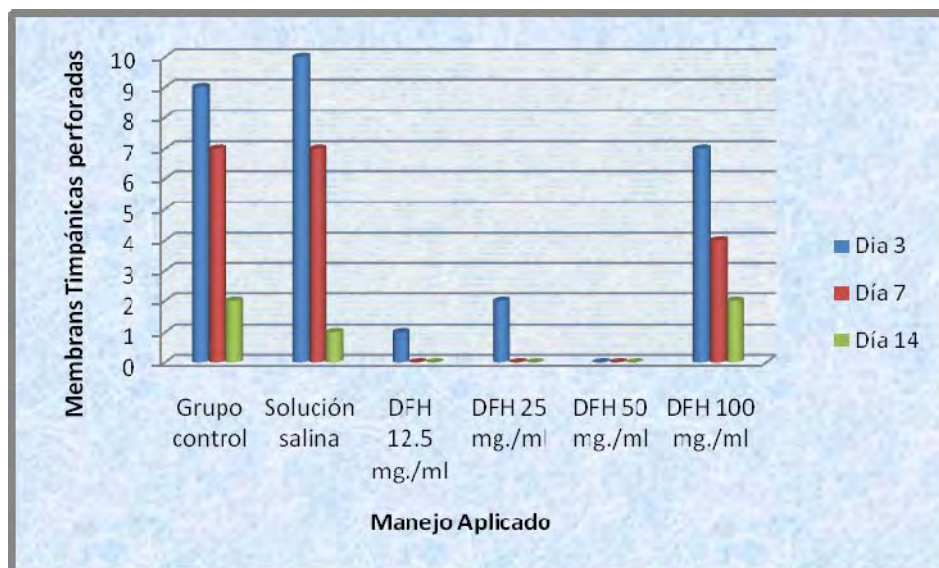
Dos semanas posterior a la realización de la perforación y a la aplicación del medicamento, se realiza sacrificio de la rata con una megadosis de pentobarbital y se revisan las membranas timpánicas al microscopio, encontrándose que en el grupo 1 (control) se observo que 1 de los oídos tuvo cierre de la perforación en la primera revisión (10%), 2 oídos tuvieron cierre de la perforación en la segunda revisión (20%), 5 oídos tuvieron cierre de la perforación en la última revisión (50%) y 2 oídos no tuvieron cierre de la perforación (20%). En el grupo 2 (solución salina) se observo que ningún oído tuvo cierre de la perforación a la primera revisión, 3 oídos tuvieron cierre de la perforación en la segunda revisión (30%), 6 oídos tuvieron cierre de la perforación en la tercera revisión (60%) y uno de los oídos no presento cierre de la perforación (10%). En el grupo numero 3 (12.5 mg), 9 oídos tenían cierre de la perforación en la primera revisión (90%), y en un oído se observo integridad de la membrana timpánica hasta la segunda revisión (10%). En el grupo número 4 (25 mg) se observo que 8 oídos tenían cierre de la perforación en la primera revisión (80%), mientras que 2 oídos tuvieron cierre de la perforación en la segunda revisión (20%). En el grupo numero 5 (50 mg) se observo que los 10 oídos tuvieron cierre de la perforación timpánica en la primera revisión (100%). En el grupo 6 (100 mg.) se observo 3 oídos con cierre de la perforación en la primera revisión (30%), 2 oídos con cierre de la perforación en la segunda revisión (20%), 3 oídos con cierre de la perforación en la tercera revisión (30%) y 2 oídos que no tuvieron cierre de la perforación(20%). (Graficas 1,2,3,4). Se realiza estadística analítica, observándose una significancia estadística a los 3 días con chi cuadrada con 5 grados de libertad, observándose $p = .000$, misma prueba a los 7 días con resultado de $p = .000$ y a los 14 días, $p = .483$. Se realiza chi cuadrada a las distintas dosificaciones de fenitoina a los 3 días de su aplicación obteniéndose para 12.5 mg $p = .005$, a 25 mg $P = .006$, 50 mg, $p = .001$, y 100 mg $p = .005$, siendo estadísticamente significativa para las 4 diluciones.

Membranas timpánicas integras en las distintas revisiones



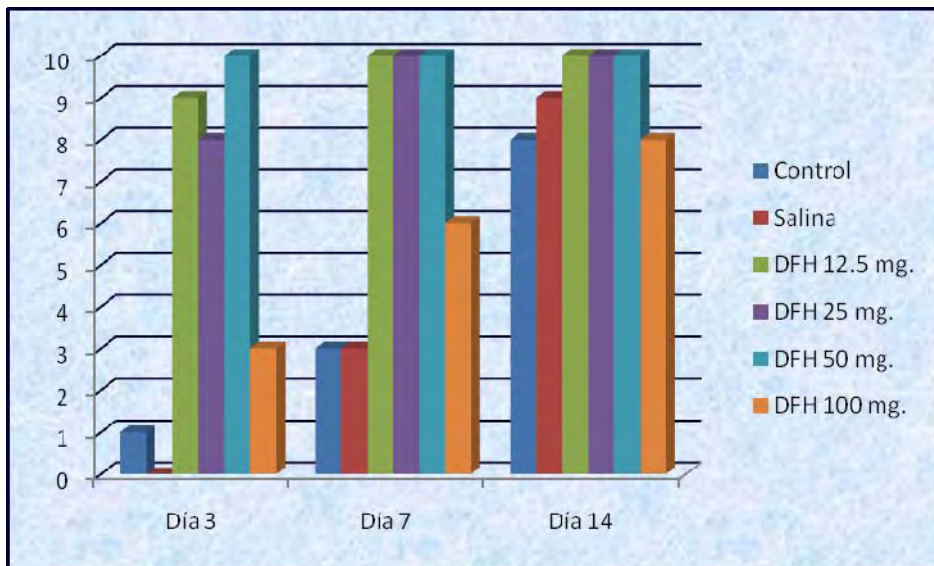
Gráfica 1

Membranas timpánicas perforadas en las distintas revisiones



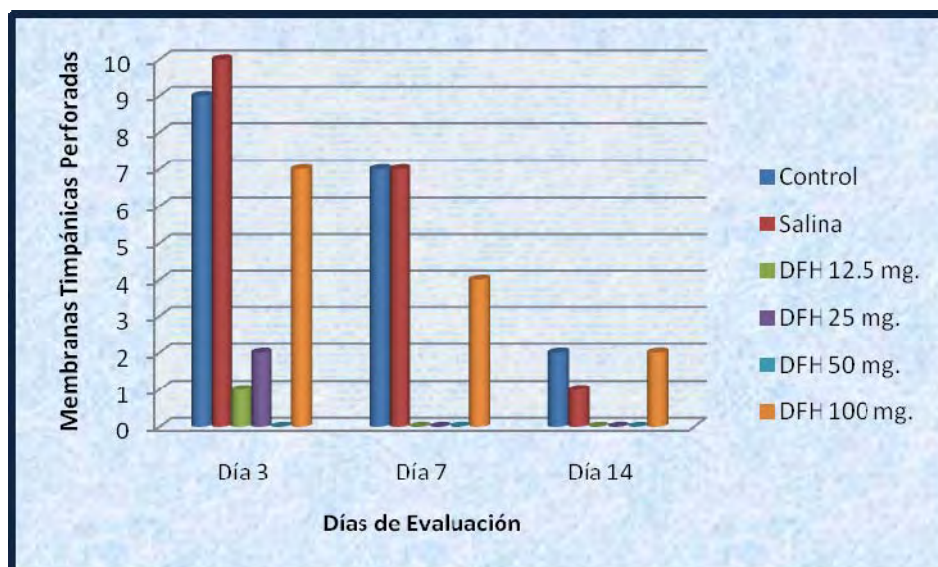
Gráfica 2

Membranas timpánicas integras a las diferentes diluciones



Gráfica 3

Membranas timpánicas perforadas a las distintas diluciones



Gráfica 4

CONCLUSIONES

Las perforaciones timpánicas experimentales realizadas en ratas cierran espontáneamente en un periodo de dos semanas en un 80%, la fenitoina actúa acelerando el cierre de las perforaciones timpánicas experimentales presentando variación de acuerdo a la dosis aplicada tópicamente, observándose que la dosis de 50 mg presenta los mejores resultados, con cierre de las perforaciones timpánicas a los 3 días de ser realizadas y colocado el medicamento en un 100% de los oídos, seguida por la dosis de 12.5 mg que presente un cierre de la perforación timpánica en el 90% de los oídos a la primera revisión, la dosis de 25 mg. Presenta un cierre de las perforaciones en un 80% a la primera revisión. Por ultimo la dosis de 100 mg., fue la que obtuvo los peores resultados en cuanto al cierre de las perforaciones timpánicas presentando cierre de las perforaciones solo en un 80% al igual que el grupo control, muy probablemente debido a su consistencia demasiado espesa, lo cual hacia sumamente difícil su aplicación sobre la membrana timpánica.

DISCUSION

La finalidad de una membrana timpánica integra es la de evitar procesos infecciosos en el oído medio, la aplicación de medicamentos tópicos que favorecen el cierre de una perforación timpánica, sugiere un procedimiento útil para lograrlo sin la morbilidad que una cirugía representa, en la bibliografía encontrada se menciona que la fenitoina a dosis de 100 mg por ml de hipromelosa favorece el cierre de las perforaciones timpánicas, en nuestra experiencia en base a este estudio se encontró que de las diferentes diluciones de fenitoina aplicadas sobre la perforación, la que menos favorece el cierre de esta es la dosis de 100 mg, muy probablemente debido a su consistencia espesa, que la vuelve de difícil aplicación sobre la membrana timpánica, encontrándose que la mejor dilución es la de 50 mg, la cual es de fácil aplicación y acelera el cierre de las perforaciones.

BIBLIOGRAFIA

1. Peter L. Santa Maria, MBBS; Marcus D. Atlas, Reza Ghassemifar. Chronic tympanic membrane perforation: a better animal model is needed. *Wound Repair and Regeneration*, Mayo 2007. Páginas 450 a 459.
2. Anisur Rahman, Malou Hultcrantz, †Joris Dirckx, Gregory Margolin, and Magnus von Unge. Fresh Tympanic Membrane Perforations Heal Without Significant Loss of Strength. *Otology and Neurotology*, junio 2005, páginas 1100-1107
3. Karin Stenfeldt, MD, PhD; Cathrine Johansson, BS; Sten Hellström, MD, PhD. The Collagen Structure of the Tympanic Membrane Collagen Types I, II, and III in the Healthy Tympanic Membrane, During Healing of a Perforation, and During Infection. *Archives otolaryngology Head and neck surgery*, Marzo 2006. Páginas 293 a 299
4. Enis Alpin Gu'neri, Selma Tekin, †Osman Yilmaz, †Esra Özkara, Taner Kemal Erdag, Ahmet Ömer İ. kiz, †Su'len Sariog'lu, Ataman Gu'neri. The Effects of Hyaluronic Acid, Epidermal Growth Factor, and Mitomycin in an Experimental Model of Acute Traumatic Tympanic Membrane Perforation. *Otology and neurotology*, Vol 24 2003. Páginas 371 a 377
5. Jeffrey H. Spiegel and Joshua L. Kessler. Tympanic Membrane Perforation Repair with Acellular Porcine Submucosa. *Otology and neurotology*. 25: 563 a 566. 2003
6. Pendse AK, Sharma A, Sodani A, Hada S. Topical phenytoin in wound healing. *Int J Dermatol* 1993;32(3):214-7
7. Yadav JK, Singhvi AM, Kumar N, Garg S. Topical phenytoin in the treatment of split-thickness skin autograft donor sites: a comparative study with polyurethane membrane drape and conventional dressing. *Burns* 1993;19(4):306-10.
8. Estrada TC. , Martínez CchJj, Dd'az de León MLVv. Administración t'pica de promotores de la cicatrizaci3n en perforaciones cr3nicas de la membrana timp'nica. *An Orl Mex* 2008;53(2):75-80.
9. Bansal NK, Mukul. Comparison of topical phenytoin with normal saline in the treatment of chronic trophic ulcers in leprosy. *Int J Dermatol* 1993;32(3):210-3.
10. N. Phenytoin in cutaneous medicine: its uses, mechanisms and side effects. *Dermatol Online J* 2003;9(3):6.
11. Shaw J, Hughes CM, Lagan KM, Bell PM. The clinical effect of topical phenytoin on wound healing: a systematic review. *Br. J Dermatol*, 157(5): 997-1004.2007.