



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
“DR. ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

**“COMPARACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DE LOS
INJERTOS DE PERICARDIO BOVINO TRATADO CON
GLUTARALDEHÍDO LIOFILIZADO Y FASCIA
TEMPORAL EN LA TIMPANOPLASTÍA. ESTUDIO
EXPERIMENTAL”**

T E S I S

QUE PRESENTA LA:

DRA. ZAIDE YAZMÍN NAVA SALDAÑA

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALIDAD EN:
OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y
CUELLO

TUTOR DE TESIS:
DRA. LISETTE CRISTERNA SÁNCHEZ

ASESOR DE TESIS:
DR. ROGELIO JASSO VICTORIA



CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO 2016



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 AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
“DR. ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

**“COMPARACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DE LOS INJERTOS
DE PERICARDIO BOVINO TRATADO CON
GLUTARALDEHÍDO LIOFILIZADO Y FASCIA TEMPORAL EN
LA TIMPANOPLASTÍA. ESTUDIO EXPERIMENTAL”**

DR. ARMANDO ROBERTO CASTORENA MALDONADO

Jefe de Departamento y Profesor Titular de la Especialidad de
Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello

DRA. MARGARITA FERNÁNDEZ VEGA

Subdirectora de Enseñanza

DRA. MARÍA DEL CARMEN CANO SALAS

Jefa del Departamento de Formación de Posgrado

DRA. LISETTE CRISTERNA SÁNCHEZ

Tutor de Tesis

DR. ROGELIO JASSO VICTORIA

Asesor de Tesis

Esta tesis fue realizada en:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, "Ismael Cosío Villegas" (INER).

Investigadores asociados:

M en C Juan Raul Olmos Zuñiga Investigador en Ciencias Médicas "D"
Departamento de Cirugía Experimental INER

Dra Maria Elba Osorio Necochea. Residente de Cuarto año de
Otorrinolaringología INER

Dr. Miguel Gaxiola Gaxiola. Investigador en Ciencias Medicas "C" Departamento
de Morfología INER

Dra Claudia Hernández Jiménez Investigador en Ciencias Medicas "C"
Departamento de Cirugía Experimental INER

QFB Matilde Baltararez Lipp QFB Adscrito al Departamento de Experimental
INER

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	5
Introducción.....	6
Planteamiento del problema.....	16
Justificación.....	17
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	19
Material y Métodos.....	20
Consideraciones éticas.....	29
Análisis estadístico.....	30
Resultados	31
Discusión	40
Conclusiones.....	44
Anexos.....	45
Referencias.....	47

RESUMEN

Título: “COMPARACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DE LOS INJERTOS DE PERICARDIO BOVINO TRATADO CON GLUTARALDEHÍDO LIOFILIZADO Y FASCIA TEMPORAL EN LA TIMPANOPLASTÍA. ESTUDIO EXPERIMENTAL”.

Marco teórico: La membrana timpánica (MT) juega un papel importante en la fisiología de la audición así como en la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias del oído medio. La perforación de la membrana timpánica es una secuela común de una enfermedad inflamatoria de oído medio de larga evolución o recurrente. A pesar de la capacidad de regeneración de la MT, es un aspecto crucial para el otorrinolaringólogo la búsqueda de nuevas opciones para el cierre de las perforaciones timpánicas crónicas. Es necesario buscar un material que sea biocompatible, seguro, de fácil disponibilidad y bajo costo que pueda ser utilizado como injerto para el cierre de timpanoplastías. Se ha observado que el pericardio bovino tratado con glutaraldehído liofilizado (PBTGL) es un material biocompatible que se integra bien a los tejidos, fácil de preparar y transportar, posee adecuada resistencia, flexibilidad, así como manejo quirúrgico y no requiere vascularización por ser inerte, por lo que lo podría ser una buena opción para ser utilizado como injerto para timpanoplastía. **Objetivos: General:** Comparar el uso, integración y cicatrización de los injertos de FT o PBTGL después de una timpanoplastía en cobayos. **Específicos:** Evaluar el manejo quirúrgico del PBTGL y FT de acuerdo a su flexibilidad, facilidad para cortar y moldear (darle el tamaño y forma correcta), así como su facilidad para introducirse o removerse durante la timpanoplastía. Valorar los cambios otoscópicos producidos a diferentes tiempos por la colocación de un injerto de PBTGL o FT durante la cicatrización de la MT de cobayos. Determinar los cambios microscópicos producidos a diferentes tiempos por la colocación de un injerto de PBTGL o FT durante la cicatrización de la MT de cobayos. **Metodología:** Se realizó un estudio experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo. Se utilizaron 36 cobayos de raza Dunkin-Harley. A todos los animales se les realizó una perforación de la membrana timpánica derecha total y 4 meses después se llevó a cabo timpanoplastía con abordaje endaural tipo underlay y colocación de los injertos de la siguiente forma: Grupo I (n=9): PMT y timpanoplastía con injerto de PBTGL con cicatrización del injerto por 4 meses; Grupo II (n=9): PMT y timpanoplastía con injerto de FT, con cicatrización del injerto por 4 meses; Grupo III (n=9): PMT y timpanoplastía con injerto de PBTGL, con cicatrización del injerto por 1 mes; Grupo IV (n=9): PMT y timpanoplastía con injerto de FT con cicatrización del injerto por 1 mes. **Resultados:** Otoscópicamente en ningún caso se observó la presencia de líquido transtimpánico, ni retracción de la MT. En todos los casos la MT se observó íntegra. Con respecto a la presencia de inflamación se observó que los animales tratados con los injertos de PBTGL desarrollaron más en comparación con los de FT ($p = 0.005$ Chi cuadrada). **Conclusiones:** En este trabajo se encontró que el PBTGL es un material biológico que puede ser utilizado como injerto timpánico; se obtuvo un porcentaje de cierre similar al patrón de referencia (fascia temporal) y no aparecieron complicaciones al seguimiento a corto y mediano plazo.

INTRODUCCIÓN

La membrana timpánica (MT) juega un papel importante en la fisiología de la audición así como en la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias del oído medio. La perforación de la membrana timpánica es una secuela común de una enfermedad inflamatoria de oído medio de larga evolución o recurrente. La MT tiene una gran capacidad de regeneración, por lo que la mayoría de las perforaciones agudas cierran espontáneamente. A pesar de esta capacidad de regeneración, es un aspecto crucial para el otorrinolaringólogo la búsqueda de nuevas opciones para el cierre de las perforaciones timpánicas crónicas. Las perforaciones timpánicas disminuyen la calidad de vida de millones de personas en el mundo ¹.

EL OÍDO

El aparato auditivo está diseñado para recibir vibraciones mecánicas, conducirlas a las células receptoras primarias y convertir esta energía en una forma eléctrica codificada para su conducción al sistema nervioso central.

El oído se divide en 3 regiones: oído externo, medio e interno, cada una de las cuales tiene características estructurales y funciones propias. El externo, está formado por el pabellón auricular, conducto auditivo externo (CAE), así como la membrana timpánica y su función es recibir las ondas sonoras. El oído medio es un espacio aéreo localizado en la porción petrosa del hueso temporal y está formado por la cavidad timpánica, la trompa de eustaquio y la mastoides, su función es conducir las ondas sonoras que recibe el oído externo hacia las células receptoras. Dentro de la cavidad timpánica se encuentra la cadena oscular formada por el martillo, yunque y el estrido. El martillo tiene un proceso

largo llamado martillo que se encuentra adherido a la MT, el yunque se encuentra unido al martillo y al estribo, el cual se encuentra en contacto con la ventana oval a través de la platina. El oído interno es un laberinto óseo y membranoso, el cual está formado por la cóclea, vetíbulo y los 3 canales semicirculares y tiene una doble función, ya que actúa como órgano receptor primario de la audición y mantiene el equilibrio ^{2,3}.

LA MEMBRANA TIMPÁNICA

La membrana timpánica tiene un origen trilaminar, del ectodermo del piso del primer arco branquial lateralmente como una capa epidérmica, endodermo de la primera bolsa faríngea medialmente como la capa mucosa, y el mesénquima de la cresta neural con el mesodermo cefálico interpuesto como la capa fibrosa ⁴.

La MT humana es un diafragma en forma de cono, delgada, traslúcida, ligeramente más ancha superiormente que inferiormente, forma la porción central de la pared lateral de la caja timpánica. Su diámetro más largo de 9-10mm en de posterosuperior a anteroinferior y su diámetro más pequeño de 8-9mm es perpendicular a este, forma un ángulo de 55° con respecto al piso de conducto auditivo externo, con un área total de 64mm² aproximadamente ¹.

La membrana timpánica (MT) es la estructura que separa el oído externo del oído medio (OM) y es la responsable de la amplificación del sonido, así como la transmisión del mismo a la cadena osicular, ventana oval y rampa vestibular ⁵.

La capa externa consiste en epitelio escamoso estratificado queratinizado. La capa media consiste en tejido conectivo subepitelial laxo, tejido conectivo denso organizado y tejido conectivo laxo submucoso. El tejido conectivo laxo consiste en fibras de colágeno arregladas de manera laxa, fibroblastos, fibras nerviosas

y capilares. El tejido conectivo denso consiste en fibras de colágeno organizadas de manera radial externamente y circular internamente. La capa interna consiste en epitelio columnar simple, que se continua con la mucosa del oído medio ⁶. La MT consiste en 2 partes: la pars flácida y la pars tensa. La pars flácida es una región triangular pequeña por encima del ligamento maleolar y no tiene annulus timpánico en su margen. El resto de la MT es llamada pars tensa, es tensa y cóncava, con su máxima depresión a nivel del umbo. El grosor de la pars flácida es de 0.03 a 0.23mm y de la pars tensa 0.03 a 0.09mm ¹ (Figura 1).



Figura 1 MT izquierda normal.

OÍDO DEL COBAYO

En los cobayos el hueso temporal y sus estructuras son muy similares a la anatomía humana, cuando se compara con otros modelos animales, los cobayos se han asociado a un mejor acceso quirúrgico para el oído, principalmente debido al tamaño de la bulla mastoidea ⁷. La MT mide 8 x 7mm, el diámetro del annulus timpánico se vuelve más grande a través de su inicio medial desde el annulus timpánico (1mm de ancho) y tiene su diámetro más largo en su borde libre. El diámetro del conducto auditivo externo es más pequeño que la MT, por lo que solo se puede visualizar el 50% de esta. El color y la forma es similar a la MT humana, aunque es más delgada y transparente. La MT no tiene annulus fibroso, se encuentra firmemente adherida al borde libre del annulus timpánico.

Una diferencia importante con respecto a la MT humana es que no contiene pars flaccida, otra diferencia es la ausencia de capa fibrosa. La cabeza del martillo y el cuerpo del yunque se encuentran fusionados y forman un complejo incudomaleolar. La cóclea tiene 3.5 vueltas⁸ (Figura 2).



Figura 2. Vista medial de la MT de un oído izquierdo de cobayo, anatomía sin alteraciones.

MODELO ANIMAL PARA PERFORACIÓN TIMPÁNICA

Existen varios modelos para perforación timpánica, no existe ninguno que esté estandarizado. Se dividen de acuerdo a la técnica en: traumática (daño térmico, re-miringotomía), alteración física del epitelio (técnica de invaginación), química (Mitomicina-C, 5-Fluorouracilo, Dexametasona, Hidrocortisona, Colchicina, Glutaraldehído), inmunológica (Inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico) y genética (deficiencia del gen del plasminógeno y activador de plasminógeno). Los criterios recomendados para un modelo de perforación crónica son: duración de la perforación de al menos 8 semanas, tasa de éxito, evidencia microscópica y macroscópica y detalles de la re-miringotomía⁹.

PERFORACIÓN DE LA MEMBRANA TIMPÁNICA

La MT al igual que otros tejidos, no está exento de sufrir alguna patología y una de estas son las perforaciones, las cuales pueden ser crónicas o agudas. Las perforaciones de la membrana timpánica (PMT) crónicas generalmente son una secuela de las enfermedades inflamatorias recurrentes y de larga evolución del OM ¹; mientras que las agudas habitualmente son resultado de una infección o trauma (aumento de la presión, quemaduras químicas o térmicas, heridas penetrantes y barotraumas). Los síntomas principales de estas son plenitud ótica (92%), acufeno (83%), hipoacusia (65%), otorragia u otorrea hialina (29%), otalgia (8%), otorrea purulenta (1%) y mareo (1.1%) ¹⁰.

En la literatura se ha descrito que del 74-94% de las perforaciones traumáticas que abarcan menos de una cuarta parte del área de la MT, cierran espontáneamente durante el 1ero a 3er mes postrauma ¹¹; mientras que las que involucran un área mayor y/o están acompañadas por cambios patológicos en el OM requieren de técnicas como la miringoplastia y la timpanoplastia con la colocación de algún tipo de injerto para su cierre ^{12,13}. Los principales factores que intervienen para la falla del cierre espontáneo de las perforaciones son: infección secundaria la cual se presenta hasta en un 37.5% aproximadamente, perforación mayor al 50%, perforación periférica, edad mayor de 60 años, timpanoesclerosis preexistente, daño al mango del martillo, herida penetrante ^{10,11,14,15}.

El proceso de cierre de una perforación timpánica se divide en 3 fases, las cuales se pueden sobreponer en tiempo: inflamatoria, proliferativa y remodelamiento. En estudios experimentales se ha visto que la fase inflamatoria empieza inmediatamente después de la lesión en el tejido y dura de 4-6 días; esta fase

consiste en un desorden de la vasculatura con aumento en la permeabilidad vascular, fuga de proteínas séricas, plaquetas y factores de coagulación, se reclutan polimorfonucleares en las primeras 5 a 6 hrs y monocitos después de 48-96hrs. La fase proliferativa es clásicamente caracterizada por la proliferación epitelial, proliferación de fibrolastos con depósito de colágeno y por angiogénesis, con formación de tejido de granulación; se da generalmente en los días 4-14. En el 3er día después de una perforación traumática, una capa epitelial hiperplásica, proliferativa, es observada cerca del mango del martillo y del annulus; existe una tendencia de formación de puentes epiteliales que avanza en dirección del cierre de la membrana. La fase de remodelamiento empieza después de los 8 días y persiste por algunos meses; el evento molecular principal ocurre en la matriz extracelular de la lámina propia, en donde se observa un aumento en el número de fibroblastos, con una forma aplanada ^{1,5}. Existe otro tipo de migración epitelial no centripeta, que no va en dirección de la perforación, la cual no ha sido aún bien caracterizada, pero se ha visto que puede retrasar el cierre de la perforación, se cree que puede estar relacionada con el balance de las fuerzas tensoras de la MT remanente ⁶. También se ha observado que en perforaciones húmedas primero se forma tejido de granulación sobre el cual se inicia el crecimiento epitelial, en ciertos estudios se ha encontrado que esto puede favorecer un cierre más rápido en comparación con perforaciones secas ¹⁶.

TRATAMIENTO DE LAS PERFORACIONES TIMPÁNICAS

Para la reparación de las perforaciones de la membrana timpánica se usan varias técnicas como la miringoplastia y la timpanoplastia las cuales pueden ser medial

(Underlay), lateral (Overlay) o una combinación de estas la medial/lateral (Over-Under) y los abordajes pueden ser transcanal, endaural o retroauricular ¹².

En la técnica medial, la cual es usada más frecuentemente, el injerto se coloca medial al mango del martillo y a los remanentes de la membrana, es generalmente más recomendada para perforaciones posteriores, tiene menos riesgo de lateralización y con una tasa de éxito de 96.42%, aún en manos no expertas ¹⁷.

En la técnica lateral después de la elevación del colgajo dermatimpánico, el injerto se posiciona lateral al annulus y a los remanentes de la capa fibrosa de la membrana, se puede usar en todo tipo de perforaciones, conserva el volumen del oído medio y tiene mejores resultados en perforaciones anteriores y grandes, con una tasa de éxito del 92.85% ¹⁷.

En la técnica medial/lateral el injerto se coloca debajo de los remanentes de la membrana y sobre el mango del martillo, su tasa de éxito es de 94.9% ¹⁷.

El objetivo de la timpanoplastía es erradicar la infección y patología del OM, restablecer la MT para prevenir infecciones y asegurar una conexión durable entre la membrana y el oído interno ^{14,18}.

Factores pronósticos independientes para timpanoplastía son: tamaño de la perforación menor al 50%, oído contralateral sano, ausencia de miringoesclerosis, ausencia de otorrea por más de 3 meses, índice de riesgo de oído medio bajo (MERI) ¹⁹. El índice de Riesgo de Oído Medio evalúa las siguientes variables: otorrea, perforación de la membrana, colesteatoma, cadena osicular, efusión o tejido de granulación en la cavidad de oído medio, cirugía previa, tabaquismo; en base a los cuales se otorga un puntaje y da un riesgo bajo, medio o alto para el pronóstico del paciente (Tabla 1) ²⁰.

Factor de Riesgo	Valor de Riesgo
Otorrea (Belluci)	
I. Seca	0
II. Ocasionalmente mojada	1
III. Persistentemente mojada	2
IV. Mojada, paladar hendido	3
Perforación	
No	0
Si	1
Colesteatoma	
No	0
Si	2
Estado de huesecillos (Austin/Kartush)	
0) M+I+S	0
A) M+S+	1
B) M+S-	2
C) M-S+	3
D) M-S-	4
E) Fijación de la cabeza a los huesos pequeños	2
F) Fijación del estribo	3
Oído medio granulaciones o derrames	
No	0
Si	2
Intervención quirúrgica previa	
No	0
Si	1
Revisión	2
Fumador	
No	0
Sí	2

Pronóstico / Índice de Riesgo	
Mejor Pronóstico (Oído normal)	0
Riesgo Leve	2
Riesgo Moderado	5
Riesgo Grave	7
Peor Pronóstico (Estadio Final)	12

Tabla 1. Índice de Riesgo de Oído Medio (MERI).

Se denominan casos de alto riesgo cuando existe una perforación total o casi total, perforaciones bilaterales, otorrea activa, fumadores y anomalías de la mucosa como timpanoesclerosis y edema de la mucosa de oído medio con disfunción de trompa de Eustaquio documentada ²¹.

Existen diferentes tipos de injertos para la timpanoplastia y se dividen según su origen en: autólogos, cuando provienen del mismo individuo y es el material más biocompatible que existe; homólogo, alogénico o aloinjerto cuando proviene de otro individuo de la misma especie; heterólogo o xenoinjerto cuando proviene de otra especie; sintético o aloplástico, que son materiales inertes ^{14,22}.

Entre los materiales sintéticos encontramos el papel vegetal ²³ y Gelfoam[®] ¹¹;

entre los injertos autólogos encontramos: fascia temporal (FT) que es la más utilizada, tejido areolar laxo, vena, grasa, pericondrio, cartílago, periostio, dura madre, fascia lata ^{21,24-28}; los aloinjertos como: matriz dérmica acelular (Alloderm[®]), fascia temporal deshidratada (Tutoplast[®]) ²⁹⁻³¹ y xenoinjertos: colágeno acelular porcino y pericardio bovino (Tutopatch[®]), solos o en combinación con matrices de colágeno, alginato de Calcio, seda, ácido tricloroacético ³², factores de crecimiento, ácido hialurónico (Epifilm[®]) ³³, grasa más ácido hialurónico ²⁴ y pentoxifilina.

Debido a su proximidad anatómica, translucencia, la fascia temporal es el injerto más usado en la actualidad, el cual se introdujo a principios de 1960, con una tasa de éxito de cierre de aproximadamente 90% en timpanoplastías primarias ³⁴. Otros injertos como el cartílago y pericondrio tienen una tasa de éxito de aproximadamente 78-90% ²¹.

Sin embargo su uso no ha mostrado el 100% de éxito debido a que se desprenden, producen reacción a cuerpo extraño, además se tiene que crear otro defecto en los pacientes para obtenerlos, y algunos son costosos y no siempre están disponibles; por esta razón es necesario buscar otro material que sea biocompatible, seguro, de fácil disponibilidad y bajo costo que pueda ser utilizado como injerto para el cierre de timpanoplastías.

PERICARDIO BOVINO TRATADO CON GLUTARALDEHÍDO LIOFILIZADO

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INERICV) se ha trabajado con preservación al 0.5% (PBTG) y liofilización del pericardio bovino (PBTGL) con el fin de disminuir los residuos de glutaraldehído, facilitar su almacenaje y transportación, así como con su uso como bioprótesis

para la reconstrucción de defectos de la pared toracoabdominal ³⁵, resecciones pulmonares no anatómicas ³⁶, reparación quirúrgica de perforaciones del septum nasal ³⁷, cierre de defectos atriales ³⁸ y como implante para medialización de cuerdas vocales ³⁹ con buenos resultados. Durante estos estudios se ha observado que es un material biocompatible que se integra bien a los tejidos, fácil de preparar y transportar, posee adecuada resistencia, flexibilidad, así como manejo quirúrgico ⁴⁰ y no requiere vascularización por ser inerte, por lo que lo podría ser una buena opción para ser utilizado como injerto para timpanoplastia; además hasta el momento no se han realizado estudios similares en con este material.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Es la integración y cicatrización de los injertos de pericardio bovino tratado con glutaraldehído liofilizado después de una timpanoplastía en cobayos similar a la mostrada por los de fascia temporal?

JUSTIFICACIÓN

Las perforaciones de la membrana timpánica son un padecimiento común en nuestra población, con una incidencia de 3918 casos en el 2013 según el INEGI ⁴¹ y su tratamiento se lleva a cabo mediante la colocación de un injerto mediante timpanoplastía; en el INER se realizaron 52 timpanoplastías en el 2013 ⁴²; sin embargo los utilizados no han mostrado el éxito deseado, en ocasiones no están disponibles o son muy costosos por lo que requerimos tener diversas opciones de materiales para ser usados como injertos, el pericardio bovino liofilizado tratado con glutaraldehído (PBTGL) es un material que ha sido utilizado clínica y experimentalmente con buenos resultados en otros tejidos, es de bajo costo, fácil acceso, fácil de manipular y de una consistencia similar a la fascia temporal (que es el material más usado para esto), además de que por ser un xenoinjerto se evita el trauma ocasionado al usar injertos autólogos, por lo que es una buena opción para ser utilizado como injerto en timpanoplastía.

HIPÓTESIS

La integración y cicatrización de los injertos de PBTGL después de una timpanoplastía en cobayos, será similar a la mostrada por los de FT.

NULA:

No habrá integración y cicatrización de los injertos de PBTGL después de una timpanoplastía en cobayos, en comparación a la mostrada por los de FT.

ALTERNA:

La integración y cicatrización de los injertos de PBTGL después de una timpanoplastía en cobayos, será mejor que la mostrada por los de FT.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Comparar el uso, integración y cicatrización de los injertos de FT o PBTGL después de una timpanoplastía en cobayos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar el manejo quirúrgico del PBTGL y FT de acuerdo a su flexibilidad, facilidad para cortar y moldear (darle el tamaño y forma correcta), así como su facilidad para introducirse o removerse durante la timpanoplastía.
- Valorar los cambios otoscópicos producidos a diferentes tiempos por la colocación de un injerto de PBTGL o FT durante la cicatrización de la MT de cobayos.
- Determinar los cambios microscópicos producidos a diferentes tiempos por la colocación de un injerto de PBTGL o FT durante la cicatrización de la MT de cobayos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo.

RECURSOS

El financiamiento de esta investigación fue otorgado por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER-ICV) y se realizó en el Laboratorio de Cirugía Experimental del mismo.

En este estudio participaron los investigadores y técnicos del Departamento de Investigación en Cirugía Experimental del INER-ICV, así como los investigadores del departamento de Otorrinolaringología, Cirugía de Cabeza y Cuello del mismo Instituto.

El departamento de Cirugía Experimental proporcionó los quirófanos, equipos de anestesia inhalada, monitores, microscopios e instrumental necesario para la realización de los procedimientos quirúrgicos, tratamientos y seguimiento postoperatorios de los animales.

También intervino en este estudio el personal del Departamento de Investigación en Morfología del INER-ICV, quién procesó las muestras de los tejidos sometidos a estudio.

Los animales utilizados en este estudio fueron proporcionados por el bioterio del INER-ICV.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron 36 cobayos de raza Dunkin-Harley, clínicamente sanos, sin importar sexo, ni edad, con un peso entre 1000 y 1200gr. Todos los animales fueron tratados de acuerdo a las Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de

Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana ⁴³ y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos ⁴⁴.

TAMAÑO DE MUESTRA

La muestra fue calculada para una población finita con un intervalo de confianza del 95% y mediante la ley de Russell.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron cobayos SPF (libres de patógenos específicos) producidos en el bioterio del INER-ICV, sin alteraciones óticas.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Los animales con antecedentes de algún procedimiento o enfermedad de oído, fueron excluidos del estudio.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Todo animal que presento signos clínicos de cualquier patología que no haya sido provocada por la perforación de la MT o la timpanoplastía, será eliminado. Cobayos que fallecieron durante el tiempo de estudio y cobayos que presentaron cierre espontáneo de la perforación timpánica realizada

CRITERIOS DE TERMINACIÓN

Aquellos animales que mostraron signos de dolor agudo o crónico, de acuerdo a lo descrito por The Rat Grimace Scale ⁴⁵ y que no disminuyo con la aplicación de medicamentos, fueron sometidos a eutanasia con sobredosis anestésica

utilizando pentobarbital sódico (Anestosal, Pfizer S.A. de C.V. Guadalajara, México).

GRUPOS DE ESTUDIO

A todos los animales con el uso de microscopio se realizó una perforación de la membrana timpánica derecha total y 3 meses después se llevó a cabo timpanoplastía con abordaje endaural tipo medial y colocación de los injertos de la siguiente forma:

Grupo I (n=9): PMT y timpanoplastía con injerto de PBTGL con cicatrización del injerto por 4 meses

Grupo II (n=9): PMT y timpanoplastía con injerto de FT, con cicatrización del injerto por 4 meses

Grupo III (n=9): PMT y timpanoplastía con injerto de PBTGL, con cicatrización del injerto por 1 mes.

Grupo IV (n=9): PMT y timpanoplastía con injerto de FT con cicatrización del injerto por 1 mes.

PREPARACIÓN DEL PERICARDIO BOVINO TRATADO CON GLUTARALDEHÍDO

El pericardio se obtuvo de bovinos entre 6 y 18 meses de edad recién sometidos a eutanasia con una pistola de perno cautivo. Se realizó limpieza manual del tejido mediante disección para retirar el exceso de grasa pericárdica y el tejido se sumergió en solución salina a 4°C, se transportó al laboratorio donde se limpió de grasa y tejido conectivo, después se lava en solución de Hank (SIGMA Chemical Co. St. Louis, M.O.) a 4°C en un

contenedor con un agitador magnético por 6 horas. Posteriormente los pericardios se montaron en aros de plástico de 15 cm de diámetro y se sumergieron durante 15 días en una solución de glutaraldehído al 0.5% con amortiguador de fosfatos 0.1 M y pH de 7.4 a 4°C. Transcurrido ese tiempo se tomaron muestras del pericardio y de la solución de preservación, para cultivo microbiológico³⁵⁻⁴⁰.

LIOFILIZACIÓN DEL PERICARDIO BOVINO TRATADO CON GLUTARALDEHÍDO

Después de la preparación del PBTG, éste fue cortado en tiras de 3 cm de ancho por 12 cm de largo. Estas fueron lavadas por 1 hora en solución salina (SS) (Solución de Cloruro de sodio al 0.9%, Pisa, Guadalajara, México) para retirar el exceso de glutaraldehído, posteriormente se colocaron en envases de cristal estériles y se congelaron durante una hora a -70 °C, posteriormente se liofilizaron con un vacío de 10 mBar a una temperatura de -55°C por un lapso de 4h. Terminada la liofilización, cada muestra de pericardio bovino tratado con glutaraldehído liofilizado (PBTGL) se empaquetó, esterilizó con gas (Sterrad, Low-temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilizing process, Johnson & Johnson Medical, Inc New Brunswick, NJ, USA) y almacenó a temperatura ambiente hasta que fueron utilizados³⁹. Después de rehidratarlos por 30 minutos con SS y antes de su colocación durante la timpanoplastía se tomó una muestra para cultivo microbiológico.

Se realizó control microbiológico de la solución de preservación y de los injertos de pericardio, sembrando las muestras en agar sangre y agar papa, para el aislamiento de posibles bacterias y hongos respectivamente. Los cultivos se

incubaron a 35°C por 144-168 horas en condiciones de aerobiosis para su posterior recuento y diferenciación de colonias.

ANESTESIA

La anestesia en todos los grupos de estudio se llevó a cabo utilizando 0.05 mg de sulfato de atropina vía subcutánea y una mezcla de clorhidrato de xilacina (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Germany) (15 mg/kg) y clorhidrato de ketamina (Ketavet, Fort Dodge, Iowa, USA) (40 mg/kg) IM ⁴⁶. Acto seguido se rasuró y lavó con jabón quirúrgico la región a intervenir y se realizó la antisepsia de la zona con yodopovidona (Dermodine Solución, Dermodex S.A. de C.V.), posterior a esto cada animal fue colocado sobre la mesa de cirugía en posición decúbito lateral izquierdo y se procedió a la realización de la cirugía.

PRODUCCIÓN DE LA PERFORACIÓN DE LA MEMBRANA TIMPÁNICA (PM)

Se colocó al cobayo en decúbito lateral izquierdo, bajo visión microscópica, se realizó infiltración local en región de conducto auditivo externo (CAE) derecho en cuatro cuadrantes con xilocaína 2% con epinefrina 1:100000, se colocó otoscopio en conducto auditivo externo derecho, se realizaron lavados con jabón quirúrgico y solución estéril, se retiraron los restos epidérmicos y cerumen, se visualizó la MT, se realizó perforación total con bisturí, respetando cadena osicular, se verificó hemostasia y se dió por terminado el procedimiento. (Figura 4) Finalmente todos los animales recibieron en el postoperatorio Enrofloxacin a dosis de 5 mg/kg (IM) (Baytril, Bayer, Leverkusen, Germany) por 5 días como antibiótico y Megublina de Flunixin a dosis de 4 mg/kg (IM) (Napzin, Pisa Agropecuaria, Hidalgo, México) como analgésico por 5 días. Se permitió que los

cobayos se recuperaran de la anestesia en sus cajas y ahí se mantuvieron hasta la realización de la timpanoplastía y final del estudio.



Figura 4. Miringotomía en oído derecho de cobayo.

TIMPANOPLASTÍA Y COLOCACIÓN DE LOS INJERTOS DE FT O PBTGL

Tres meses después de haber realizado la perforación de la MT, todos los animales fueron nuevamente sometidos a anestesia (de la manera ya descrita) y se realizó la timpanoplastía con colocación de los injertos de la siguiente forma: Después de la realización de la antisepsia se colocó un otoscopio, se infiltró localmente la región del CAE derecho en cuatro cuadrantes con xilocaína 2% con epinefrina 1:100000 así como en abanico en la región del musculo temporal ipsilateral. Posteriormente en los grupos II y IV se llevó a cabo una incisión retroauricular horizontal a nivel de la línea temporal superficial de 2cm. Se disecó y tomó un segmento de de 1.5x1.5cm de la fascia de músculo temporal derecho, la cual se utilizó como injerto (Figura 5). En los grupos I y III se realizó incisión endaural con bisturí desde la unión osteocartilaginosa hasta nivel del trago. Acto seguido en todos los grupos se reavivaron los bordes de la perforación con pick de 90°, se colocó gelfoam embebido en solución salina 0.9% en el OM a través de la perforación y posteriormente se colocó el injerto de 5 x 5 mm de FT o PBTGL (dependiendo del grupo de estudio) (Figura 6), los cuales quedaron mediales a los remanentes y medial al mango del martillo, se colocó gelfoam en

el CAE y se concluyó con la sutura de la herida retroauricular o endaural, se verificó hemostasia y se dio por terminado el procedimiento. Todos los animales recibieron la misma antibioterapia y analgesia con la que fueron tratados después de la producción de la PM.



Figura 5. Toma de fascia temporal

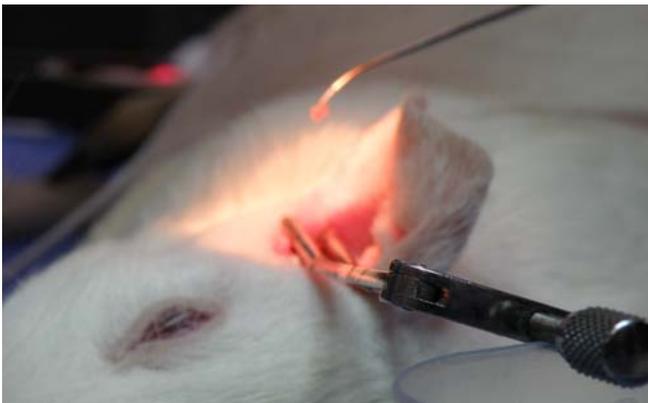


Figura 6. Colocación de injerto en sitio de perforación

EVALUACIÓN

Manejo quirúrgico de los injertos

Se evaluó de manera subjetiva por el cirujano el manejo quirúrgico de los materiales de acuerdo a su flexibilidad, facilidad para cortar y moldear (darle el tamaño y forma correcta), así como su facilidad para introducirse o retirarse del oído durante la cirugía.

Otoscópica

En los animales, el estudio tuvo una duración de 3 meses después de haberse producido la PM, posterior a dicho tiempo se realizó la timpanoplastía, pero fueron sometidos a fin de estudio (n=9) a la 4ª semana y 4 meses postcirugía, para evaluar las diferentes fases de la cicatrización de la MT con ambos materiales: FT y PBLTG

Se realizó evaluación otoscópica a la 4ª semana y 4 meses postcirugía. Dentro de esta se evaluó la integridad de la membrana timpánica (MT), presencia y grado de retracción de la MT y presencia de líquido transtimpánico.

La valoración de retracción de la MT se realizó mediante la escala descrita por Sadé y Berco ⁴⁷ y que se basa en el grado de retracción de la misma: Grado I: Membrana timpánica retraída, Grado II: Membrana timpánica en contacto con el yunque, Grado III: Membrana timpánica atelectásica y Grado IV: Membrana timpánica adhesiva.

Macroscópica

Macroscópicamente se evaluó la cavidad de oído medio, grado de inflamación e integración del injerto a la MT, así como la presencia de adherencias con la cadena osicular y cóclea, de acuerdo a la escala descrita por Olmos-Zúñiga et al. ⁴⁰ basada en la severidad de estas: Grado 0= sin adherencias, Grado 1= adherencias mínimas fácilmente despegables, Grado 2= adherencias completas fácilmente desplegadas y Grado 3= adherencias completas y firmes. Concluida esta evaluación, se procedió a la extracción de la MT.

Microscópica

Los animales fueron sometidos a diferentes tiempos de fin de estudio después de 3 meses de haberles producido la perforación de la membrana timpánica para evaluar la integración de los injertos a la MT. Estos tiempos fueron: 4 semanas y 4 meses posttimpanoplastía.

Concluido el tiempo de estudio los animales se sometieron a eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico (100mg/kg) (Anestesal, Pfizer, Estado de México, México) y se obtuvieron los huesos temporales, los cuales se fijaron durante 24 horas en formaldehído al 10%, posteriormente se retiró la MT y la mucosa del OM, fueron embebidos en parafina, se les realizaron cortes de 4 micras y se tiñeron con hematoxilina-eosina, tricrómica de Masson, así como con azul de toluidina y se evaluaron por microscopía de luz.

En el análisis de los hallazgos histológicos, se valoró la cicatrización e inflamación de la MT e integración de los injertos de la misma, estado de la mucosa del OM, presencia o no de timpanoesclerosis, vascularidad y grosor de la MT. Estos se evaluaron de acuerdo a las siguientes escalas:

La evaluación de la inflamación fue realizada de acuerdo a una escala semicuantitativa en la que cada parámetro evaluado recibió un porcentaje de acuerdo a la severidad de los cambios histológicos (0-10% ausente, 11-25% leve, 26-50% moderado, 51-100% severo). Mientras que la presencia de timpanoesclerosis fue evaluada de acuerdo a la cantidad de hueso neoformado (Timpanoesclerosis: Osteoclastica y esclerótica)¹¹: Grado 0 = Sin timpanoesclerosis, Grado 1 = Formación de timpanoesclerosis en MT, Grado 2 = Formación de timpanoesclerosis en oído medio. Grado 3: Formación de timpanoesclerosis en oído medio y MT.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Esta tesis fue aprobada para su realización el 09 Abril 2015 por el comité de ética e investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” siendo asignado el código B09-15.

Todos los animales fueron tratados de acuerdo a las Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana ⁴³ y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos ⁴⁴.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados con el programa SPSS 19.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), mediante la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Los valores de $p < 0.05$ se consideraran como significativos.

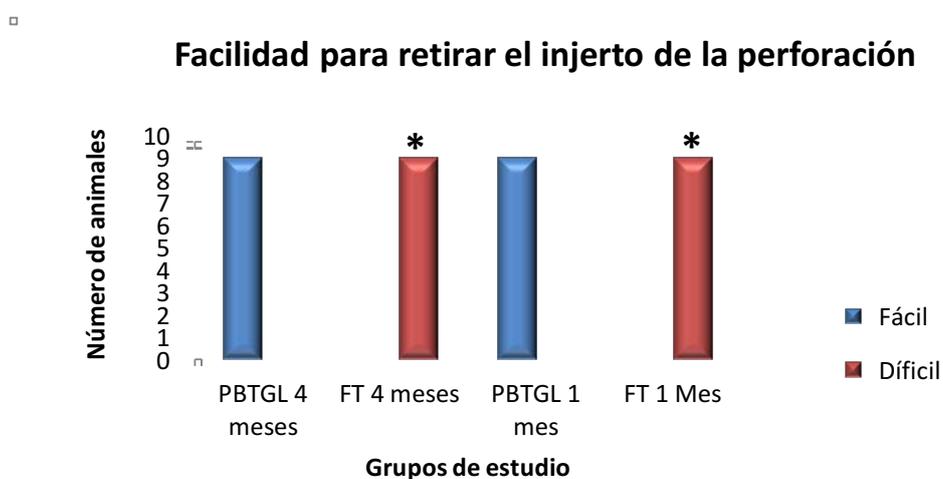
RESULTADOS

HALLAZGOS EN CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS

En el 100% de las muestras estudiadas los cultivos microbiológicos resultaron negativos, ya que no hubo crecimiento de hongos, levaduras ni bacterias en los medios de cultivo después de 15 días de incubación en aerobiosis.

HALLAZGOS DEL MANEJO QUIRÚRGICO DE LOS INJERTOS

Al comparar el manejo quirúrgico de ambos injertos, se observó que ambos tienen buena flexibilidad, son fáciles de cortar y moldear; sin embargo los de FT en caso de necesitarlo, son difíciles de retirar de la perforación ($p = 0.001$, Kruskal Wallis) (Gráfica 1).



Gráfica 1. Se observa el grado de dificultad para retirar el injerto de la perforación timpánica.

HALLAZGOS CLÍNICOS

Todos los animales sobrevivieron al tiempo de estudio establecido, sin ninguna complicación clínica aparente.

HALLAZGOS OTOSCÓPICOS

Otoscópicamente en ningún caso se observó la presencia de líquido transtimpánico, ni retracción de la MT. En todos los casos la MT se observó íntegra, pero en algunos casos engrosada y opaca (Figura 7).

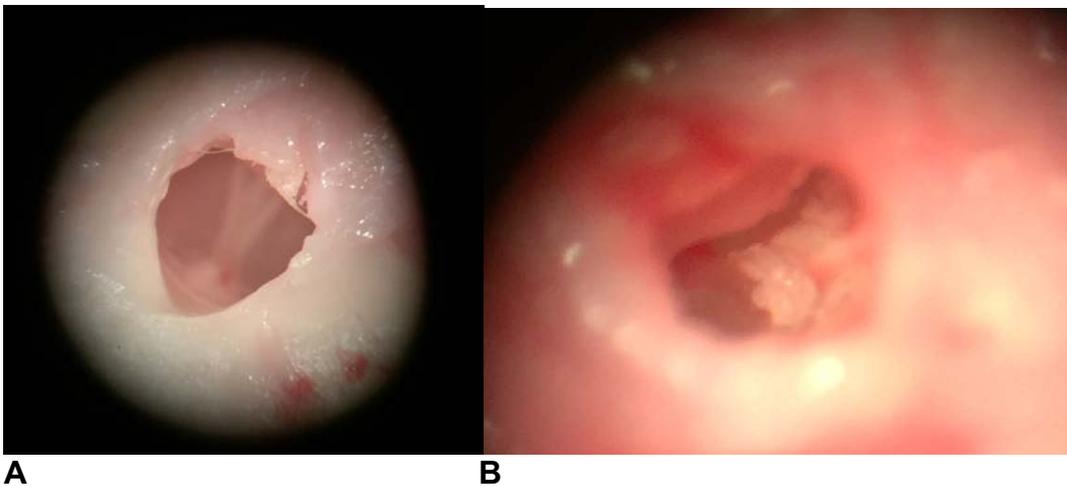


Figura 7. A) Se muestra la MT de cobayo izquierda control. **B)** Se muestra la MT de cobayo posterior a 4 meses de timpanoplastía con injerto de PBTGL, opaca y engrosada.

HALLAZGOS MACROSCÓPICOS

Macroscópicamente en los animales del grupo III, tres (33.3%) cobayos presentaron un material similar al material de empaque (Gelfoam) en la cavidad del OM, mientras que en el grupo IV, solo dos (22.2%) lo presentaron (Figura 8). Los animales de los grupos I y II que tuvieron un postoperatorio de 4 meses, ninguno presento (Figura 9). Sin embargo al comparar dentro de cada grupo y

entre grupos la presencia del material de empaque no fue significativa ($p > 0.05$, Chi cuadrada).

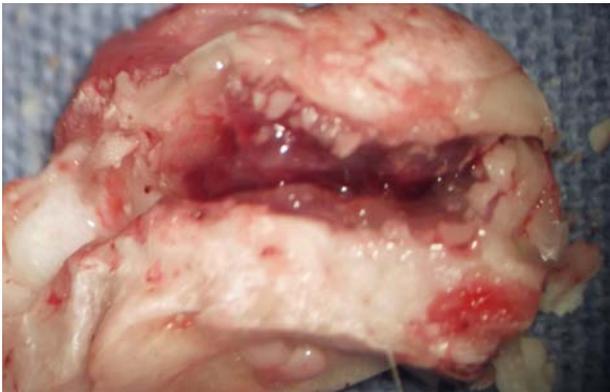


Figura 8. Cavidad de oído medio con restos de material de empaquetamiento posterior a 1 mes post cirugía.

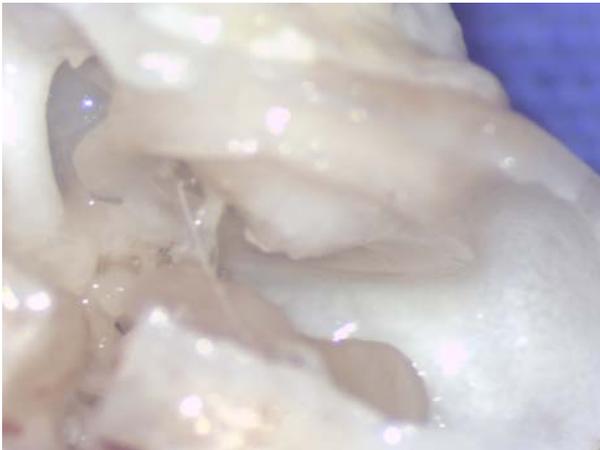


Figura 9. Cavidad de oído medio sin restos de material de empaquetamiento posterior a 4 meses post cirugía.

En todos los casos el injerto se observó bien integrado a la MT (Figura 10a y 10b); sin embargo 2 animales del grupo I, presentaron medialización parcial del injerto (Figura 11) (Gráfica 2) y en un caso se observó fibrosis en la cavidad del oído medio (Figura 12).

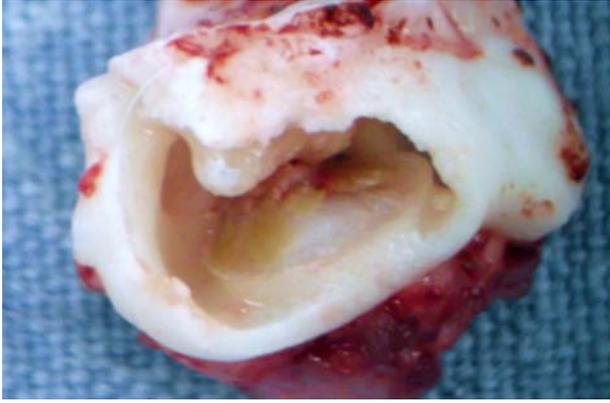


Figura 10a. Vista medial de la MT con injerto de PBTGL en oído derecho de cobayo con adecuada integración.



Figura 10b. Vista medial de la MT con injerto de FT en oído derecho de cobayo con adecuada integración.

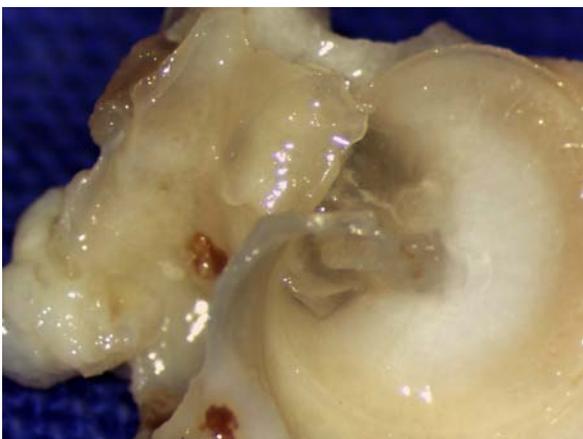
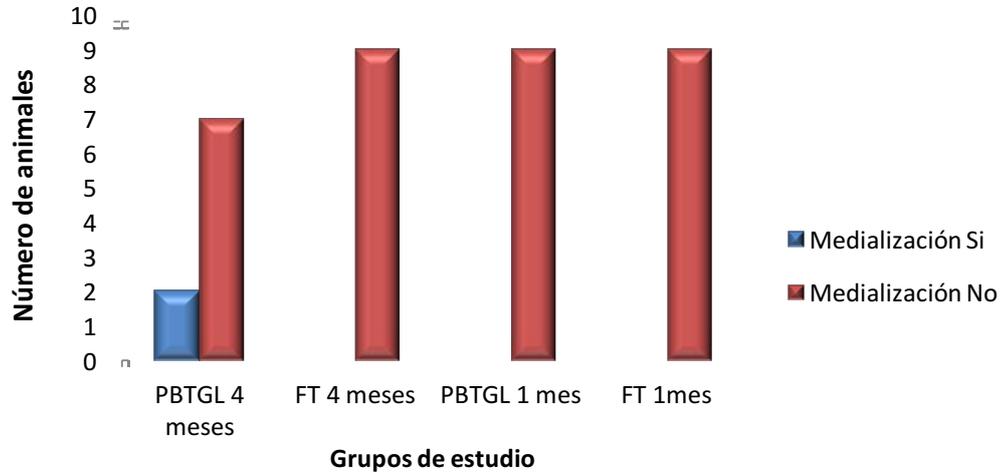


Figura 11. Vista medial de MT de cobayo con injerto de PBTGL parcialmente medializado.

□

Medialización del injerto al final del estudio



$p= 0.054$ chi cuadrada

Gráfica 2. Muestra la presencia de medialización en los animales del grupo I.

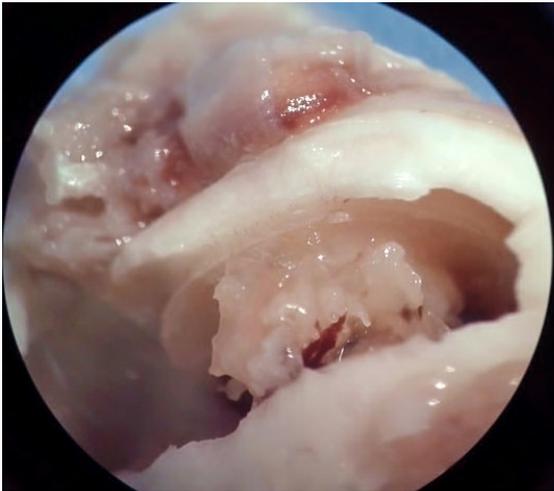
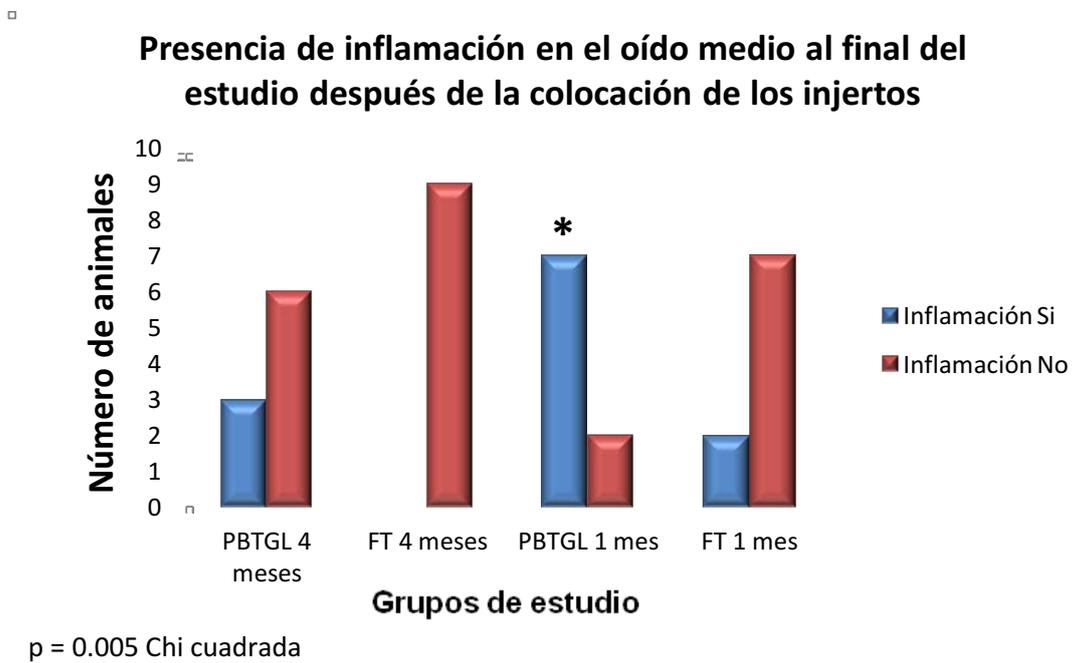


Figura 12. Vista medial de MT de oído derecho de cobayo con presencia de fibrosis en oído medio.

Con respecto a la presencia de inflamación se observó que los animales tratados con los injertos de PBTGL desarrollaron más en comparación con los de FT ($p = 0.005$ Chi cuadrada) (Figura 13) (Gráfica 3). El grado de inflamación mostrado

por estos animales fue predominantemente moderado ($p = 0.005$) Kruskal Wallis) (Gráfica 4)

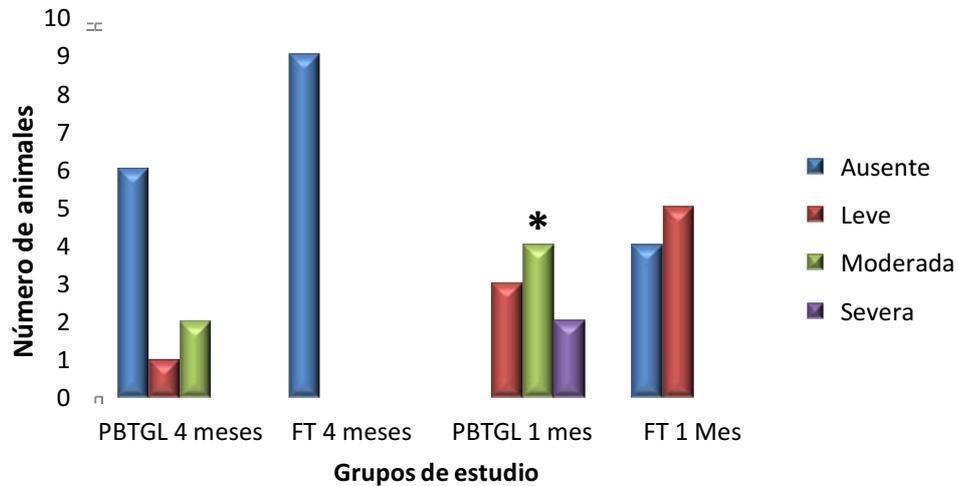


Gráfica 3. Se observa la mayor presencia de inflamación en los animales de los grupos I y III.



Figura 13. Cavidad de oído medio de un oído derecho de cobayo con presencia de tejido inflamatorio.

Grado de inflamación en el oído medio al final del estudio después de la colocación de los injertos



p = 0.005 Kruskal Wallis

Gráfica 4. Se observa presencia de inflamación moderada en los animales del grupo III, con una diferencia significativa en comparación con los otros grupos.

Por otro lado, en todos los animales tratados del grupo I, cinco (55.5%) animales desarrollaron adherencias grado 3 y tres (33.3%) desarrollaron adherencias grado 2 con la cadena osicular y cóclea. Mientras que en los del grupo III, 3 (33.3%) animales presentaron adherencias grado 1. En los animales tratados con FT, el grupo II 6 (66.6%) animales desarrollaron adherencias grado 1 y 3 (33.3%) grado 2. Mientras 2 (22.2%) animales del grupo IV desarrollaron adherencias grado 1 (Figura 14). Al comparar entre grupos se observó que la menor cantidad de adherencias desarrolladas por los grupos III y IV fue significativa vs los grupos I y II ($p < 0.001$ Kruskal-Wallis) (Gráfica 5).

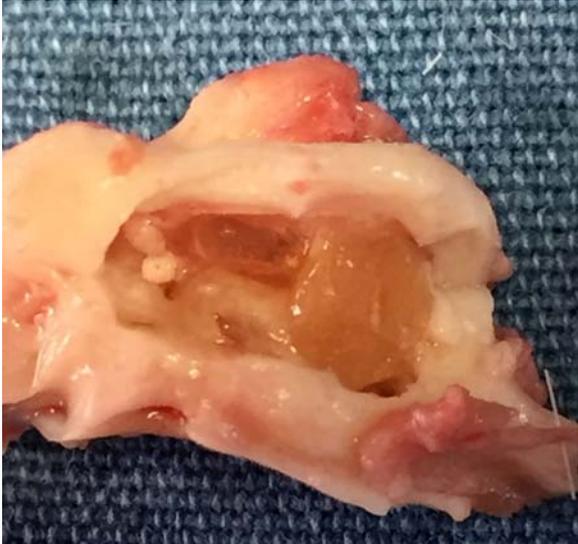
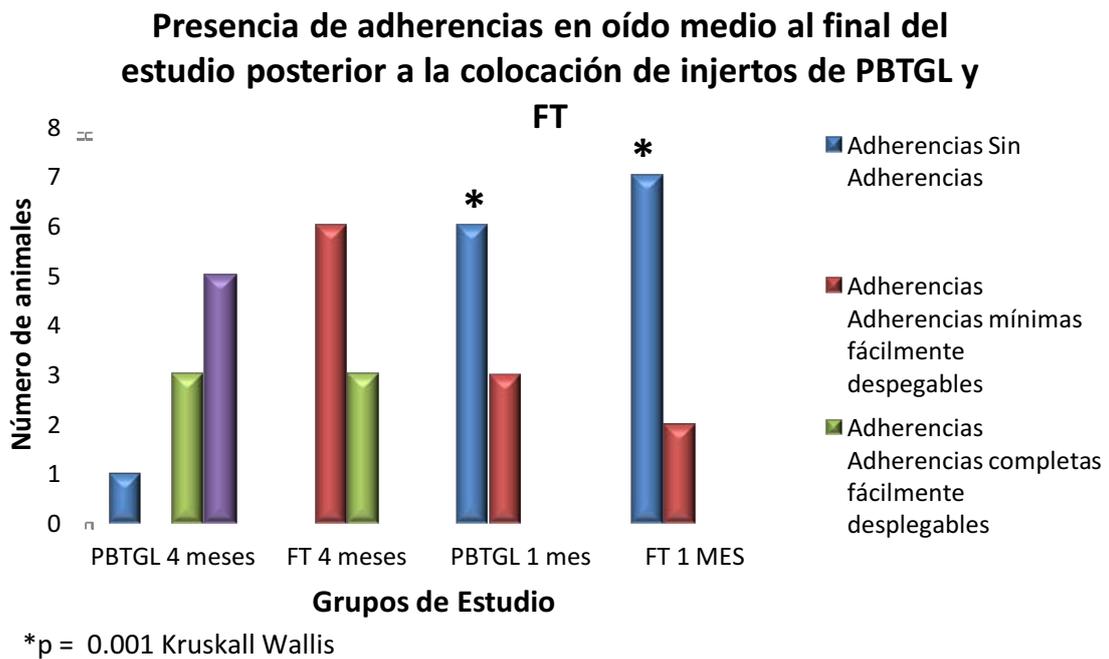


Figura 14. Cavidad de oído medio de un oído derecho de cobayo con presencia de adherencias grado 3.

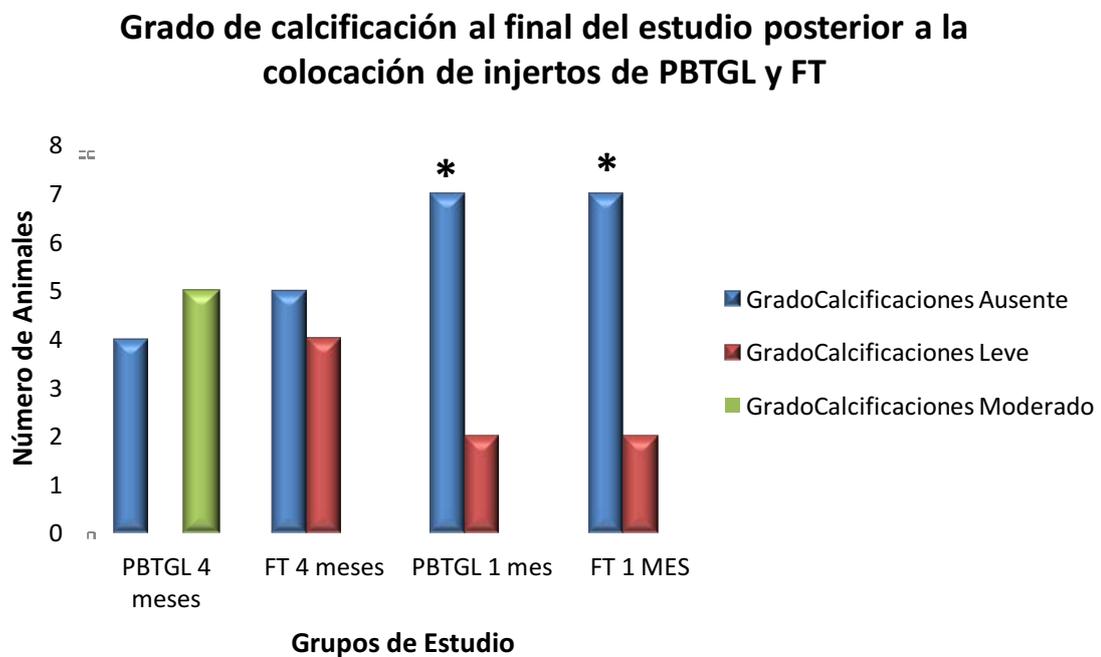
□



Gráfica 5. Se observa el grado de adherencias desarrolladas con la cadena oscicular y cóclea de los injertos de PBTGL y FT en los diferentes tiempos de estudio.

Otro hallazgo macroscópico observado, fue la presencia de calcificaciones sobre la MT y los injertos. En el grupo I 5 (55.5%) cobayos presentaron calcificaciones moderadas, en el grupo II, 4 cobayos leves y en los grupos III y IV, dos (22.2%) animales (respectivamente) presentaron calcificaciones leves. Al comparar la presencia de estas entre grupos no fue significativa. Sin embargo, el grado moderado de calcificaciones mostrado por el grupo I, fue significativo en comparación con los otros grupos de estudio ($p = 0.003$, Kruskal-Wallis) (Grafica 6)

□



* $p = 0.003$, Kruskal-Wallis

Grafica 6. * muestra el número que no desarrollaron calcificaciones.

DISCUSIÓN

A través del tiempo se han desarrollado diferentes técnicas que han mejorado los resultados de la timpanoplastía. La reparación quirúrgica de la MT y los injertos usados para este fin, han evolucionado a través del tiempo desde sus inicios en Alemania en 1952 con Wullstein y Zöllner⁴⁸. Dentro de los problemas críticos al inicio de la timpanoplastía, fue el encontrar un material adecuado como injerto de la MT. Esta evolución de los injertos se ha basado en tejidos biológicos de origen mesodérmico que contienen matriz de colágeno. La fascia temporal (FT) y el pericondrio continúan siendo los materiales más empleados hoy en día³⁴, pero para su obtención se requiere de producir otra lesión quirúrgica al paciente.

En la actualidad existen diferentes tipos de materiales usados como injertos y su elección se realiza con base en su capacidad de mantener su integridad estructural, química y mecánica, así como sus características necesarias que permitan su función sustituta, con un adecuado perfil de seguridad para el paciente²⁹. El pericardio bovino tratado con glutaraldehído es una bioprótesis que cumple con estas características y ha sido utilizado con buenos resultados clínica y experimentalmente³⁵⁻⁴⁰; por lo que el objetivo de este estudio fue comparar el uso, integración y cicatrización de los injertos de FT o PBTGL después de una timpanoplastía en cobayos.

Todos los cultivos microbiológicos realizados en las muestras de pericardio tomadas después del periodo de preservación inicial, liofilización y antes de su colocación en la MT fueron negativos debido a que el pH y tiempo de exposición al glutaraldehído hacen que este actúe como un agente bactericida, fungicida y

virucida. Esto coincide con lo reportado por García et al, al estudiar válvulas cardiacas biológicas y mencionan que en las concentraciones al 0.5% y exposiciones de 72 horas producen este efecto esterilizante⁵⁰. También coincide con lo descrito con otros autores que utilizaron este injerto como injerto de cuerdas vocales⁵¹.

La buena flexibilidad, facilidad para cortar, dar forma y tamaño adecuado para introducirlos y retirarlos de la MT, mostrada por los injertos de PBTGL fue debido a que se utilizó el pericardio fibroso (capa externa del pericardio) que está formado por fibras de colágena laminada, las cuales después de ser tratadas con glutaraldehído sufren cambios en las aminos primarias de los residuos de lisina e hidroxiprolina y forman enlaces cruzados inter e intramolecular de sus cadenas^{50,52,53}, lo que le mejora su estabilidad bioquímica (permitiendo que sus fibras elásticas y de colágena se mantengan bien organizadas), resistencia y permite que conserven su forma (ya que los hace más rígidos)^{35,37,38}. Por otro lado la FT, es difícil de retirar, en caso de que esto sea necesario, debido a que no tiene una consistencia como la que adquiere el PBTGL después de su tratamiento y además porque aunque se deshidrate previo a su colocación (para darle rigidez), al insertarse en la perforación, se humedece y pierde su consistencia⁵⁴. Otra de las ventajas que se observó a favor del PBTGL como injerto es que no requiere de un abordaje para la toma del mismo, lo cual disminuye el tiempo quirúrgico y la morbilidad del paciente, dicha ventaja es proporcionada también por los injertos sintéticos, sin embargo el costo de esto los hace inaccesibles en muchas ocasiones. Además de que el PBTGL podría ser utilizado en pacientes con cirugías previas a quienes se les haya tomado injerto de FT previamente.

Otoscópicamente en ningún caso de este estudio se observó la presencia de líquido transtimpánico, ni retracción de la MT. En todos los casos la MT se observó íntegra pero engrosada y opaca en algunos. La opacidad de la MT que se presentó probablemente fue provocada porque el contacto íntimo que produce el material de empaquetamiento ocasiona mayor inflamación y formación de tejido cicatrizal como lo reportaron Hellstrom⁵⁵, Bahadir⁵⁶ y Julian⁵⁷ después de comparar el uso de la esponja de gelatina absorbible sola, con esteroides y con ácido hialurónico como materiales para empaquetamiento del OM. Los resultados de este estudio también coincide con lo citado por Kutluhan⁵⁸ y Amoils⁵⁹ quienes utilizaron la esponja de gelatina absorbible en modelos experimentales de empaquetamiento del OM, así como para el tratamiento de MT perforadas y observaron que este material en la MT actúa como cuerpo extraño provocando mayor inflamación, lenta reorganización de las capas fibrosas y lenta orientación de las fibras de colágena, provocando la formación de áreas opacas de color grisáceo en el sitio en donde se encuentra el tejido cicatrizal.

En cuanto a la integración y cierre de la MT en la literatura reportan una tasa de cierre de alrededor del 80% con FT en humanos²⁸, en este estudio encontramos una tasa de éxito del 100% para ambos injertos, tanto a 1 mes como a los 4 meses postcirugía.

En cuanto a los tres cobayos del grupo III y dos del grupo IV que presentaron un material similar al material de empaque (Gelfoam) en la cavidad del OM, esto puede ser debido a que, como lo reportó Liening et al⁶⁰ la esponja de gelatina absorbible (Gelfoam) al humedecerse incrementa y mantiene su volumen por

semanas o meses, lo que favorece el crecimiento de fibroblastos entre la MT y el promontorio o entre el promontorio y la masa osicular.

Se presentó un caso de fibrosis en la cavidad del oído medio, lo cual puede ser atribuido al uso de esponja de gelatina absorbible, ya que diversos autores han reportado la presencia de fibrosis y vasos de neoformación después del empaquetamiento del OM con esta tanto en oídos sanos como en los que se les lesiono la mucosa ^{61,55,56,62-64}.

CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos que el PBTGL es un material biológico que puede ser utilizado como injerto timpánico; obtuvimos un porcentaje de cierre similar al patrón de referencia (fascia temporal) y no aparecieron complicaciones al seguimiento a corto y mediano plazo.

Así mismo, con el uso de este material, por no requerir un abordaje adicional para obtenerlo como injerto, podría reducirse el tiempo quirúrgico, así como la morbilidad del paciente que es sometido a una timpanoplastía, lo que a su vez se traduce en una reducción de costos hospitalarios.

Proponemos el uso de PBTGL como una nueva opción para su uso como injerto para timpanoplastía.

Hacen falta estudios complementarios para determinar, mediante seguimiento timpanométrico, las propiedades biofísicas del injerto y evaluar el comportamiento del injerto a largo plazo y su uso en humanos.

ANEXOS

ANEXO 1 APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL
DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
ISMAEL COSÍO-VILLEGAS

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

México D. F. a 09 de Abril de 2015
INER/CEI/107/15

Dra. Lisette Cristerna Sánchez
Investigador Principal

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN.
APROBACIÓN.

Título del Proyecto: COMPARACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DE LOS INJERTOS DE PERICARDIO BOVINO TRATADO CON GLUTARALDEHÍDO LIOFILIZADO Y FASCIA TEMPORAL EN LA TIMPANOPLASTÍA. ESTUDIO EXPERIMENTAL.

Código asignado por el Comité: **B09-15**

Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

	Nº y/o Fecha Versión	Decisión
Protocolo	Versión 1, Febrero 2015	APROBADO

Este protocolo tiene vigencia de abril 2015 a abril 2017.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia. El Comité dispone en su página electrónica de un formato estándar que podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.

Atentamente

Dra. Rocio Chapela Mendoza
Presidente del Comité

ANEXO 2 APROBACIÓN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL
DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
ISMAEL COSÍO VILLEGAS
INER
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

México D. F. a 09 de Abril de 2015
INER/CI/086/15

Dra. Lisette Cristerna Sánchez
Investigador Principal

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN.
APROBACIÓN.

Título del Proyecto: COMPARACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DE LOS INJERTOS DE PERICARDIO BOVINO TRATADO CON GLUTARALDEHIDO LIOFILIZADO Y FASCIA TEMPORAL EN LA TIMPANOPLASTÍA. ESTUDIO EXPERIMENTAL.

Código asignado por el Comité: **B09-15**

Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

	Nº y/o Fecha Versión	Decisión
Protocolo	Versión 1, Febrero 2015	APROBADO

Este protocolo tiene vigencia de abril 2015 a abril 2017.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia. El Comité dispone en su página electrónica de un formato estándar que podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.

Atentamente

Dr. Joaquín Zúñiga Ramos
Presidente del Comité

REFERENCIAS

1. Rahman, Anisur. Healing of tympanic membrane perforations: an experimental study. Thesis of Otorhinolaryngol, Karolinska Institute and University Hospital, Stockholm, Sweden. 2007.
2. Francis HW. Anatomy of the Temporal Bone, External Ear, and Middle Ear. En Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery. Flint PW, Haughey BH, Lund VJ et al. 6th ed. Elseiver Saunders. Philadelphia USA, 2015; 1977-1986.
3. Junk TT, Hanson J. Classification of otitis media and surgical principles. Otitis media: Surgical Principles Based on Pathogenesis. Otolaryngologic Clinics North America. 1999; 32: 369-383.
4. Wareing MJ, Lalwani AK, Anvar AA, Jackler RK. Development of the Ear. En Bailey's Head and Neck Surgery Otolaryngology. Johnson JT, Rosen CA. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore USA, 2014; 2239-2252.
5. Araújo MM, Murashima AA, Alves VM, Jamur MC, Hyppolito MA. Spontaneous healing of the tympanic membrane after traumatic perforation in rats. Braz J Otorhinolaryngol 2014; 80: 330-338.
6. Zheng CL. Spontaneous Healing of Traumatic Eardrum Perforation: Outward Epithelial Cell Migration and Clinical Outcome. Otolaryngol Head Neck Surg. 2012; 147(6): 1114–1119
7. Barros BBC, Cruz de Andrade JS, Borborema GL. Micro-endoscopic ear anatomy of guinea pig applied to experimental surgery. Acta Cirúrgica Brasileira. 2014; 29: 7-11.
8. Şanlı A, Aydın S, Öztürk R. Microscopic guide to the middle ear anatomy in guinea pigs. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg. 2009; 19(2): 87-94.
9. Wang AY, Shen Y, Wang JT, et al. Animal models of chronic tympanic membrane perforation: A 'time-out' to review evidence and standardize design. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijporl.2014.10.007>.
10. Afolabi OA, Aremu SK, Alabi BS, Segun-Busari S. Traumatic Tympanic Membrane perforation: An aetiological profile. BMC Research Notes. 2009; 2: 232 doi:10.1186/1756-0500-2-232.

11. Lou ZC, He JG. A randomised controlled trial comparing spontaneous healing, gelfoam patching and edge-approximation plus gelfoam patching in traumatic tympanic membrane perforation with inverted or everted edges. *Clin Otolaryngol.* 2011 ; 36: 221-226.
12. Bluestone CD. Myringoplasty and Tympanoplasty. En Bluestone CD. Rosenfeld RM. *Surgical Atlas of Pediatric Otolaryngology.* Segunda edición. BC Decker Inc Hamilton, Ont, London. 2002; 39 – 73.
13. Guneri EA, Tekin S, Imaz OY, Ozkara E, Erdag TK, Ikiz AO, Sarioglu S, Guneri A. The Effects of Hyaluronic Acid, Epidermal Growth Factor, and Mitomycin in an Experimental Model of Acute Traumatic Tympanic Membrane Perforation. *Otol Neurotol.* 2003; 24: 371-376
14. Lou, ZC, Lou ZH, Zhang QP. Traumatic tympanic membrane perforations: a study of etiology and factors affecting outcome. *Am J Otol.* 2012; 33: 549-555.
15. Orji, FT, Agu CC. Determinants of spontaneous healing in traumatic perforations of the tympanic membrane. The Authors Journal compilation. Blackwell Publishing Ltd. *Clinical Otolaryngology.* 2008; 33: 420–426.
16. Lou ZC, Tang YM, Yang JA. A prospective study evaluating spontaneous healing of aetiology, size and type-different groups of traumatic tympanic membrane perforation. Blackwell Publishing Ltd • *Clinical Otolaryngology.* 2011; 36, 450–460.
17. Rogha M, Berjis N, Taherinia A, Eshaghian A. Comparison of tympanic membrane grafting medial or lateral to malleus handle. *Adv Biomed Res.* 2014; 3: 56
18. Dursun E, Dogru S, Gungor A, Cincik H, Poyrazoglu E, Ozdemir T. Comparison of paper-patch, fat, and perichondrium myringoplasty in repair of small tympanic membrane perforations. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 138: 353-356.
19. Salviz M, Bayram O, Bayram AA, et al. Prognostic factors in type I tympanoplasty. *Auris Nasus Larynx.* 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anl.2014.08.010>
20. Pinar E, Sadullahoglu K, Calli C, Oncel S. Evaluation of prognostic factors and middle ear risk index in tympanoplasty. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery.* 2008. 139; 386-390.

21. Vashishth A, Mathur NN, Choudhary SR, Bhardwaj A. Clinical advantages of cartilage palisades over temporalis fascia in type I tympanoplasty. *Auris Nasus Larynx*. 2014; 41: 422–427.
22. Adams ME, El-Kashlan H. Tympanoplasty and Ossiculoplasty. In: Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery. Flint PW, Haughey BH, Lund VJ et al. 6th ed. Elsevier Saunders. Philadelphia USA, 2015; 2177-2187.
23. Altuntas EE, Sümer Z. Biocompatibility evaluation of cigarette and carbon papers used in repair of traumatic tympanic membrane perforations: experimental study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013; 270: 81–86.
24. Saliba I, Woods O. Hyaluronic Acid Fat Graft Myringoplasty. *Laryngoscope*. 2011; 121: 375-380.
25. Vos JD, Latev MD, Labadie RF, Cohen SM, Werkhaven JA, Haynes DS. Use of AlloDerm in Type I Tympanoplasty: A Comparison with Native Tissue Grafts. *Laryngoscope*. 2005; 115: 1599-1602.
26. Eisenbeis JF, Herrmann BW. Areolar Connective Tissue Grafts in Pediatric Tympanoplasty: A Pilot Study. *Am J Otolaryngol* 2004; 25:79-83.
27. Callioğlu EE, Ceylan BT, Kuran G, Demirci S, Tulaci KG, Caylan R. Cartilage graft or fascia in tympanoplasty in patients with low middle ear risk index (anatomical and audological results). *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013; 270: 2833-2837.
28. Mohamed SH, Khan I, Hussain SSM. Is Cartilage Tympanoplasty More Effective Than Fascia Tympanoplasty? A Systematic Review. *Otol Neurotol*. 2012; 33: 699-705.
29. Qin H, Sun J, Jia Z. La Matriz Dérmica Acelular Es Útil para la Reconstrucción de la Membrana Timpánica. *Acta Otolaringol*. 2012; 132: 1266-1270.
30. Gallardo Ollerves FJ, Rodríguez Perales MA, Nuño Fuentes N. Miringoplastías con aloinjertos cutáneos acelulares (Alloderm®): Nueva alternativa para el manejo de las perforaciones timpánicas. *An ORL Mex*. 48: 30-38.
31. Sarac S, Gursel B. Use of Homograft Dehydrated Temporal Fascia in Tympanoplasty. *Otol Neurotol*. 2002; 23: 416-421.

32. de Dorlodot C, De Bie G, Deggouj N, Decat M, Gérard JM. Are bovine pericardium underlay xenograft and butterfly inlay autograft efficient for transcanal tympanoplasty. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015; 272: 327-331.
33. Sayin I, Hakan K, Ekizoglu O, Erdim I, Kayhan FT. A prospective controlled trial comparing spontaneous closure and Epifilm patching in traumatic tympanic membrane perforations. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013; 270: 2857-2863.
34. Patil K, Baisakhiya N, Deshmukh PT. Evaluation of different graft material in type 1 tympanoplasty. *Indian J Otol.* 2014; 20:106-14.
35. Santillan-Doherty P, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Olmos R, Arreola JL, García D, Vanda B, Gaxiola M, Santibáñez A, Martin S, Cabello R. Thoracoabdominal wall repair with glutaraldehyde preserved bovine pericardium. *J Invest Surg.* 1996; 9: 45-55.
36. Olmos-Zuñiga JR, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola M, Cedillo-Ley I, Argote-Green M, Santillan-Doherty P. Suture line reinforcement with glutaraldehyde preserved bovine pericardium for non-anatomic of lung tissue resection. *J Invest Surg.* 2001; 14: 161-168.
37. Jasso-Victoria R, Olmos-Zuñiga JR, Gutierrez-Marcos LM, Sotres-Vega A, Manjarez-Velázquez, Gaxiola-Gaxiola M, Avila-Chavez A, Avendaño-Moreno G, Santillan-Doherty P. Usefulness of bovine pericardium as interpositional graft in the surgical repair of nasal septal perforations (Experimental study). *J Invest Surg.* 2003; 16: 209-217.
38. Santibáñez-Salgado JA, Olmos-Zuñiga JR, Pérez-López M, Aboitiz-Rivera C, Gaxiola-Gaxiola M, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Baltazares-Lipp M, Pérez-Covarrubias D, Villalba-Caloca J. Lyophilized glutaraldehyde-preserved bovine pericardium for Experimental atrial septal defect closure. *European Cells and Materials.* 2010; 19: 158-165.
39. Olmos-Zuñiga JR, Dorantes I, Avila A, Jasso-Victoria R, Gaxiola-Gaxiola M, Sotres A, Hernández C, Ramírez A, Santillan-Doherty P. Pericardio bovino tratado con glutaraldehído y liofilizado como materiales para la medialización de cuerdas vocales. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2013; 64: 37-44.

40. Olmos-Zuñiga JR, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola MO, Argote-Green LM, Lara-Guerra H, Santillan-Doherty P. Evaluación de la utilidad del pericardio bovino en resecciones pulmonares no anatómicas en perros. *Rev Inv Clín.* 2002; 54: 334-341.
41. INEGI estadísticas de salud en establecimientos particulares 2013. Morbilidad y Mortalidad. Morbilidad por egreso hospitalario y entidad federativa en hospitales generales y de especialidad según sexo, días de estancia y defunciones 2013. Cuadro 4.3. 2014
42. INER Bioestadística. Cirugías otorrinolaringología 2013. Tabla V. 2014
43. Estados Unidos Mexicanos. AFÍA. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación 6 dic, 1999.
44. National Institutes of Health U.S.A. Guía Para el Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health U.S.A. Edición Mexicana Auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. México, D.F. 2002.
45. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain.* 2011; 7:55
46. Academy of Surgical Research. Course of Animal Anesthesia and Models. Memories of the Course of Animal Anesthesia and Models of the 12th Annual Meeting and 1ST International Conference of the Academy of Surgical Research; October 1996: Muenster, Germany. Academy of Surgical Research, 1996.
47. Chole RA, Sudhoff HH. Chronic otitis media, mastoiditis and petrositis. En Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery. CW, Flint PW, Harper LA, Haughey BH et al. 4th ed. Elseiver Mosby Philadelphia USA, 2005; 2988-3012.
48. Mudry A. History of myringoplasty and tympanoplasty type I. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery.* 2008; 139: 613-614.

49. Girón-Archundia E, Zárate-García RA, Núñez-Sánchez E, Vargas-Zavala C. Uso de biomateriales como injertos para timpanoplastia tipo I. *An Orl Mex.* 2015; 60: 221-229.
50. García JM, Herrero J, Castillo JL. Prótesis cardíacas biológicas. Nuevas estrategias," en *Tratado de Cirugía Vascul.* Tellez de Peralta G, Ed., pp. 820–828, Díaz Santos, Madrid, España, 1998.
51. Olmos-Zuñiga JR, Jasso-Victoria R, Gaxiola-Gaxiola M, Sotres-Vega A, Hernández-Jiménez C, Baltazares-Lipp M, Arredondo del Bosque FM, Santillan-Doherty P. Comparison of lyophilized glutaraldehyde-preserved bovine pericardium with different vascular prostheses for use as vocal cord implants. *Experimental study. BioMed Research Int.* Volume 2015, Article ID 351862, 9 pages. ISSN: 2314-6141. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. Volume 2015, Article ID 351862, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/351862>.
52. Roe S, Milthorpe BK, Schindhelm K. Collagen Cross-Linking and Resorption: Effect of Glutaraldehyde Concentration. *Artif Organs.* 1990; 14: 443-448.
53. Ford CN, Staskowski PA and Bless DM. Autologous collagen vocal fold injection: A preliminary clinical study. *Laryngoscope,* 1995; 105: 944-948.
54. Bhardwaj V, Verma R, Puri S. Novel method of drying temporalis fascia graft for tympanomastoid surgery. *Indian J Otol* 2013;19:66-7.
55. Hellstrom S, Salen B, Slenfors LE. Absorbable gelatin sponge (Gelfoam) in otosurgery: one cause of undesirable postoperative results? *Acta Otolaryngol* 1983; 96: 269-75.
56. Bahadir O, Aydin S, Caylan R. The effect on the middle ear cavity of an absorbable gelatine sponge alone and with corticosteroids. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003; 260: 19-23.
57. Julian M, Alava I, Angeli S, Van de Water T. Middle ear parking: comparison between merogel and gelfoam. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 31(2S1): P102.
58. Kutluhan A, Ugras S, Inalkac E, Akpolat N. The effects of hyaluronic acid on myringoplasty in rats. *Tr J of Med Scien* 1999, 29: 401-7.

59. Amoils CP, Jackler RK, Milczuk H, Nelly KE, Cao K. An animal model of chronic tympanic membrane perforation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 106: 47-55.
60. Liening D, Lundy L, Silberberg B, Finstuen K. A comparison of the biocompatibility of three absorbable hemostatic agents in the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 116: 454-7.
61. Park AH, Jackson A, Hunter L McGill L, Simonse SE, Alder SC, Zheng XZ. Cross-Linked Hydrogels for middle Ear parking. *Otol Neurotol* 2006; 27: 1170-5.
62. Drogu S, Haholu A, Gungor A, kucukodaci Z, Cincik H, Ozdemir T, Sen H. Histologic analysis of the tree different support materials within rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 140: 177-82.
63. Jang Ch, Park H, Cho YB, Choi Ch. The effect of interceed for reducing adhesión as a middle ear parking agent: an experimental study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008; 72: 1517-21.
64. Jang CH, Park H, Bum Cho Y, Hee Choi Ch. The effect of anti-adhesive packing agents in the middle ear of guinea pig. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008; 72: 1603-8.