



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

“CAMBIOS EN LA BIOPELÍCULA EN LA OTITIS MEDIA CRÓNICA  
COLESTEATOMATOSA EN NIÑOS POSTERIOR A LA APLICACIÓN DE 2-  
MERCAPTOETANOSULFONATO DE SODIO (MESNA)”.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALISTA EN:

OTORRINOLARINGOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA

DRA. MARISOL HUANTE GUIDO

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS DE LA TORRE GONZÁLEZ



Ciudad de México, Febrero 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## HOJA DE FIRMAS

---

DRA. REBECA GÓMEZ CHICO VELASCO  
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO DR. FEDERICO GÓMEZ

### TUTORES



---

DR. CARLOS DE LA TORRE GONZÁLEZ  
JEFE DE SERVICIO DEL DEPARTAMENTO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA  
PEDIÁTRICA  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO DR. FEDERICO GÓMEZ



---

DRA. NORMA VELÁZQUEZ GUADARRAMA  
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA INTESTINAL  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO DR. FEDERICO GÓMEZ



---

DRA. en C. GABRIELA TERCERO QUINTANILLA  
PSICÓLOGA ADSCRITA AL DEPARTAMENTO DE PSIQUIATRÍA  
Y MEDICINA DEL ADOLESCENTE  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO DR. FEDERICO GÓMEZ

## DEDICATORIAS

A Dios, porque eres mi guía en cada decisión.

A mis padres, su apoyo y amor incondicionales son el motor de mi vida.

A mi hermana, eres la luz de mi camino y mi alegría más grande.

Al Dr. Carlos de la Torre, gracias por su pasión y entrega en este proyecto, gracias por sus enseñanzas durante mi estancia en la residencia.

Al Dr. Neri, Dra. Álvarez y Dr. Aguilar †, cada momento a su lado ha sido de aprendizaje.

A mis compañeros de residencia, por su amor y cariño.

A Madeleine, por tu amor y apoyo infinito.

A la Dra. Norma Velázquez, gracias por su entrega en este proyecto y por hacerlo posible.

A la Dra. Gabriela Tercero, al Dr. Genaro Patiño y a Rosalba, gracias por su apoyo para la realización de este trabajo.

A mis familiares y amigos, porque han sido parte de cada triunfo, gracias por su paciencia y amor.

## ÍNDICE

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
3. Antecedentes.....	6
4. Marco teórico.....	8
5. Planteamiento de problema.....	15
6. Pregunta de investigación.....	16
7. Justificación.....	16
8. Hipótesis.....	16
9. Objetivo general.....	17
10. Metodología.....	17
11. Resultados.....	22
12. Discusión.....	36
13. Conclusiones.....	38
14. Limitaciones del estudio.....	38
15. Cronograma de actividades.....	39
16. Referencias bibliográficas.....	40
17. Anexo.....	43

## 1. RESUMEN

**Introducción:** Se considera al colesteatoma en población pediátrica como una enfermedad de difícil manejo ya que su comportamiento biológico difiere respecto a la población adulta en términos de agresividad y recurrencia. Diversos estudios experimentales han demostrado la presencia de biopelículas asociadas al colesteatoma lo cual plantea retos para su manejo ya que no sólo tienen un papel en la patogénesis y progresión de la enfermedad, sino también existe mayor dificultad para erradicar las infecciones asociadas. Lo anterior ha llevado al interés en utilizar terapias no antimicrobianas que tengan impacto sobre la estructura o composición de las biopelículas.

**Objetivo:** Evaluar los cambios que ocurren en la biopelícula del colesteatoma de pacientes pediátricos posterior a la aplicación de 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA).

**Métodos:** Se incluyeron pacientes pediátricos con otitis media crónica colesteatomatosa operados de mastoidectomía primaria o de revisión en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil de México Federico Gómez entre enero 2016 y mayo 2017. Durante la cirugía se tomaron muestras basales del colesteatoma y del tejido posterior a la colocación de MESNA al 4% durante 10 minutos. Las muestras fueron procesadas para su observación con microscopio láser confocal.

**Resultados:** Se incluyeron 10 pacientes, 8 del sexo masculino y 2 del sexo femenino, con una mediana de edad de 10 años y un rango de 6 a 17 años.

A 9 pacientes se les realizó cirugía primaria y a uno mastoidectomía de revisión.

Todas las muestras fueron observadas y analizadas mediante microscopía láser confocal identificándose en todas ellas estructuras compatibles con biopelículas bacterianas. El hallazgo más relevante fueron los cambios en la estructura de la biopelícula posterior a la aplicación de MESNA tales como disgregación y separación del tejido subyacente.

**Conclusión:** Este es el primer estudio experimental que evalúa y demuestra cambios en la estructura de la biopelícula bacteriana asociada al colesteatoma posterior a la aplicación de MESNA.

## 2. INTRODUCCIÓN

La otitis media crónica (OMC) es un padecimiento frecuente en la edad pediátrica. El término describe una variedad de signos, síntomas y hallazgos físicos que son el resultado del daño crónico al oído medio por procesos infecciosos e inflamatorios e incluyen<sup>1</sup>:

- Perforación de la membrana timpánica.
- Retracción de la membrana timpánica.
- Atelectasias.
- Erosión de la cadena osicular.
- Otorrea crónica o recurrente.
- Tejido de granulación en el oído medio.
- Colesteatoma

El colesteatoma se define como un tejido en el oído medio formado por una matriz formada por epitelio escamoso queratinizante, una perimatrix consistente en tejido conectivo subepitelial y detritus de queratina.<sup>2</sup>

El comportamiento biológico del colesteatoma en niños difiere respecto a población adulta. En pacientes pediátricos suele tener un patrón de crecimiento agresivo y mayores tasas de recurrencia que en adultos.<sup>3</sup>

En años recientes las investigaciones han aportado información relevante acerca del papel de las infecciones en la patogénesis y progresión del colesteatoma, destacando la identificación de biopelículas bacterianas en la otitis media y en el colesteatoma.<sup>4</sup>

La importancia de conocer la composición microbiológica y el comportamiento biológico de las biopelículas bacterianas radica en su potencial resistencia y tolerancia al manejo antimicrobiano lo cual representa un reto en el tratamiento del colesteatoma en población pediátrica.

La dificultad para erradicar las infecciones asociadas a biopelículas con antibioticoterapia sistémica ha llevado al interés en utilizar terapias no antimicrobianas que tengan un impacto sobre la estructura o composición de la misma.<sup>5</sup>

### 3. ANTECEDENTES

Se ha demostrado que las biopelículas son factores importantes en un número significativo de infecciones; el arquetipo de una infección por biopelícula es la colonización por *Pseudomonas* en la fibrosis quística.<sup>6</sup>

Diversos autores propusieron que la otitis media con derrame estaba asociada a agregados bacterianos adheridos a la mucosa del oído medio en lugar de organismos libres, por ello Post en el año 2001 realizó un estudio experimental para comprobar dicha hipótesis ya que hasta la fecha ningún estudio había logrado recolectar evidencia objetiva en las investigaciones. Utilizando como modelo animal a la chinchilla se indujo otitis media experimental a través de la inyección transtimpánica de cepas de *H. influenzae* para posteriormente analizar las muestras de mucosa de oído medio mediante microscopía electrónica, observando la presencia de biopelículas bacterianas en todas ellas. Los hallazgos del autor reforzaron la hipótesis de que la otitis media con derrame es un padecimiento asociado a agregados bacterianos los cuales suelen ser resistentes al manejo antibiótico y son difícilmente identificados con técnicas de cultivo estándar.<sup>7</sup>

Una de las características fundamentales del colesteatoma de oído medio es la infección crónica y recurrente la cual es altamente resistente al manejo antimicrobiano tópico y sistémico. La otorrea crónica es un signo clásico cuando el colesteatoma se encuentra infectado y suele remitir con manejo antibiótico tópico y sistémico, sin embargo es común la recurrencia del proceso infeccioso.<sup>6</sup>

En el 2002 Chole y colaboradores propusieron que el colesteatoma es un tejido con un microambiente ideal para el desarrollo de biopelículas bacterianas. Estos investigadores realizaron un estudio en el que evaluaron las características histomorfológicas de 24 muestras de colesteatoma humano infectado y de 22 de colesteatoma inducido experimentalmente en gerbiles. Las muestras fueron analizadas mediante microscopía de luz y electrónica de transmisión observando en 21 de 22 muestras experimentales y en 16 de 24 muestras humanas la presencia de agregados bacterianos Gram positivos y Gram negativos con depósitos de matriz de polisacáridos compatibles con biopelículas.<sup>6</sup>

Una de las diferencias del colesteatoma en población pediátrica respecto a la del adulto es su comportamiento clínico el cual suele ser más agresivo e invasivo y con mayores tasas de recidiva. Algunos autores han propuesto que la composición histopatológica es uno de los factores decisivos para dicho comportamiento<sup>3</sup> sin embargo, publicaciones recientes sugieren que las biopelículas bacterianas tienen un papel fundamental en la resistencia antimicrobiana, cronicidad, recurrencia y agresividad de la enfermedad.<sup>4</sup>

El objetivo de la cirugía del colesteatoma es erradicar la enfermedad, sin embargo, uno de los grandes problemas en población pediátrica es la tasa de recidiva publicada en la literatura reportándose desde un 30% hasta un 70% dependiendo del método estadístico utilizado.<sup>8</sup>

Las altas tasas de recidiva motivaron a diversos autores a proponer técnicas adicionales para el manejo del colesteatoma, siendo Kluyskens en 1979 uno de los primeros en realizar un estudio experimental en el que observó mediante inmunohistoquímica la ruptura de las capas de queratina del colesteatoma con la aplicación local de N-acetilcisteína, proponiendo el término "disección químicamente asistida".<sup>9</sup>

Yilmaz en el 2004 publicó el primer estudio con el empleo de un compuesto conocido como 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) en pacientes con bolsas de retracción y otitis media adhesiva, observando lisis de las adherencias entre la mucosa del oído medio y la membrana timpánica con lo que se facilitaba su lateralización.<sup>10</sup>

Basados en los hallazgos anteriores, Kalcioglu y Vicenti publicaron la efectividad del MESNA en el colesteatoma residual observando tasas significativamente menores en los grupos de tratamiento. Gracias a sus observaciones se comprobó que este medicamento fragmenta las capas de queratina facilitando la disección quirúrgica.<sup>11,12</sup>

En el 2016 en el servicio de Otorrinolaringología Pediátrica del Hospital Infantil de México se realizó un estudio prospectivo para determinar la utilidad de la aplicación del MESNA durante la mastoidectomía en pacientes pediátricos con otitis media crónica colesteatomatosa y evaluar los cambios que produce en la matriz del colesteatoma mediante microscopía óptica y electrónica. La población de estudio se dividió en 5 pacientes a quienes se les aplicó MESNA al 4% y 5 con el medicamento a una concentración del 10%; a cada paciente se le tomaron muestras a los 5, 10 y 15 minutos posterior a su aplicación. Se demostraron cambios en la estructura del colesteatoma (separación de láminas de queratina y desorganización de su estructura) que fueron independientes de la concentración, siendo notorios a partir de los 5 minutos y más pronunciados a partir de los 10 minutos.<sup>13</sup>

#### 4. MARCO TEÓRICO

El término colesteatoma fue utilizado por primera vez por Muller en 1838.<sup>14</sup> Esta entidad corresponde a un subtipo de otitis media crónica y en población pediátrica tiene una incidencia mundial de aproximadamente 5-15 casos por cada 100,000 niños.<sup>15</sup>

Dentro de las poblaciones en riesgo, tenemos a aquellas con trastornos otológicos crónicos, síndrome de labio y paladar hendido y síndromes craneofaciales, entre otros.<sup>14</sup>

El colesteatoma se clasifica en 2 categorías generales: congénito y adquirido.<sup>2</sup>

1. Colesteatoma congénito: se define como un tejido quístico de epitelio escamoso queratinizante localizado medial a la membrana timpánica intacta. Se asume que está presente al nacimiento, sin embargo, generalmente es diagnosticado durante la infancia en pacientes sin un historial de otorrea, perforación timpánica o cirugía otológica previa. La presentación clínica está determinada por la localización y extensión de la lesión siendo lo más común una masa blanquecina medial a la membrana timpánica que se acompaña de hipoacusia y en casos excepcionales de dolor. Tiene una incidencia aproximada de 0.12 casos por cada 100,000 niños.<sup>14</sup>
2. Colesteatoma adquirido: se presenta clínicamente con signos y síntomas que reflejan el crecimiento y destrucción de los tejidos adyacentes, tales como perforación o retracción timpánica, otorrea e hipoacusia de forma general.

El colesteatoma adquirido se subdivide en primario y secundario<sup>14</sup>:

- a) Primario: se presenta sin evidencia de perforación o infección preexistente, también es llamado colesteatoma de ático por su localización en la *pars flácida*.
- b) Secundario: incluye aquellos colesteatomas que son el resultado de perforaciones o infecciones traumáticas o iatrogénicas; característicamente se encuentran en la *pars tensa*.

En los últimos 40 años se ha observado una disminución en la incidencia del colesteatoma adquirido en niños; el factor más estudiado para explicar este fenómeno es la introducción de los tubos de ventilación transtimpánicos y su uso a nivel mundial.<sup>14</sup>

La patogénesis del colesteatoma adquirido ha sido debatida por más de un siglo y en la actualidad se aceptan 4 teorías básicas acerca de su origen.<sup>16</sup>

1. Invaginación de la membrana timpánica (bolsa de retracción).
2. Hiperplasia de células basales.
3. Migración epitelial a través de una perforación (teoría de la migración).
4. Metaplasia escamosa del epitelio del oído medio.

La descripción histológica del colesteatoma fue realizada en 1972 por Lim y Saunders como un epitelio escamoso estratificado queratinizado con 4 capas idénticas a la epidermis normal, células de Langerhans y gránulos de queratina. Este epitelio corresponde a la matriz del colesteatoma. La perimatriz consiste en tejido conectivo que contiene fibras de colágena, fibrocitos, células inflamatorias y procesos de angiogénesis.

Los procesos infecciosos locales alteran los mecanismos de autolimpieza desencadenando una acumulación de detritus celulares y queratinocitos dentro de la bolsa de retracción, seguido de una migración de células inmunes (células de Langerhans, células T, macrófagos, etc.). El resultado de este proceso es un desbalance y un círculo vicioso de proliferación epitelial, diferenciación y maduración de queratinocitos, así como una alteración en los mecanismos de limpieza.

Una vez que ocurre el proceso infeccioso, las bacterias acumuladas expresan antígenos que, junto con los estímulos inflamatorios, inducen proliferación epitelial acompañada de expresión de enzimas líticas y citocinas; éstas producen activación y maduración de osteoclastos con la consecuente degradación de la matriz ósea extracelular, reabsorción ósea y finalmente progresión de la enfermedad.<sup>4</sup>

El manejo del colesteatoma es quirúrgico y el objetivo de la cirugía es la erradicación de la enfermedad. Uno de los principales problemas en población pediátrica es la elevada tasa de recidiva cuando se compara con población adulta (30-70%).<sup>8</sup>

Se han propuesto diversos factores para explicar los altos índices de recidiva, entre ellos:

- Técnica quirúrgica
  - Dodson y colaboradores realizaron un estudio en población pediátrica para evaluar enfermedad residual y recidiva del colesteatoma comparando 2 técnicas quirúrgicas: mastoidectomía de muro alto vs. muro bajo. En el grupo de mastoidectomía de muro alto encontraron un 19% de enfermedad residual y un 22% de recidiva mientras que en el grupo de mastoidectomía de muro bajo encontraron 12% de enfermedad residual sin encontrar recidivas.<sup>17</sup>
- Sitio de origen
  - Tos y Lau realizaron un estudio en Dinamarca para evaluar las diferencias en la tasa de recurrencia entre 2 tipos de colesteatoma, el de ático y el de *pars tensa* encontrando mayor recurrencia en esta localización (13.3%) vs. el ático (6.6%).<sup>18</sup>
- Inmunobiología del colesteatoma
  - Bujía y colaboradores realizaron un estudio para evaluar la proliferación epitelial del colesteatoma en niños. Utilizaron un anticuerpo monoclonal llamado MIB 1 el cual reconoce antígenos nucleares presentes en distintas fases del crecimiento celular, constituyendo de esta manera un marcador de proliferación epitelial. El puntaje promedio de este anticuerpo fue

significativamente mayor en el colesteatoma pediátrico respecto al de adulto; ésto se traduce en un mayor índice de proliferación de los queratinocitos en niños, lo cual puede explicar en parte el comportamiento más agresivo observado en esta población.<sup>19</sup>

○ Factores anatómicos y fisiológicos

- Los adultos tienen un mecanismo de protección para evitar la progresión de la enfermedad a través de las celdillas escleróticas mastoideas, resultado de una disfunción tubaria crónica.

En los pacientes pediátricos la disfunción tubaria predispone a la recurrencia de las bolsas de retracción, a cuadros recurrentes de otitis media y a sobreinfección del tejido de colesteatoma; así mismo, los elevados factores de crecimiento en los niños también pueden influir en la progresión y recidiva de la enfermedad.<sup>17</sup>

El colesteatoma en población pediátrica exhibe un comportamiento clínico con mayor agresividad e invasión del que se observa en adultos. Bassiouny y colaboradores realizaron un estudio prospectivo para comparar las características histopatológicas e inmunohistoquímicas del colesteatoma adquirido en niños y adultos y su relación con el comportamiento clínico de la enfermedad.

En el estudio histopatológico se demostró una mayor proporción de tejido fibroso en muestras de adultos mientras que en los de pacientes pediátricos predominaron los infiltrados de células inflamatorias. Esto puede correlacionarse con la menor agresividad del colesteatoma en población adulta en donde además se encuentra principalmente en fase reparativa. En la evaluación inmunohistoquímica hubo una expresión significativamente mayor de marcadores de proliferación (PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular) en la matriz y perimatrix del colesteatoma en muestras de niños lo cual puede correlacionarse con la mayor extensión y agresividad comparado con el de población adulta.<sup>3</sup>

Las características histopatológicas del colesteatoma no son los únicos factores que explican las diferencias en el comportamiento clínico entre población pediátrica y adulta, ya que publicaciones recientes sugieren que las biopelículas bacterianas tienen un papel fundamental en la resistencia antimicrobiana, cronicidad, recurrencia y agresividad de la enfermedad.<sup>4</sup>

Como se mencionó previamente, Chole y colaboradores en el 2002 realizaron un estudio experimental con muestras de colesteatoma de oído medio infectado de humanos, así como de colesteatoma inducido en modelo animal. Mediante sus observaciones con microscopía de luz y electrónica de transmisión detectaron la presencia de biopelículas bacterianas en la mayoría de las muestras.<sup>6</sup>

En el año 2011 Saunders y colaboradores realizaron un estudio prospectivo para identificar mediante microscopía electrónica la presencia de biopelículas bacterianas en pacientes con otitis media crónica con o sin colesteatoma, durante la cirugía de oído medio. Se identificaron biopelículas bacterianas en 3 de 5 muestras de colesteatoma infectado (60%), y en sólo 1 de 7 casos con otitis media supurativa no colesteatomatosa. Este es uno de los pocos estudios

clínicos que comprueba la presencia de biopelículas en colesteatoma no inducido en laboratorio.<sup>20</sup>

La biopelícula es un conglomerado de células de una o varias especies que crecen adheridas a una superficie viva o inerte y que están embebidas en una matriz de exopolisacáridos de fabricación propia, la cual tiene una carga eléctrica y una organización estructural tridimensional y funcional compleja.<sup>21</sup>

Datos históricos acerca del desarrollo de la era de las biopelículas<sup>22</sup>:

- Las primeras observaciones de agregados bacterianos asociados a superficies fueron realizadas por Antonie van Leeuwenhoek en 1684 cuando hizo la primera descripción de "animales" presentes en la placa dental.
- Las primeras fotomicrografías de agregados bacterianos se realizaron en 1933 por Henrici quien escribió: "Es evidente que la mayor parte de las bacterias en el agua no se encuentran como organismos flotantes, sino que crecen sobre superficies dentro de ella".
- En el campo de la microbiología ambiental, el primer artículo en el que se usó el término "biopelícula" fue publicado en 1961 por Rogovska en Microbiology-USSR.
- En el campo médico, Hoiby en 1977 describió por primera vez "agregados de *Pseudomonas aeruginosa*" en el tejido pulmonar de pacientes con fibrosis quística infectados crónicamente.
- En 1978 Costerton y colaboradores describieron la presencia de bacterias adheridas a superficies embebidas en un "glicocalix" y en 1981 utilizó el término "biopelícula" por primera vez para describir este fenómeno.
- En 1993 la Sociedad Americana de Microbiología reconoció que el fenotipo de biopelícula era relevante para la microbiología.
- En 1999 Costerton y colaboradores definieron a la biopelícula como una "comunidad de bacterias incluidas en una matriz polimérica producida por ellas mismas, adheridas a una superficie".

La construcción de una biopelícula ocurre a través de estos pasos<sup>21</sup>:

1. Formación o acumulación de una capa de restos orgánicos que neutralizan la carga excesiva y la energía libre de la superficie para facilitar la adherencia de las bacterias.
2. Posterior a la adhesión, se desencadena una cascada de cambios activando un grupo de genes que determinarán el fenotipo de la biopelícula.
3. Comunicación y coordinación entre las diferentes células mediante un sistema llamado "*quorum sensing*" el cual es mediado por pequeñas moléculas liberadas por algunas bacterias para adherirse a otras modificando la regulación de la expresión genética bacteriana en función de su concentración. En el caso de las bacterias Gram (-) estas moléculas pertenecen a la familia de las acil homoserina lactonas; en las Gram (+) son péptidos. Estas moléculas tienen diversas funciones como señalamiento, intercambio de ADN y producción de toxinas. El *quorum*

*sensing* es crucial para determinar la densidad de la población bacteriana y a mayor adherencia mayor comunicación entre ellas. Se ha propuesto que este fenómeno refleja la necesidad del patógeno invasor por alcanzar una densidad de población crítica sobrepasando las defensas del hospedero para establecer una colonización o un proceso infeccioso.

4. Las bacterias unidas a la superficie y entre sí forman una unión irreversible mediante las proteínas de superficie bacteriana, dentro de las cuales la más relevante es la denominada AtlE; posteriormente se agregan en microcolonias e inicia la producción de exopolisacárido (EPS) el cual está constituido de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas. En las bacterias Gram (+) los polisacáridos son catiónicos mientras que en las Gram (-) son neutrales o polianiónicos. La forma de la biopelícula depende en parte del estrés al cual está sometida y a la fuente de nutrientes.
5. La biopelícula inicia un proceso de maduración en el que las células crecerán y se reproducirán en el microambiente, favorecido por sustancias propias del EPS, células vecinas y canales de agua que son el sistema circulatorio primitivo para la preservación de la homeostasis dentro de la misma.
6. La biopelícula es colonizada por estructuras secundarias como bacterias y hongos.
7. Las células adquieren nuevas funciones para mantener la biopelícula y crear otras nuevas placas.
8. Etapa final de despegamiento y dispersión de las bacterias por fuerzas externas o por movimientos migratorios para propagarse hacia el ambiente.

Las biopelículas no necesariamente muestran incremento en la resistencia bacteriana, sino que la dificultad para su erradicación deriva de sus características únicas por su extraordinaria morfología. Una de ellas es la llamada “penetración restringida” que es regulada por la matriz de EPS la cual restringe la difusión de sustancias y degrada los antibióticos, asimismo provee una defensa efectiva contra lisozimas y el sistema del complemento.

Otro fenómeno observado en estos conglomerados es la "tasa de crecimiento retardado de las células" la cual constituye otro factor protector ya que, aunque el antibiótico logre penetrar, éste sólo actuará sobre las células en fase de crecimiento rápido. Esta fase estacionaria contribuye al fenómeno de resistencia.<sup>23</sup>

Las bacterias dentro de las biopelículas no son homogéneas y esto se debe a que todas ellas tienen diversos microambientes, tales como variaciones en el pH, disponibilidad de nutrientes, potencial oxidativo, etc. que pueden desencadenar diferentes señales de transcripción originando que las bacterias monoclonales desarrollen características fenotípicas diversas.

Otra causa de variabilidad es la transferencia de ADN entre las células, llamada “transferencia génica horizontal” la cual es proporcionada por el ambiente creado por la estructura de la biopelícula. Esta transferencia horizontal provee ventajas a las células aumentando la probabilidad de mutaciones adaptativas tales como la resistencia antimicrobiana.<sup>24</sup>

Finalmente, dentro de las biopelículas se desarrolla una subpoblación de células llamada "persistentes", las cuales sobreviven a la administración de un antibiótico y paradójicamente el fármaco impide su crecimiento favoreciendo su persistencia. Estas células reforman la biopelícula de tal manera que este fenómeno explicaría en parte su naturaleza recidivante y la necesidad de periodos prolongados de antibiótico.<sup>21</sup>

En 1979 Kluyskens propone el término "disección químicamente asistida" al observar en su estudio experimental que las capas de queratina del colesteatoma sufrían ruptura al ser sometido a N-acetilcisteína de forma local. Este experimento fue uno de los primeros que se realizaron con el objetivo de descubrir nuevas técnicas para el manejo del colesteatoma que ayudaran a disminuir las elevadas tasas de recidiva.<sup>9</sup>

El 2-mercaptoetanosulfonato de sodio ( $C_2H_5NaO_3S_2$ ) o MESNA es un compuesto sintético que pertenece a la clase de los compuestos tío<sup>10</sup>. Se usa como agente mucolítico en el campo de la medicina respiratoria al romper los puentes de disulfuro de las cadenas polipeptídicas del moco permitiendo el manejo de padecimientos como bronquitis crónica, asma, enfisema, bronquiectasias, fibrosis quística<sup>25</sup>. En la actualidad su principal indicación es la prevención del daño urotelial durante la quimioterapia con ciertos fármacos.<sup>10,25</sup>

Tiene una función importante como antioxidante ya que a través de su grupo sulfhidrilo es capaz de unirse a metabolitos o especies reactivas de oxígeno.<sup>10</sup>

Zini y colaboradores desarrollaron un proyecto para evaluar el MESNA en la disección químicamente asistida. Estos investigadores describieron y patentaron su uso para facilitar la separación de los tejidos patológicos de los sanos durante el manejo de las adherencias ya que éstas son ricas en puentes disulfuro. Dicha patente sugirió el uso del medicamento en los ámbitos de cirugía oncológica, neuroquirúrgica, maxilofacial, vascular, ortopédica, plástica, ginecológica, torácica, base de cráneo y dental.<sup>26</sup>

La primera aplicación clínica del MESNA fue en el campo de la otorrinolaringología. Zini y colaboradores reportaron resultados preliminares de sus observaciones y su utilidad en la separación de la matriz del colesteatoma de los tejidos circundantes.<sup>25</sup> Posteriormente en el año 2004 Yilmaz fue el primero en realizar un estudio experimental con MESNA observando que, en pacientes con otitis media adhesiva y bolsas de retracción, el fármaco ayudaba a la separación de la membrana timpánica al lisar las adherencias entre ésta y el oído medio.<sup>10</sup>

La seguridad del MESNA en el contexto de ototoxicidad ha sido evaluada en diversos estudios. En 1999 Vicenti y colaboradores realizaron un estudio en cobayos en los que se aplicó en el oído medio para valorar toxicidad y sus efectos sobre la anatomía y fisiología coclear mediante microscopía de transmisión y microscopía electrónica, así como a través de potenciales auditivos evocados de tallo cerebral (PAETC); los autores concluyeron que no hubo cambios anatómicos ni auditivos en los grupos estudiados.<sup>27</sup>

Los mismos autores en el año 2014 realizaron un estudio en humanos para evaluar los efectos cocleares del MESNA mediante su aplicación en el oído medio de los pacientes durante cirugía otológica. Los estudios audiológicos comprobaron que no hubo diferencias en los

umbrales auditivos tanto en el grupo control como el de tratamiento, demostrando de esta manera su perfil de seguridad.<sup>28</sup>

Las evidencias científicas sobre la efectividad del MESNA en el colesteatoma residual se remontan a las publicaciones en los últimos 4 años:

- Kalcioglu realizó un estudio en el año 2013 observando una tasa significativamente mayor en el grupo donde se realizó la cirugía sin aplicar el fármaco (17.9%) en comparación con el grupo de tratamiento (6.5%).<sup>11</sup>
- Vicenti en el año 2014 realizó un estudio comparativo en pacientes adultos al utilizar el fármaco durante la timpanomastoidectomía de muro alto encontrando tasas significativamente menores de colesteatoma residual en el grupo de tratamiento.<sup>12</sup>

En el 2016 Ismi y colaboradores realizaron un estudio experimental induciendo la formación de colesteatoma en el oído medio de ratas mediante la aplicación intratimpánica de propilenglicol. En el grupo control se aplicó 0.2 ml de propilenglicol al 100% y en el grupo de tratamiento se aplicó 0.2 ml de propilenglicol al 100% y una semana después una dosis de 0.2 ml de MESNA al 10%. La tasa de formación de colesteatoma fue del 88% en el grupo de propilenglicol mientras que en el grupo tratado con MESNA fue del 21% siendo la diferencia estadísticamente significativa.

De acuerdo a estas observaciones, los autores sugieren que debido a que los puentes de disulfuro tienen un papel en la organización y estabilización de la estructura de queratina, el MESNA puede inhibir su formación a través de sus propiedades antioxidantes, así como desestabilizando los filamentos de queratina al romper los puentes de disulfuro; sin embargo, sugieren que este mecanismo de inhibición de la formación del colesteatoma requiere ser estudiado mediante otras técnicas moleculares.<sup>29</sup>

Como se mencionó en párrafos anteriores, el comportamiento clínico del colesteatoma no depende solamente de su composición histológica. Es cierto que la utilidad del MESNA ha sido comprobada en más de una ocasión al facilitar su disección quirúrgica, lo cual ha tenido un efecto positivo disminuyendo la tasa de enfermedad residual; sin embargo, aún no se tiene información disponible acerca del impacto que pueda tener el manejo de las biopelículas del colesteatoma sobre su evolución y comportamiento clínico.

Sabemos que el manejo de las infecciones asociadas a biopelículas es complejo debido a su poca respuesta a la antibioticoterapia sistémica y tópica como se analizó previamente, de tal forma que en años recientes ha surgido un interés creciente en la utilización de terapias alternativas que generalmente están dirigidas a provocar su disrupción física.

Una de estas terapias es el uso de ultrasonido a alta intensidad y baja frecuencia, que en estudios de laboratorio ha mostrado beneficios en el tratamiento de las biopelículas acelerando la muerte de las bacterias contenidas en ellas. El efecto del ultrasonido parece estar relacionado a un incremento en la eficacia del antibiótico.<sup>5</sup>

Las 3 hipótesis para explicar este efecto son<sup>30</sup>:

1. Incrementando el transporte del antibiótico hacia las bacterias.
2. Incrementando la permeabilidad de las membranas celulares.
3. Incrementando la actividad metabólica y el crecimiento bacteriano probablemente por un incremento del oxígeno y de otros transportadores de nutrientes.

Bjarnsholt propuso que las infecciones crónicas por biopelículas pueden ser manejadas si logran disolverse y que a su vez pueden ser prevenidas si se impide que formen agregados bacterianos, proponiendo entonces que su tolerancia a los antibióticos pueda ser reversible, al menos en modelos de investigación.<sup>22</sup>

En relación al efecto del MESNA sobre la formación de biopelículas, Chen y colaboradores realizaron un estudio experimental para investigar los efectos inhibitorios del fármaco sobre la formación de biopelículas de *E. coli* in vitro revelando los siguientes hallazgos<sup>31</sup>:

- Inhibió las fases iniciales de adhesión y formación de las biopelículas de *E. coli*.
- Destruyó las membranas maduras de las biopelículas.
- Redujo los niveles de proteínas extracelulares y de exopolisacáridos.
- Inhibió la expresión de genes asociados a proteínas de adhesión y expresión de exopolisacáridos.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El manejo del colesteatoma de oído medio continúa siendo quirúrgico, sin embargo, ha evolucionado con el surgimiento de técnicas tales como la disección químicamente asistida con MESNA la cual ha mostrado ser efectiva tanto en modelos experimentales como en estudios clínicos con humanos, facilitando su eliminación y disminuyendo con ello las tasas de enfermedad residual. Esto ha modificado el panorama en términos del pronóstico, en especial en población pediátrica ya que en ella esta patología se caracteriza por ser más agresiva y tener mayores tasas de recidiva.

Con los estudios publicados y expuestos previamente, es claro que el colesteatoma es una patología asociada a biopelículas y que éstas al conferir resistencia y tolerancia antimicrobiana, así como cronicidad de la enfermedad, hacen de su manejo un reto para el cirujano. Las terapias alternativas que puedan tener un impacto en la estructura de la biopelícula podrían aportar mejorías en el manejo y modificar el comportamiento clínico de la enfermedad.

## **6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existen cambios en la estructura de la biopelícula del colesteatoma en niños posterior a la aplicación del 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA)?

## **7. JUSTIFICACIÓN**

Existen pocos estudios publicados en la literatura que evalúen el efecto de terapias alternativas dirigidas hacia las biopelículas. Uno de ellos es el de Ansari y colaboradores<sup>32</sup> quienes utilizaron ultrasonido pulsado a baja intensidad para el manejo de pacientes con rinosinusitis crónica, una patología asociada a biopelículas. Ellos observaron mejoría clínica significativa en los sujetos de estudio, sin embargo, dicha mejoría no fue correlacionada con estudios histopatológicos ni microbiológicos que documentaran cambios en la biopelícula. Estudios como el de Chen y colaboradores<sup>31</sup> han comprobado que el MESNA tiene un efecto inhibitorio sobre la formación de biopelículas, al menos de forma experimental.

En la actualidad no existen aún estudios experimentales ni clínicos publicados que evalúen los efectos del MESNA sobre las biopelículas en el colesteatoma de oído medio, tanto en población adulta como pediátrica; de esta forma poder encontrar un fármaco que permita alterar su estructura es alentador ya que no sólo plantea la posibilidad de mejorar su eliminación mecánica sino también modificar el microambiente de la misma pudiera incrementar la sensibilidad a los antimicrobianos de las bacterias contenidas en ella.

## **8. HIPÓTESIS**

Existen cambios en la biopelícula del colesteatoma en niños posterior a la aplicación del 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) que pueden ser documentados mediante microscopía electrónica.

## **9. OBJETIVOS**

### **9.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los cambios que ocurren en la biopelícula del colesteatoma de pacientes pediátricos posterior a la aplicación de 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA).

### **9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar mediante microscopía láser confocal los cambios que ocurren en la biopelícula del colesteatoma de oído medio de pacientes pediátricos obtenido en cirugía otomastoidea, posterior a la aplicación de 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) al 4% durante 10 minutos.

## **10. METODOLOGÍA**

### **10.1 LUGAR DE ESTUDIO**

Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

### **10.2 TIPO DE ESTUDIO**

Cuasiexperimental.

### **10.3 POBLACION DE ESTUDIO**

Pacientes pediátricos con diagnóstico de otitis media crónica colesteatomatosa operados de mastoidectomía primaria o de revisión en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil de México Federico Gómez entre enero 2016 y mayo 2017.

## **10.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN**

### **10.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Pacientes pediátricos con diagnóstico clínico de otitis media crónica colesteatomatosa candidatos a cirugía otomastoidea primaria o de revisión.
- Contar con los siguientes estudios complementarios:
  - Tomografía computada simple de hueso temporal y/o resonancia magnética con difusión pesada.
  - Estudio audiológico menor a 6 meses.
- Sin historial de reacciones adversas o alergia al MESNA.

### **10.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes y/o padres que no aceptaron participar en el estudio.
- Expediente clínico incompleto al momento del estudio.

### **10.4.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

- Pacientes cuya muestra de colesteatoma sea insuficiente para su procesamiento y estudio.

## **10.5 MUESTREO**

Se realizó un muestreo no probabilístico de casos consecutivos.

## **10.6 DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO**

- El grupo de estudio se conformó con pacientes con diagnóstico clínico de otitis media crónica colesteatomatosa y que cumpliendo los criterios de inclusión estuvieron programados para mastoidectomía primaria o de revisión.
- El día del internamiento se tuvo una plática con el paciente y familiar responsable para explicar los objetivos del protocolo de investigación, la técnica quirúrgica de obtención de muestras, riesgos y complicaciones; así como para obtener el consentimiento para participar en el estudio.

- El día previo al evento quirúrgico se solicitó la preparación de la dilución del MESNA a una concentración del 4%, el cual fue proporcionado por SAFE Productos Hospitalarios S.A. de C.V.
- Técnica quirúrgica:
  - Paciente bajo anestesia general balanceada, antisepsia de la región quirúrgica con solución ChlorPrep.
  - Incisión retroauricular, disección por planos hasta tejido muscular, elevación de colgajo de Palva para exponer región mastoidea.
  - Mastoidectomía primaria en oídos sin antecedente de cirugía otomastoidea o bien, mastoidectomía de revisión en aquéllos con cirugía otológica previa.
  - Identificación y toma de muestra basal del tejido de colesteatoma colocándose en gasa con solución salina isotónica al 0.9%.
  - Colocación de dilución de MESNA al 4% sobre el tejido de colesteatoma durante 10 minutos para posteriormente realizar toma de muestra y colocación de la misma en gasa con solución salina isotónica al 0.9%.
  - Realización de mastoidectomía para retiro del resto del colesteatoma con técnica de muro alto o muro bajo de acuerdo a los hallazgos transoperatorios.
  - Las muestras de colesteatoma basal y con MESNA fueron llevadas de forma inmediata al Departamento de Patología para su procesamiento, el cual consistió en:
    1. Colocación de las muestras en Tissue Tek® (resina soluble en agua que crea una matriz para permitir el corte de la muestra en el criostato a temperaturas por debajo de los  $-10^{\circ}\text{C}^{33}$ ).
    2. Congelación de las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
    3. Obtención de cortes histológicos de 5 micras a  $-29^{\circ}\text{C}$  mediante el criostato marca LEICA CM 1850 UV y colocación de los mismos en portaobjetos tratados con poli-L-lisina.
  - Traslado de los cortes histológicos montados en portaobjetos al Laboratorio de Infectología, Área de Bacteriología a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para ser preparados para su visualización en microscopio láser confocal de la siguiente forma:
    - Doble lavado con solución salina.

- Adición de 200 microlitros de solución de tñido (LIVE/DEAD *BacLight*®) en condiciones de oscuridad.
  - EL LIVE/DEAD *BacLight*® es un kit para evaluar la viabilidad de poblaciones bacterianas en función de la integridad de la membrana celular. Está compuesto de 2 fluoróforos, SYTO®9 y yoduro de propidio.
  - El yoduro de propidio es un colorante con fluorescencia roja que se une al ADN exclusivamente de células con membranas destruidas de tal forma que se utiliza para tñir bacterias muertas.
  - El SYTO®9 es un colorante con fluorescencia verde que se une al ADN tanto de células vivas como muertas, sin embargo, cuando se encuentra mezclado con el yoduro de propidio se ve desplazado por éste, de tal forma que tñe únicamente aquellas células con membranas intactas siendo marcador de bacterias vivas<sup>34</sup>.
- Incubación a temperatura ambiente por 20 minutos.
- Retiro de colorante y lavado con solución salina.
- Adición de 200 microlitros de formalina al 10% o paraformaldehído al 4% para fijar la muestra durante 30 minutos a 4°C.
- Retiro del fijador y doble lavado con solución salina.
- Colocación y fijación del cubreobjetos.
- Traslado de los cortes histológicos tñidos y fijados en los portaobjetos al Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica para su observación con el microscopio láser confocal Leica TCS SP8-X, tomándose fotografías para su análisis e interpretación.
  - A cada muestra se le asignó un número de identificación aleatorio; así mismo las observaciones y descripción de los tejidos fue realizada de forma ciega por personal capacitado para evitar con ello una interpretación sesgada.

## 10.7 VARIABLES DE ESTUDIO Y ESCALAS DE MEDICIÓN

<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>TIPO DE VARIABLE</b>
Biopelícula bacteriana <b>(variable dependiente)</b>	Conglomerado de células que crecen adheridas a una superficie, embebidas en una matriz de exopolisacáridos con organización estructural tridimensional y funcional compleja.	Cambios en la estructura de la biopelícula observados con microscopía láser confocal	Cualitativa nominal
Edad <b>(variable independiente)</b>	Tiempo de existencia de una persona desde su nacimiento hasta la actualidad	Tiempo de existencia de una persona desde su nacimiento hasta el día del estudio expresada en años	Cuantitativa discreta
Género <b>(variable independiente)</b>	Conjunto de seres que tienen uno o varios caracteres comunes	Masculino o femenino	Cualitativa dicotómica
Mastoidectomía <b>(variable independiente)</b>	Procedimiento quirúrgico que consiste en remover el hueso cortical, así como las celdillas mastoideas.	Primaria o de revisión	Cualitativa dicotómica

## **10.8 PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis descriptivo con medidas de tendencia central para las variables que así lo permitieron mediante Excel versión 16.0

## **10.9 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

La Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en su Título Segundo "De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos", capítulo I, artículo 14.V establece que la investigación que se realice en seres humanos deberá contar con consentimiento informado del sujeto de investigación o su representante legal, por lo cual se solicitó dicho documento a los pacientes y sus padres (Anexo).

## **11. RESULTADOS**

12 pacientes cumplieron criterios de inclusión y 2 se eliminaron por contar con muestra insuficiente, quedando un total de 10 pacientes.

Se utilizó como control sano una muestra de mucosa de mastoides de una paciente con colocación de implante coclear.

Del grupo de estudio, 8 pacientes fueron del sexo masculino y 2 del sexo femenino, con una mediana de edad de 10 años y un rango de 6 a 17 años de edad.

En cuanto al tipo de procedimiento quirúrgico realizado, a 9 pacientes se les realizó cirugía primaria y a 1 paciente mastoidectomía de revisión.

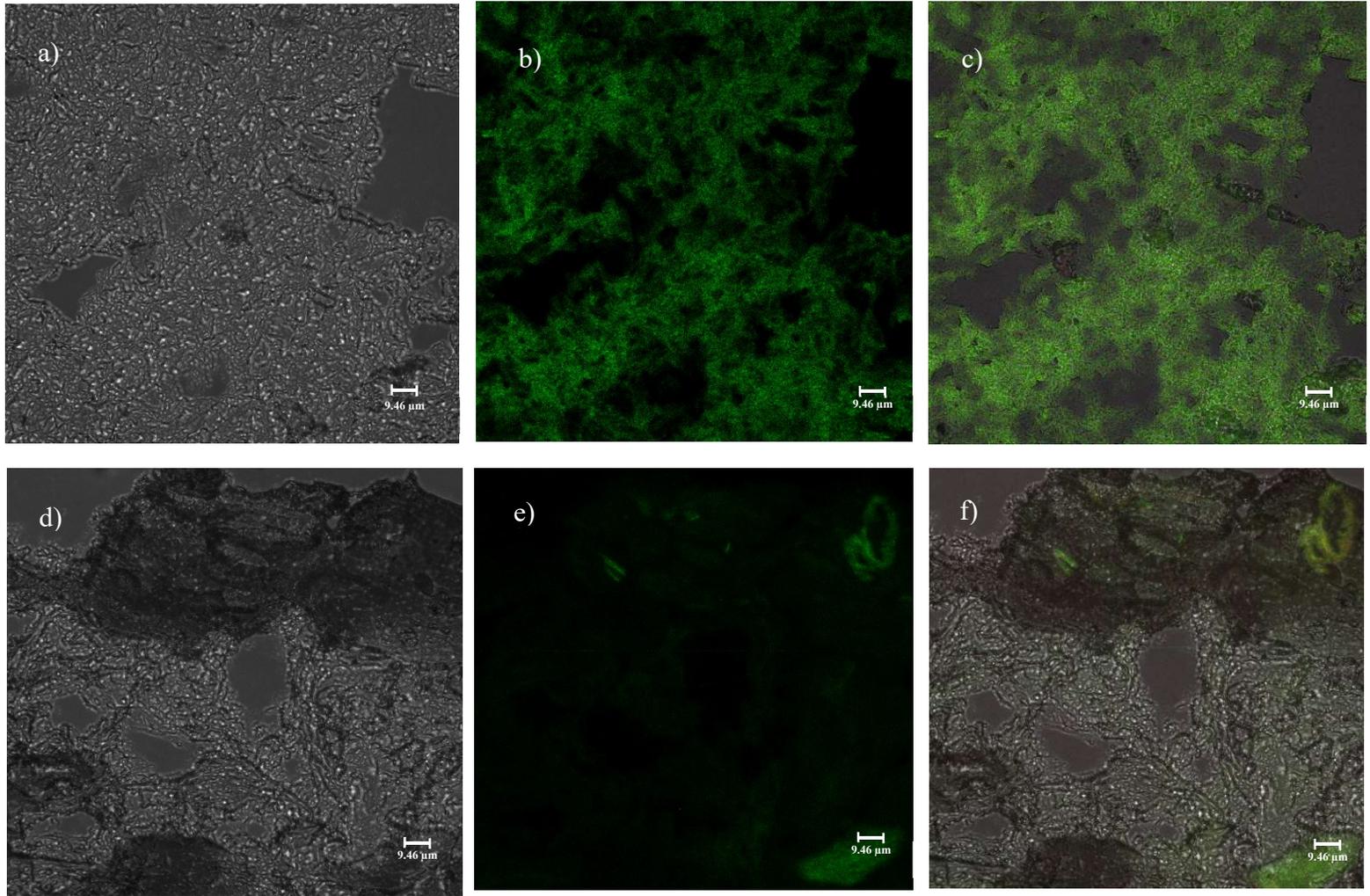
En la Tabla 1 se describen los hallazgos observados mediante microscopía láser confocal de las muestras de colesteatoma de oído medio tanto basales como posterior a la aplicación de MESNA a una dilución del 4% durante 10 minutos. Dichos hallazgos se correlacionan con las imágenes observadas en las Figuras 1 a 11, que fueron tomadas durante las observaciones en el microscopio láser confocal.

**Tabla 1**

# PACIENTE	EDAD	GÉNERO	DATOS CLÍNICOS MASTOIDECTOMÍA	HALLAZGOS EN MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL	
				BASAL	CON MESNA AL 4% POR 10 MIN
1	11	Masculino	Cirugía primaria	<b>Fig. 1 (a-c)</b> a) Queratina compacta. b) Biopelícula densa, intensa y uniforme (fluorescencia verde). c) Escasas bacterias muertas (fluorescencia roja).	<b>Fig. 1 (d-f)</b> d) Láminas de queratina separadas. e) Disminuye la intensidad y densidad de la fluorescencia (biopelícula disgregada). f) No hay incremento en bacterias muertas (fluorescencia roja).
2	7	Masculino	Cirugía primaria	<b>Fig. 2 (a-c)</b> a) Tejido de queratina con láminas compactas. b) Biopelícula sobre las láminas de queratina, con fluorescencia intensa y uniforme. c) Escasas bacterias muertas (fluorescencia roja).	<b>Fig. 2 (d-f)</b> d) Aspecto difuso de las láminas de queratina. e) Biopelícula con fluorescencia difusa, de menor densidad e intensidad, con menor cercanía hacia las láminas de queratina. f) No hay incremento de bacterias muertas (fluorescencia roja).
3	17	Femenino	Mastoidectomía de revisión. Oído congénito	<b>Fig. 3 (a-c)</b> a) Queratina densa y compacta. b) Biopelícula que cubre a la queratina con moderada densidad. c) Escasas bacterias muertas (fluorescencia roja).	<b>Fig. 3 (d-f)</b> d) Separación y disgregación de las láminas de queratina. e) Biopelícula con menor densidad, con aspecto disgregado y difuso. f) Sin incremento de bacterias muertas (fluorescencia roja).
4	6	Femenino	Cirugía primaria	<b>Fig. 4 (a-c)</b> a) Láminas de queratina compacta en la superficie y parcialmente separadas en la porción interna. b) Biopelícula densa y homogénea en la superficie del tejido, bien organizada. c) Se observan bacterias muertas (fluorescencia roja) sobre la biopelícula.	<b>Fig. 4 (d-f)</b> d) Tejido de queratina con importante separación de sus láminas. e) Sobre la queratina se observan importantes cambios en la densidad y estructura de la biopelícula. f) Sin incremento de bacterias muertas (fluorescencia roja).
5	10	Masculino	Cirugía primaria	<b>Fig. 5 (a-c)</b> a) Tejido de queratina uniforme, organizado. b) Biopelícula rodeando la superficie del tejido de queratina. c) No se observan bacterias muertas.	<b>Fig. 5 (d-f)</b> d) Importante separación del tejido de queratina. e) Sobre las láminas separadas de queratina, se observa la biopelícula disgregada, con menor densidad y menos uniforme. f) Siguen sin observarse bacterias muertas.

6	13	Masculino	Cirugía primaria	<p><b>Fig. 6 (a-c)</b></p> <p>a) Tejido de queratina uniforme y denso.</p> <p>b) Biopelícula que recubre el tejido de queratina con fluorescencia intermedia, uniforme.</p> <p>c) No se evidencia la presencia de bacterias muertas en el tejido o biopelícula</p>	<p><b>Fig. 6 (d-f)</b></p> <p>d) Láminas de queratina parcialmente separadas.</p> <p>e) La biopelícula muestra cambios observándose menos densa y uniforme, parcialmente disgregada.</p> <p>f) No se observan bacterias muertas en el tejido.</p>
7	10	Masculino	Cirugía primaria	<p><b>Fig. 7 (a-c)</b></p> <p>a) Queratina muy compacta, de morfología uniforme.</p> <p>b) Biopelícula que envuelve el tejido.</p> <p>c) Sin evidencia de bacterias muertas.</p>	<p><b>Fig. 7 (d-f)</b></p> <p>d) Láminas de queratina en fases iniciales de separación.</p> <p>e) La biopelícula muestra menor densidad, pero aún se observa sobre el tejido subyacente.</p> <p>f) Continúan sin evidenciarse bacterias muertas.</p>
8	10	Masculino	Cirugía primaria	<p><b>Fig. 8 (a-c)</b></p> <p>a) Tejido de queratina muy compacto y uniforme.</p> <p>b) Biopelícula con densidad heterogénea, recubriendo el tejido subyacente.</p> <p>c) Importante fluorescencia roja que indica la presencia de bacterias muertas embebidas en el tejido y biopelícula.</p>	<p><b>Fig. 8 (d-f)</b></p> <p>d) Láminas de queratina en fases iniciales de separación.</p> <p>e) Disminuye la densidad de la biopelícula, se observan áreas disgregadas.</p> <p>f) No se observa un aumento en la fluorescencia roja por lo tanto no se incrementaron las bacterias muertas.</p>
9	12	Masculino	Cirugía primaria	<p><b>Fig. 9 (a-c)</b></p> <p>a) Queratina poco densa y organizada.</p> <p>b) Biopelícula poco organizada y con densidad disminuida.</p> <p>c) Escasas bacterias muertas sobre el tejido.</p>	<p><b>Fig. 9 (d-f)</b></p> <p>d) El tejido se observa muy disgregado y poco uniforme.</p> <p>e) Biopelícula casi inexistente, muy poco densa.</p> <p>f) Sin incremento en bacterias muertas.</p>
10	8	Masculino	Cirugía primaria	<p><b>Fig. 10 (a-c)</b></p> <p>a) Queratina parcialmente compacta.</p> <p>b) Biopelícula en la superficie del tejido, con densidad heterogénea.</p> <p>c) Bacterias muertas inmersas en la superficie tisular.</p>	<p><b>Fig. 10 (d-f)</b></p> <p>d) No se observan cambios significativos en la separación del tejido.</p> <p>e) La biopelícula se observa con menor densidad, difusa, disgregada.</p> <p>f) Sin incremento en fluorescencia roja (bacterias muertas).</p>
Control sano	2	Femenino	Muestra de mucosa de oído medio. Cirugía de implante coclear	<p><b>Fig. 11 (a-c)</b></p> <p>a) El tejido de la mucosa se observa bien organizado y uniforme.</p> <p>b) Sobre el tejido se observa la biopelícula organizada, con densidad homogénea sobre la superficie.</p> <p>c) Entremezclada con la biopelícula se evidencian bacterias muertas.</p>	

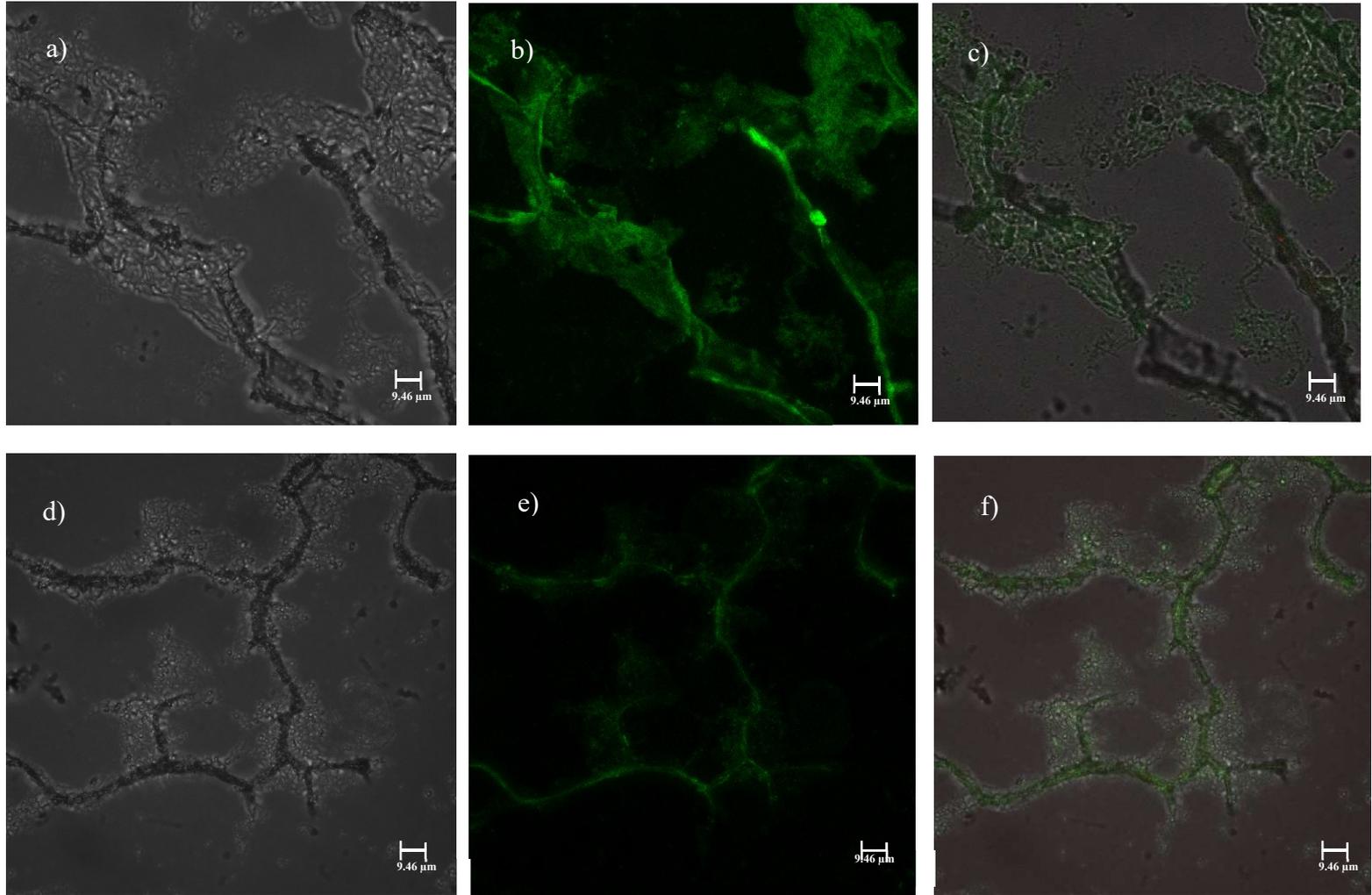
IMÁGENES CAPTURADAS CON EL MICROSCOPIO LÁSER CONFOCAL  
LEICA TCS SP8-X



**Fig. 1 Colesteatoma de paciente #1.**

**a), b) y c) Muestra basal. d), e) y f) Muestra con MESNA**

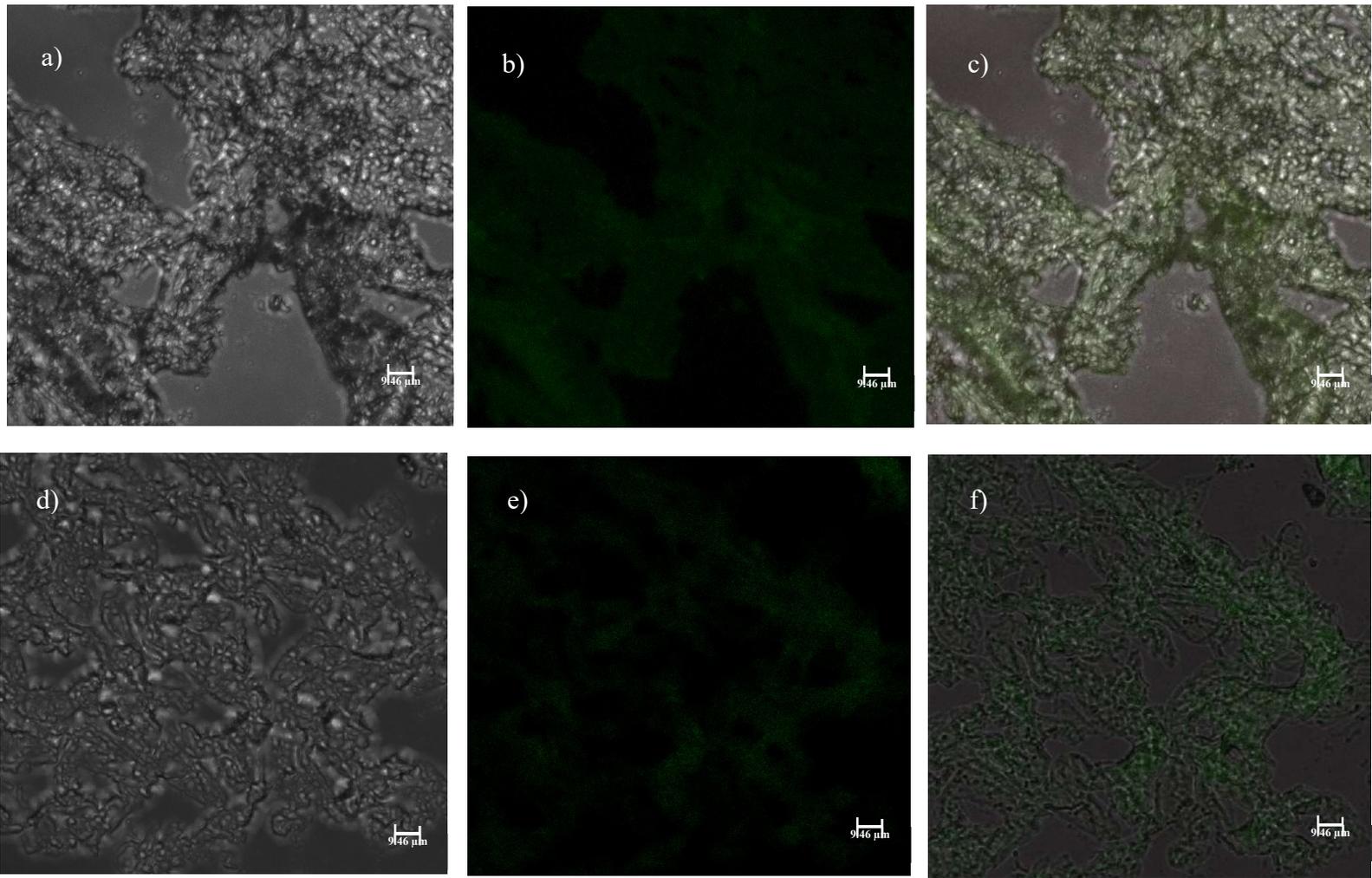
a) y d) Canal 3 (campo claro). b) y e) Canal 1 (fluorescencia verde). c) y f) Imagen superpuesta de canales 1, 2 y 3.



**Fig. 2 Colesteatoma de paciente #2.**

**a), b) y c) Muestra basal. d), e) y f) Muestra con MESNA**

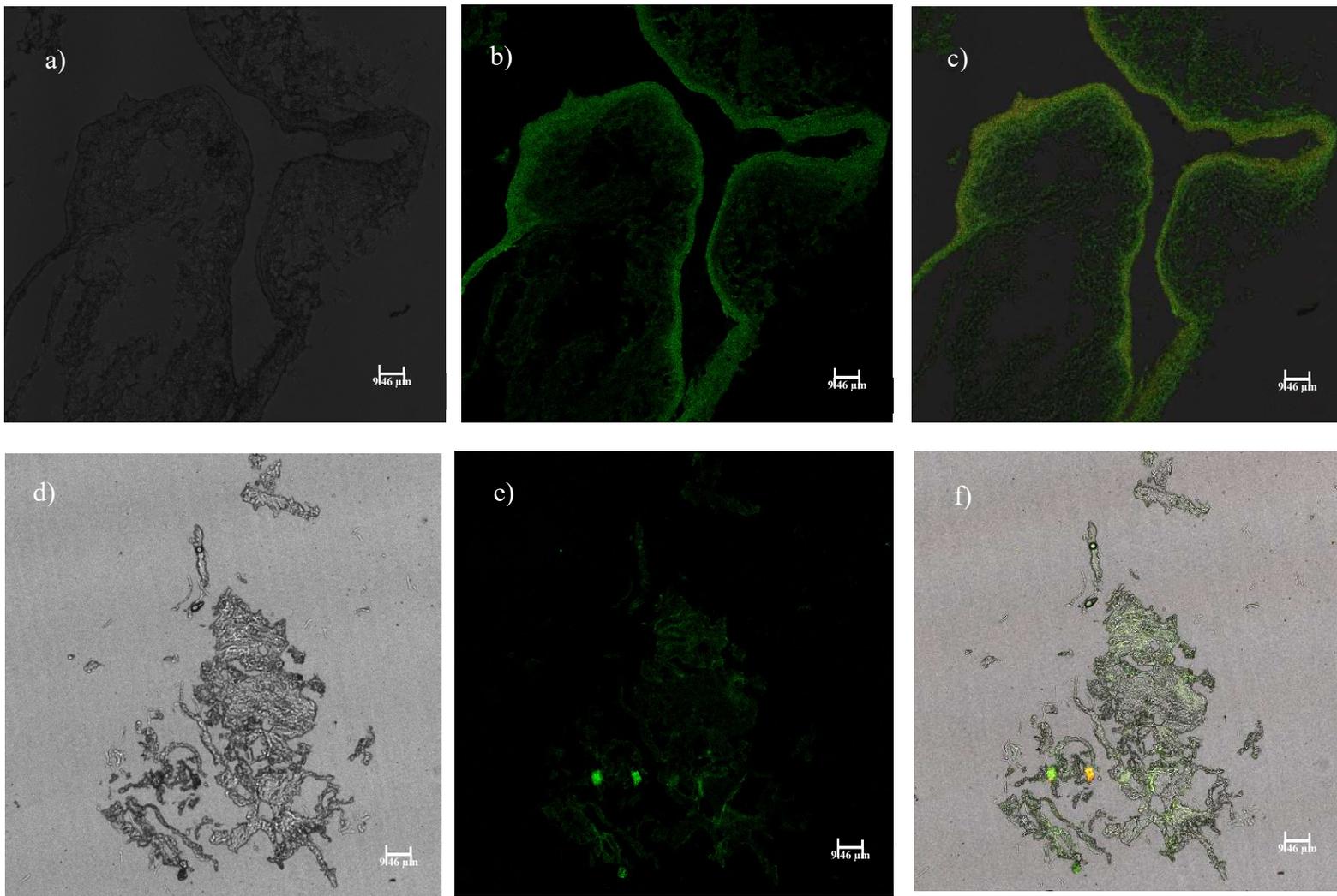
a) y d) Canal 3 (campo claro). b) y e) Canal 1 (fluorescencia verde). c) y f) Imagen superpuesta de canales 1, 2 y 3.



**Fig. 3 Colesteatoma de paciente #3.**

**a), b) y c) Muestra basal. d), e) y f) Muestra con MESNA**

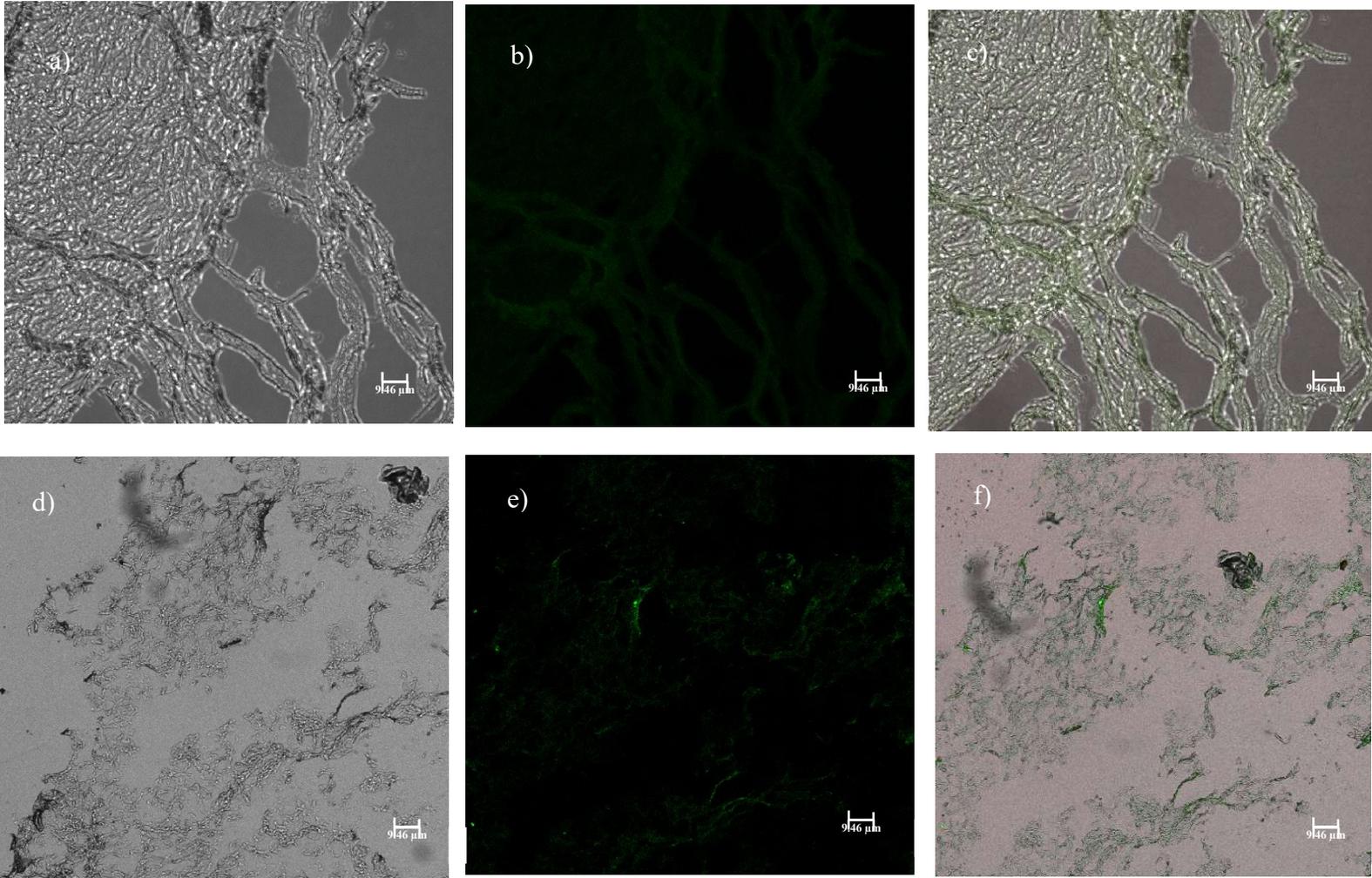
a) y d) Canal 3 (campo claro). b) y e) Canal 1 (fluorescencia verde). c) y f) Imagen superpuesta de canales 1, 2 y 3.



**Fig. 4 Colesteatoma de paciente #4.**

**a), b) y c) Muestra basal. d), e) y f) Muestra con MESNA**

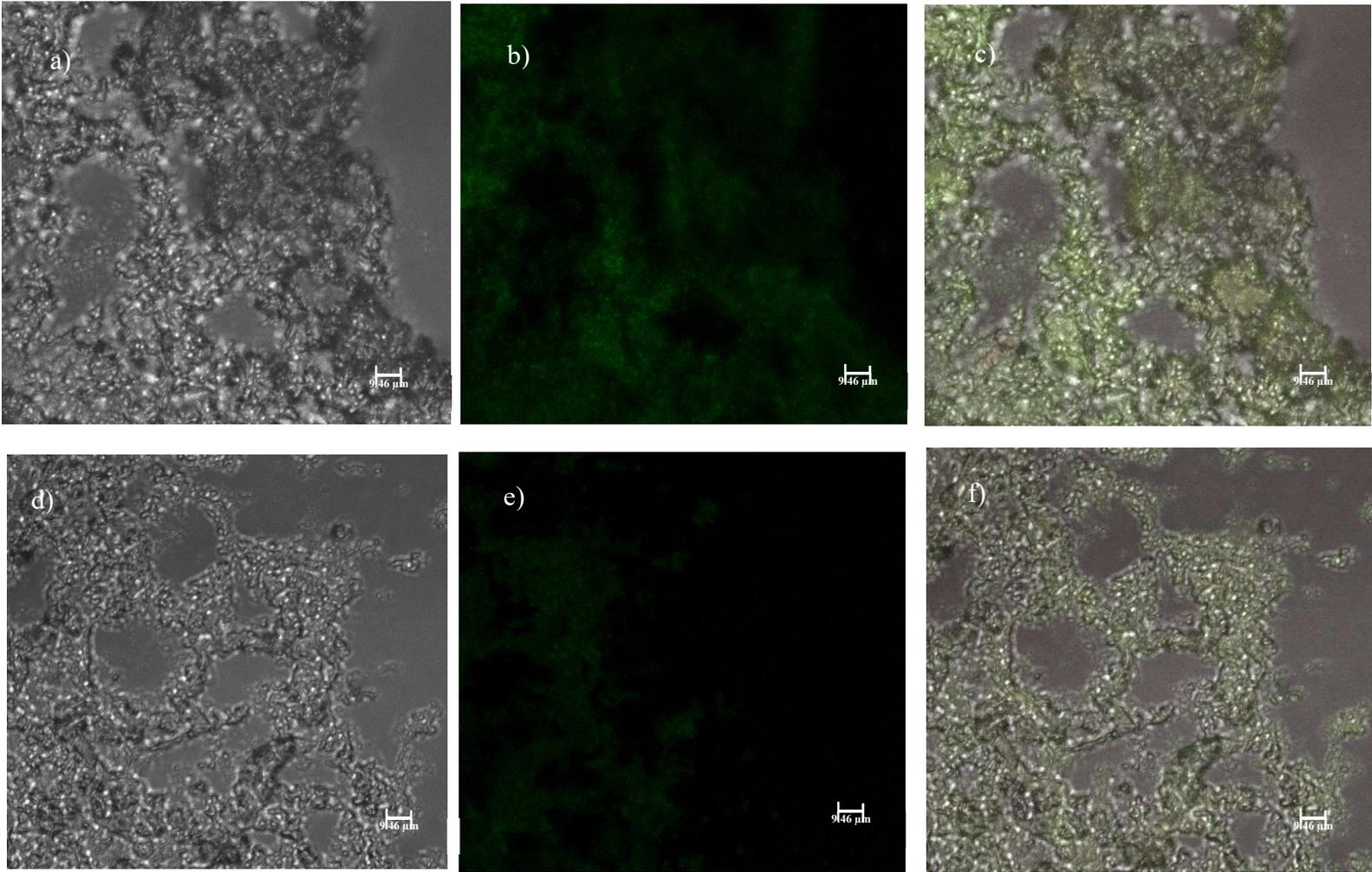
a) y d) Canal 3 (campo claro). b) y e) Canal 1 (fluorescencia verde). c) y f) Imagen superpuesta de canales 1, 2 y 3.



**Fig. 5 Colesteatoma de paciente #5.**

**a), b) y c) Muestra basal. d), e) y f) Muestra con MESNA**

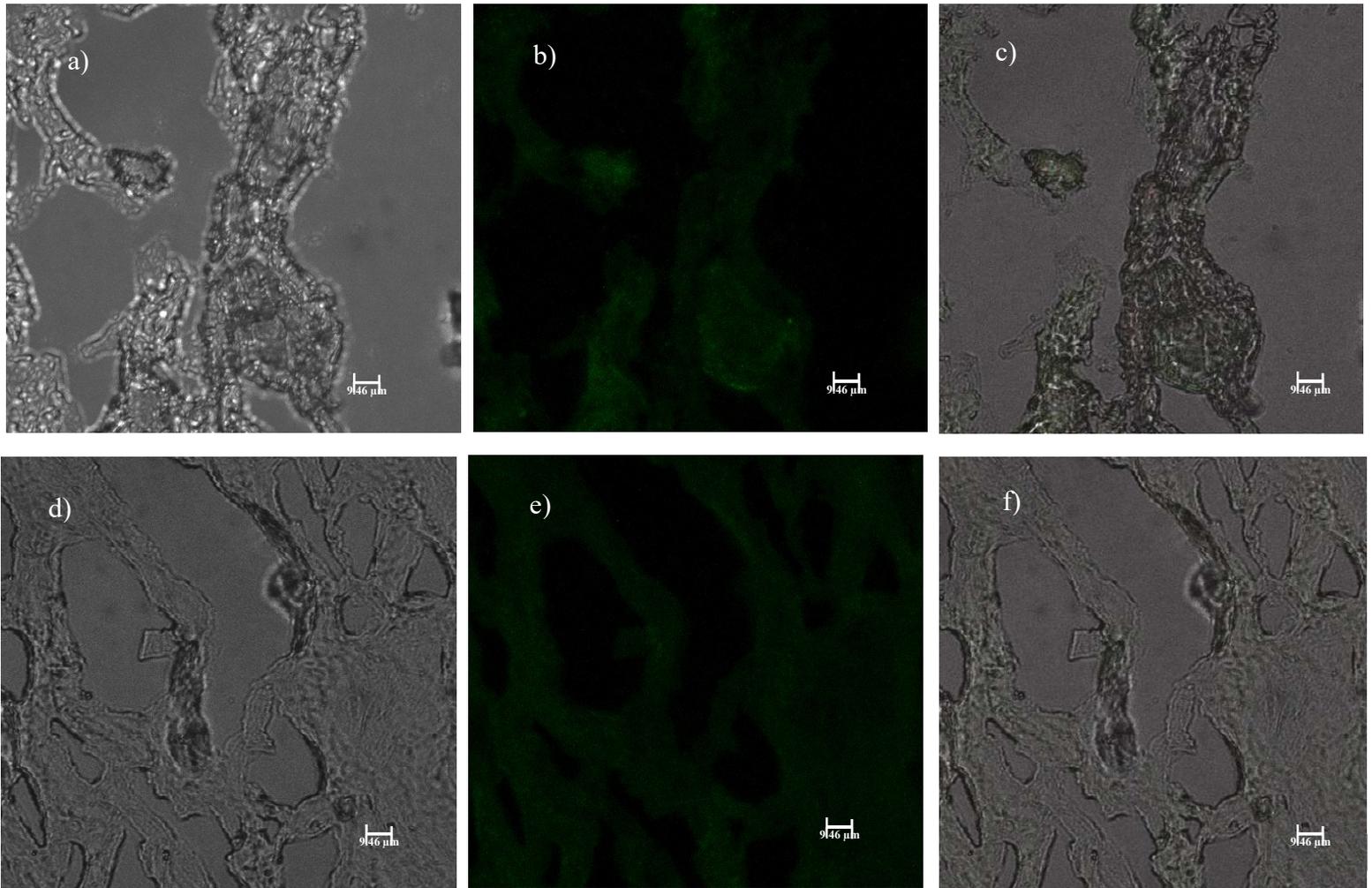
a) y d) Canal 3 (campo claro). b) y e) Canal 1 (fluorescencia verde). c) y f) Imagen superpuesta de canales 1, 2 y 3.



**Fig. 6 Colesteatoma de paciente #6.**

**a), b) y c) Muestra basal. d), e) y f) Muestra con MESNA**

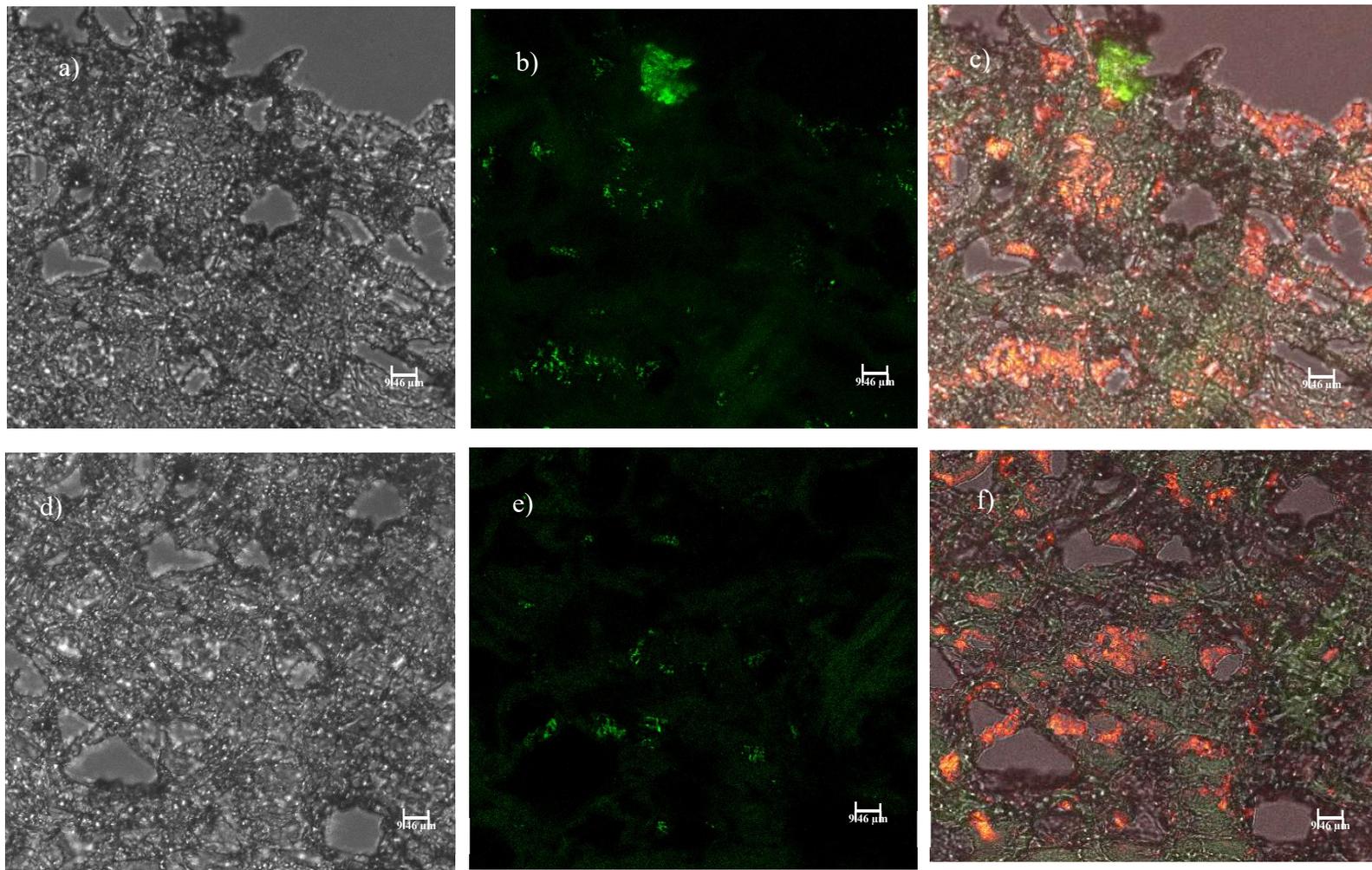
a) y d) Canal 3 (campo claro). b) y e) Canal 1 (fluorescencia verde). c) y f) Imagen superpuesta de canales 1, 2 y 3.



**Fig. 7 Colesteatoma de paciente #7.**

**a), b) y c) Muestra basal. d), e) y f) Muestra con MESNA**

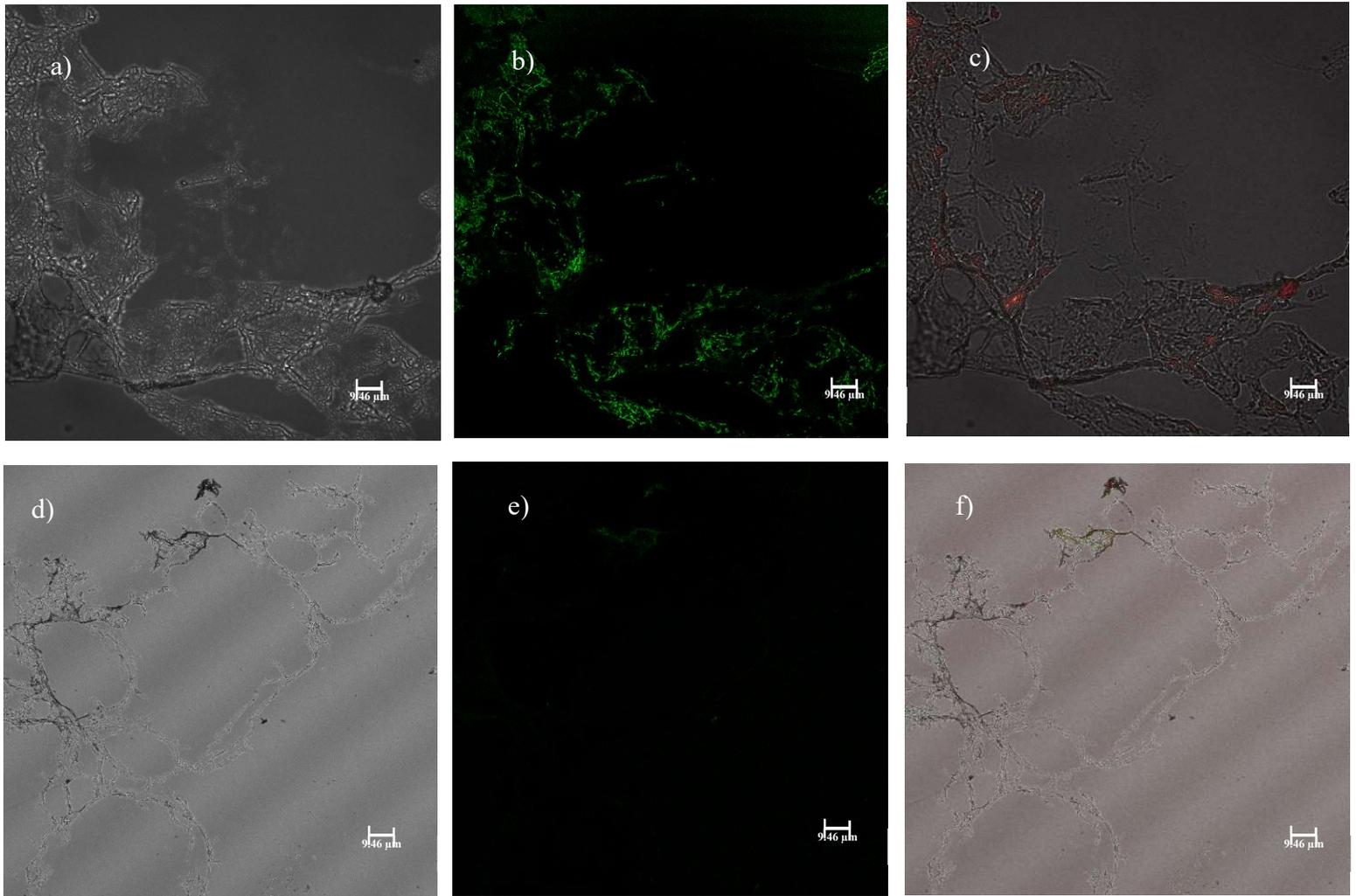
a) y d) Canal 3 (campo claro). b) y e) Canal 1 (fluorescencia verde). c) y f) Imagen superpuesta de canales 1, 2 y 3.



**Fig. 8 Colesteatoma de paciente #8.**

**a), b) y c) Muestra basal. d), e) y f) Muestra con MESNA**

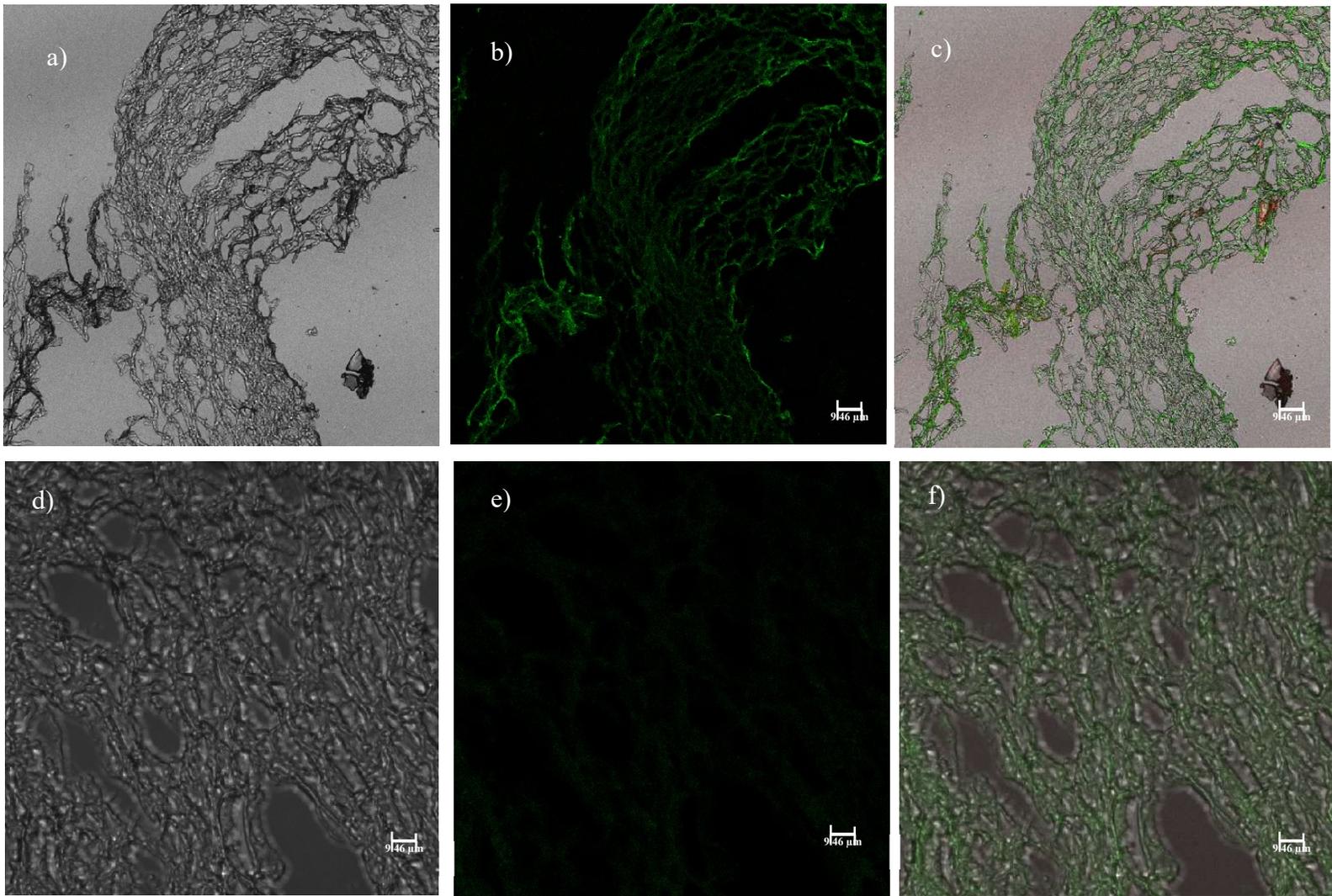
**a) y d) Canal 3 (campo claro). b) y e) Canal 1 (fluorescencia verde). c) y f) Imagen superpuesta de canales 1, 2 y 3.**



**Fig. 9 Colesteatoma de paciente #9.**

**a), b) y c) Muestra basal. d), e) y f) Muestra con MESNA**

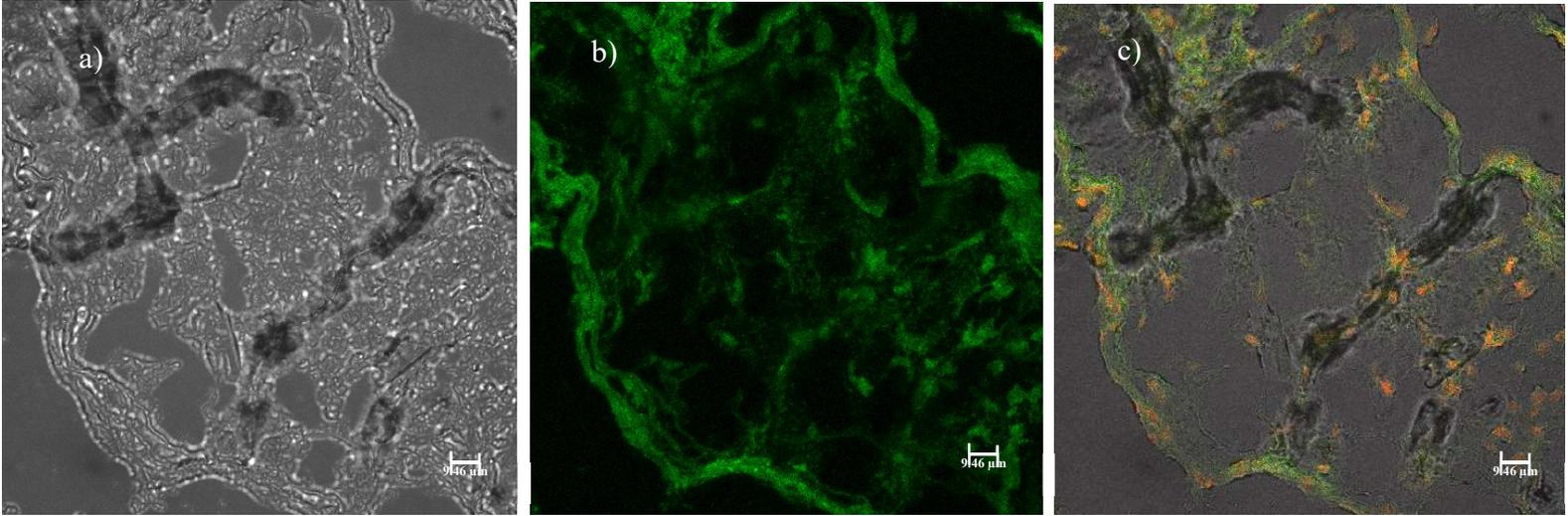
a) y d) Canal 3 (campo claro). b) y e) Canal 1 (fluorescencia verde). c) y f) Imagen superpuesta de canales 1, 2 y 3.



**Fig. 10 Colesteatoma de paciente #10.**

**a), b) y c) Muestra basal. d), e) y f) Muestra con MESNA**

a) y d) Canal 3 (campo claro). b) y e) Canal 1 (fluorescencia verde). c) y f) Imagen superpuesta de canales 1, 2 y 3.



**Fig. 11 Control sano. Muestra de mucosa de oído medio obtenida durante cirugía de implante coclear.**  
a) Canal 3 (campo claro). b) Canal 1 (fluorescencia verde). c) Imagen superpuesta de canales 1, 2 y 3.

## 12. DISCUSIÓN

En este estudio encontramos que 80% de la población muestra es del género masculino, siendo compatible con lo publicado por diversos autores, quienes mencionan una relación hombre: mujer de hasta 6:1 en esta patología.<sup>8,35</sup>

Del procedimiento quirúrgico, a 90% de la muestra se le realizó cirugía otomastoidea primaria y sólo 1 paciente tenía antecedente de cirugía previa. Esto puede explicarse ya que el Hospital Infantil de México es un centro de referencia nacional de tal manera que cada año se recibe una gran cantidad de casos nuevos de colesteatoma.

El caso con cirugía previa correspondió a una paciente con diagnóstico de síndrome de microtia atresia; esta población presenta una evolución clínica diferente al resto porque existe un mayor riesgo de reestenosis de los tejidos tanto blandos como óseos que pueden favorecer acumulación de epitelio lo que incrementa el riesgo de recidiva del colesteatoma.<sup>37,38</sup>

En el 2016 en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil de México se realizó un estudio experimental en el que se demostraron cambios en la estructura del colesteatoma posterior a la aplicación de MESNA.<sup>13</sup>

En nuestro estudio se observaron cambios similares en el tejido, tales como separación de las láminas de queratina; dichos cambios ocurrieron en el 100% de las muestras con lo cual se demuestra nuevamente la utilidad del fármaco en la disección químicamente asistida.

El microscopio láser confocal es una herramienta útil para la observación de biopelículas en diversos tipos de tejidos. El principio se basa en la utilización de sustancias llamadas fluoróforos o fluorocromos, los cuales son compuestos que se unen a estructuras celulares específicas de tal forma que, al ser expuestos al láser del microscopio, permiten la identificación de distintas moléculas celulares.<sup>36</sup>

En este estudio se utilizó un kit de viabilidad bacteriana llamado LIVE/DEAD *BacLight*®, el cual emplea 2 fluoróforos; el primero es el SYTO®9, un compuesto que penetra y se une al ADN de células con membranas íntegras, siendo útil para identificar bacterias vivas. El canal de fluorescencia del microscopio utilizado para este fin es el #1, mostrando las estructuras bacterianas vivas con fluorescencia verde.

Los hallazgos en nuestro estudio permitieron demostrar que, en las muestras basales de colesteatoma, este compuesto penetra en la estructura que lo rodea, la cual corresponde a la biopelícula. La fluorescencia observada en las muestras fue intensa y uniforme.

Estos hallazgos contrastaron con lo observado en las muestras de colesteatoma tratadas con MESNA; en ellas la fluorescencia de la estructura que rodea la queratina se observó de menor intensidad, así como de aspecto disgregado y difuso. Estos hallazgos, observados en el 100% de las muestras, sugieren que el fármaco provoca disgregación de la biopelícula, así como posible separación de la misma del tejido subyacente.

El segundo fluoróforo utilizado es el yoduro de propidio, que al igual que el SYTO®9 penetra y se une al ADN de las células, con la diferencia de que lo hace en aquéllas con membranas destruidas de tal forma que ayuda a identificar bacterias muertas. El canal de fluorescencia

del microscopio utilizado para este fin es el #2, mostrando las estructuras bacterianas muertas con fluorescencia roja.

Los hallazgos observados con el microscopio confocal pudieron demostrar que posterior a la aplicación del MESNA sobre el colesteatoma, no hubo un incremento de la fluorescencia roja, de tal forma que se deduce que este compuesto no rompe membranas ni tampoco destruye células, es decir, no tiene propiedades bactericidas.

Las observaciones descritas previamente demuestran que el fármaco además de separar las láminas de queratina provoca una disgregación de la estructura de la biopelícula y su separación del tejido de colesteatoma subyacente. Esto representa un hallazgo particularmente importante, ya que como lo propuso Bjarnsholt<sup>22</sup>, plantea posibles opciones terapéuticas en concordancia con la hipótesis de que las bacterias que conforman la biopelícula pueden ser susceptibles al manejo antibiótico una vez que se consigue su disolución.

Los hallazgos del estudio cobran especial importancia si recordamos que las biopelículas bacterianas tienen un papel fundamental en la resistencia antimicrobiana, cronicidad, recurrencia y agresividad de la enfermedad<sup>4</sup>, de tal forma que al demostrar que el MESNA modifica su estructura y que ello pudiese incrementar su susceptibilidad al efecto de los antibióticos, podríamos plantear la posibilidad de que también modifique el pronóstico de la enfermedad, especialmente en términos de recidiva de la misma.

Se utilizó como control sano una muestra de mucosa de oído medio de una paciente a quien se le realizó colocación de implante coclear, ya que al no tener patología infecciosa activa ni antecedentes de colesteatoma, se asumió que no existirían biopelículas.

El hallazgo inesperado fue que en dicha muestra se identificó una estructura compatible con biopelículas rodeando el tejido de mucosa respiratoria; así mismo se identificaron áreas con importante fluorescencia roja compatibles con formas bacterianas muertas.

Estas observaciones pudieran tener varias explicaciones. Una de ellas es que en este grupo de edad son frecuentes los procesos infecciosos de vías respiratorias altas, y los pacientes pediátricos en protocolo de implante coclear no son la excepción, de tal forma que es factible la presencia de estos conglomerados bacterianos en la mucosa del oído medio de dicha población.

Otra posible explicación es que en este grupo etario (<5 años) es común encontrar antecedentes de cuadros de otitis media con derrame; dicha patología ha sido estudiada con técnicas de biología molecular siendo clara su asociación con biopelículas bacterianas.<sup>4</sup>

Este es el primer estudio experimental que se realiza a nivel nacional e internacional que demuestra cambios en la biopelícula bacteriana del colesteatoma en población pediátrica. A nuestro conocimiento, tampoco existe un estudio similar en población adulta.

### **13. CONCLUSIONES**

Los efectos del MESNA sobre la estructura del colesteatoma ya fueron demostrados por diversos autores siendo propuesto como una medida coadyuvante a la cirugía para facilitar su disección y con ello disminuir las tasas de enfermedad residual y recurrencia de la misma.

Las aportaciones de nuestro trabajo radican en que es el primer estudio experimental que evalúa y demuestra cambios en la estructura de la biopelícula bacteriana asociada al colesteatoma con la aplicación de MESNA. Dichos hallazgos permiten plantear el uso de este fármaco como una medida coadyuvante al procedimiento quirúrgico, no sólo en términos de disección químicamente asistida, sino que al modificar la estructura de la biopelícula podría incrementarse la susceptibilidad antimicrobiana y con ello se tendrían nuevas opciones terapéuticas con antibioticoterapia. Esto pudiera tener un impacto positivo en términos del pronóstico de la enfermedad ya que potencialmente ayudaría a disminuir la recidiva de la enfermedad.

### **14. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

Este es el primer estudio experimental que evalúa cambios en la biopelícula del colesteatoma en población pediátrica posterior a la aplicación de MESNA; de tal forma que los resultados obtenidos no pueden ser comparados. Así mismo tampoco existen estudios realizados en población adulta que sirvan de referencia.

A pesar de que la muestra fue de 10 pacientes, los hallazgos observados fueron similares y uniformes en todas las muestras, por lo que consideramos que son representativos.

Un aspecto importante por mencionar es que las descripciones de los cambios de las biopelículas posterior a la aplicación del fármaco se hicieron de forma cualitativa, lo cual está sujeto a la interpretación.

Existen programas de computadora creados para el estudio cuantitativo de las características de las biopelículas, sin embargo, estos programas aportan información precisa cuando estos conglomerados bacterianos son producto de cultivos bacterianos puros. En este estudio las muestras utilizadas estaban constituidas del tejido de queratina con la biopelícula circundante, de tal manera que el programa no arrojó datos cuantitativos concluyentes.

## 15. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	AGO 2016	SEPT 2016	OCT 2016	NOV 2016	DIC 2016	ENE 2017	FEB 2017	MAR 2017	ABR 2017	MAY 2017	JUN 2017
<b>Elección de tema</b>	X										
<b>Búsqueda de bibliografía</b>	X	X	X	X							
<b>Elaboración de anteproyecto</b>				X	X						
<b>Aprobación de protocolo</b>						X					
<b>Recolección y análisis de datos</b>						X	X	X			
<b>Redacción de tesis</b>								X	X		
<b>Presentación de resultados</b>									X	X	X

## 16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tsilis N, Vlastarakos P, Chalkiadakis V, et al. Chronic Otitis Media in Children: An Evidence-Based Guide for Diagnosis and Management. *Clinical Pediatrics*. 2013; 52(9):795-802.
2. Yung M, Tono T, Olszewska E, et al. EAONO/JOS Joint Consensus Statements on the Definitions, Classification and Staging of Middle Ear Cholesteatoma. *The Journal of International Advanced Otolaryngology*. 2017;13(1):1-10.
3. Bassiouny M, Badour N, Omran A, et al. Histopathological and immunohistochemical characteristics of acquired cholesteatoma in children and adults. *Egyptian Journal of Ear, Nose, Throat and Allied Sciences*. 2012;13(1):7-12.
4. Maniu A, Harabagiu O, Perde M. et al. Molecular biology of cholesteatoma. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2014;55(1): 7-13.
5. Tolker-Nielsen T. Pseudomonas aeruginosa biofilm infections: From molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 2014;122(138):18-22.
6. Chole R, Faddis B. Evidence for Microbial Biofilms in Cholesteatomas. *Archives of Otolaryngology, Head and Neck Surgery*. 2002;128(10):1129-1133.
7. Post Christopher. Direct Evidence of Bacterial Biofilms in Otitis Media. *The Laryngoscope*. 2001;111(12):2083-2094.
8. Morita Y, Yamamoto Y. et al. Acquired cholesteatoma in children: Clinical features and surgical outcome. *Auris Nasus Larynx*. 2014;41(5):417-421.
9. Kluyskens P, Gillis E, Nsabumukunzi S. First observations on treatment of cholesteatoma with (N-acetyl) cysteine. *Acta Otolaryngol*. 1979;87(3-4):362-365.
10. Yilmaz M, Gosku N, Bayramoglu I, et al. Practical Use of MESNA in Atelectatic Ears and Adhesive Otitis Media. *Journal of Otorhinolaryngology and its related specialities*. 2006;68(4):195-198.
11. Kalcioğlu M, Cicek M, Bayindir T, et al. Effectiveness of MESNA on the success of cholesteatoma surgery. *American Journal of Otolaryngology, Head and Neck Medicine and Surgery*. 2014;35(3):357-361.
12. Vicenti V, Magnan J, Saccardi M, et al. Chemically Assisted Dissection by Means of Mesna in Cholesteatoma Surgery. *Otology & Neurotology*. 2014;35(10):1819-1824.
13. Mantilla E, de la Torre C, et al. Uso de MESNA en el tratamiento de colesteatoma adquirido de oído medio en niños. Evaluación mediante microscopía de luz y electrónica. Tesis UNAM 2016.
14. Shohet J, de Jong A. The management of pediatric cholesteatoma. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2002;35(4):841-851.
15. Lasisi et al. Clinical and demographic risk factors associated with chronic otitis media. *International Journal of Pediatric Otolaryngology*. 2007;71(10):1549-1554.
16. Chole R, Sudhoff H. Chronic Otitis Media, Mastoiditis, and Petrositis. *Cummings Otolaryngology Head & Neck Surgery*. Elsevier. 2010:1964-1966.
17. Dodson EE, Hashisaki GT, Hobgood TC, et al. Intact canal wall mastoidectomy with tympanoplasty for cholesteatoma in children. *Laryngoscope*. 1998;108(7):977-983.

18. Tos M, Lau T. Late results of surgery in different cholesteatoma types. *ORL. J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1989;51(1):33–49.
19. Bujia J, Holly A, Antoli-Candela F, et al. Immunobiological peculiarities of colesteatoma in children: quantification of epithelial proliferation by MIB 1. *Laryngoscope.* 1996;106(7):865–868.
20. Saunders J, Murray M, Alleman A. Biofilms in chronic suppurative otitis media and cholesteatoma: scanning electron microscopy findings. *American Journal of Otolaryngology–Head and Neck Medicine and Surgery.* 2011;32(1):32–37.
21. Mena N. Biofilms en otorrinolaringología. *Acta Otorrinolaringológica Española.* 2014;65(1):47-52.
22. Bjarnsholt T. The Role of Bacterial Biofilms in Chronic Infections. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica. Suppl.* 2013;136:1-51.
23. Smith A, Buchinsky F, Post J. Eradicating Chronic Ear, Nose, and Throat Infections: A Systematically Conducted Literature Review of Advances in Biofilm Treatment. *Otolaryngology, Head and Neck Surgery.* 2011;144(3):338–347.
24. Post J, Hiller N, Nistico L, et al. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery.* 2007; 15(5):347–351.
25. Casale M, Di Martino A, Salvinelli F, et al. MESNA for chemically assisted tissue dissection. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2010;19(6):699-707.
26. Zini C, Bacciu S, Gandolfi A, et al. Use of sodium 2-mercaptoethanesulfonate in surgery. *WO016213;1998.*
27. Vicenti V, Mondain M, Pasanisi E, et al. Cochlear Effects of Mesna Application into the Middle Ear. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1999;884:425-432.
28. Vicenti V, Magnan J, Zini C. Cochlear effects of intraoperative use of Mesna in cholesteatoma surgery. *Acta Biomedica.* 2014;85(1):30-34.
29. Ismi O, Karabulut Y, Bal K. Single dose intratympanic mesna application inhibits propylene glycol induced cholesteatoma formation. *The Journal of Laryngology & Otology.* 2016;131(3):215-220.
30. Bartley J, Young D. Ultrasound as a treatment for chronic rhinosinusitis. *Medical Hypotheses.* 2009;73(1):15–17.
31. Chen S, He N, Yu J, et al. Inhibitory effect of 2-mercaptoethane sulfonate on the formation of *Escherichia coli* biofilms in vitro. *Molecular Medicine Reports.* 2015; 12(4):5223-5230.
32. Ansari NN, Naghdi S, Farhadi M, et al. A preliminary study into the effect of low-intensity pulsed ultrasound on chronic maxillary and frontal sinusitis. *Physiotherapy Theory and Practice.* 2007;23(4):211-218.
33. <https://us.vwr.com/store/product/4692300/tissue-tek-o-c-t-compound-sakura-finetek>
34. Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber et al. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology.* 2015;15:36.
35. Lynrah Z, Bakshi J, Panda N, et al. Aggressiveness of Pediatric Cholesteatoma. Do We Have an Evidence?. *Indian Journal of Otolaryngology, Head and Neck Surgery.* 2013;65(3):264–268.

36. <https://iie.fing.edu.uy/investigacion/grupos/gti/timag/trabajos/2007/proteus/epifluor/epifluor.html>
37. De la Cruz a, Borne K. Congenital aural atresia surgery: Long-term results. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2003;129(1):121 - 127.
38. Casale G, Nicholas B, Kesser B. Acquired Ear Canal Cholesteatoma in Congenital Aural Atresia/Stenosis. *Otology & Neurotology*. 2014;35(8):1474-1479.

## 17. ANEXO

### HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GÓMEZ

#### Servicio de Otorrinolaringología

Protocolo de investigación: “Cambios en la biopelícula en la otitis media crónica colesteatomatosa en niños posterior a la aplicación de 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA)”.

#### **Carta de consentimiento informado**

Les invitamos a participar en un estudio experimental en el cual se evaluarán los cambios en la biopelícula bacteriana del tejido de colesteatoma posterior a la aplicación de un medicamento llamado MESNA.

La participación en el estudio es totalmente voluntaria y no están forzado a participar si así lo desean.

Les solicitamos lean la siguiente información. Si existiera alguna duda o pregunta infórmenlo a la persona que les proporcionó este documento.

#### **Objetivo del estudio**

El manejo del colesteatoma en niños es difícil debido al comportamiento clínico agresivo y a las elevadas tasas de recidiva del mismo. Estas características han sido asociadas a la presencia de biopelículas bacterianas en el colesteatoma, por lo cual este trabajo pretende evaluar si existen cambios en la biopelícula posterior a la aplicación de un fármaco llamado MESNA.

#### **Responsables del estudio**

El protocolo se está llevando a cabo en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil de México Federico Gómez y cuenta con el apoyo de personal del servicio de Patología, así como de investigadores de las áreas de Biología Intestinal y del Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica.

Dentro del servicio de Otorrinolaringología los responsables del estudio son el Jefe de Servicio Dr. Carlos de la Torre González y la Dra. Marisol Huante Guido, residente de 6to año de la subespecialidad. Puede contactarlos al teléfono 52289917 ext. 2033.

#### **Toma de muestras**

Durante la cirugía que se le realizará a su hijo(a) se tomará una primera muestra del tejido de colesteatoma y posteriormente una segunda muestra después de la aplicación del fármaco MESNA, mismas que serán procesadas para su evaluación.

La seguridad del fármaco aplicado dentro del oído ha sido comprobada en estudios experimentales en seres humanos por lo cual no existen riesgos con su utilización.

**Permanencia durante el estudio**

Si usted decide retirarse del estudio puede hacerlo de forma libre en cualquier momento durante el mismo y esto no afectará la atención que seguirá recibiendo en nuestra institución.

**Confidencialidad**

La información obtenida se manejará de forma confidencial y no se compartirá con ninguna persona que no sea responsable de su cuidado médico o que no sea participante del protocolo de investigación. No se utilizarán nombres durante la generación de resultados del estudio y tampoco aparecerán en los reportes derivados del mismo.

Es importante aclarar que no se ofrece ningún pago a los participantes del estudio.

Entiendo y acepto que mi hijo(a) participe en el protocolo de investigación.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de la persona legalmente responsable

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Testigo

\_\_\_\_\_  
Testigo

\_\_\_\_\_  
Testigo