



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSIO VILLEGAS"
DEPARTAMENTO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y
CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO**

**"EFECTO DEL EMPAQUETAMIENTO CON ESPONJA DE
COLÁGENO POLIVINIL PIRROLIDONA COMBINADO CON
LA APLICACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO, SOBRE LA
CICATRIZACIÓN POSQUIRÚRGICA DEL OÍDO MEDIO"**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**ESPECIALISTA EN OTORRINOLARINGOLOGÍA
Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO**

PRESENTA:

DRA. ROSALVA GONZÁLEZ LÓPEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

M. EN C. RAÚL OLMOS ZUÑIGA

CO-ASESORES:

DR. ANTONIO SODA-MERHY

DR. ROGELIO JASSO VICTORIA



MÉXICO, D. F.

AGOSTO DE 2008



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.

M. EN C. J. RAÚL OLMOS-ZUÑIGA

ASESOR DE TESIS

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL INER-ICV

DR. ANTONIO SODA-MERHY

CO-ASESOR DE TESIS Y PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE
OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO INER-ICV

DR. ROGELIO JASSO-VICTORIA

CO-ASESOR DE TESIS

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL INER-ICV

DR. MIGUEL GAXIOLA-GAXIOLA

CO-ASESOR DE TESIS

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA INER-ICV

M. EN C. AVELINA SOTRES-VEGA
CO-ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL INER-ICV

DRA. LISETTE CRISTERNA-SÁNCHEZ
CO-ASESOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA
Y CUELLO INER-ICV

DR. JAIME VILLALBA-CALOCA
CO-ASESOR DE TESIS
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE TRANSPLANTE PULMONAR EXPERIMENTAL
INER-ICV

DR. JORGE SALAS HERNÁNDEZ
JEFE DE ENSEÑANZA

DEDICATORIAS.

A mi mamá y mi hermana por todos estos años de ausencia, por todo el apoyo que siempre tuve de parte de ustedes de manera incondicional.

Este trabajo mamá, no es más que la consolidación del esfuerzo y cariño tuyo hacia mi, que me ayudaron a terminar una etapa tan importante en la vida y sobre todo por creer en mi.

Gracias MAMÁ

Gracias ROSABEL

A mi esposo, gracias por tu apoyo, paciencia, por todas esas horas de desveló y sobre todo por el tiempo compartido.

Gracias JOSUE

AGRADECIMIENTOS.

A todo el equipo de cirugía experimental en especial a **M. en C. Raúl Olmos**, al **Dr. Rogelio Jasso** y **Dr. Miguel Gaxiola**, por su gran aportación, incansable disposición, paciencia, cariño e interés en el proyecto.

Al **Dr. Antonio Soda Merhy** por sus enseñanzas y por haberme permitido ser parte de su excelente departamento.

A mis maestros: **Dra. Lisette Cristerna**, **Dra. María Lidia Sánchez**, **Dr. Arturo Ramírez**, **Dr. Bernardo Dávila**, **Dr. Alejandro Jiménez**, **Dr. Gabriel Tona**, **Dra. Carmen Tirado**, **Dra. Carranco**.

Al servicio de enfermería: Bety, Sonia, Lilí, Pili, Tere, Blanquita, Anita y Ema.

Gracias Rosd Berto, Iohannan por haber compartido conmigo estos años de ardua labor y resistencia.....

Gracias a mis compañeros y amigos que me ayudaron a formarme durante la residencia: Daniel, Schobert, Inge, Mario, karla, karen, Laura, Jaime, Gabriel, Raúl, Iván, José Antonio, Jeny. En especial Yuria y Nidia por el gran apoyo incondicional al inicio de la misma...gracias.

ÍNDICE

RESUMEN.	1
I. INTRODUCCIÓN.	2
II. JUSTIFICACIÓN.	6
III. HIPÓTESIS.	6
IV. OBJETIVOS.	
1. Objetivo general.	7
2. Objetivo específico.	7
V. MATERIAL Y MÉTODOS.	
1. Recursos.	8
2. Animales de experimentación.	9
2.1. Criterios de inclusión.	9
2.2. Criterios de exclusión.	9
2.3. Criterios de eliminación.	9
3. Grupos de estudio.	9
4. Anestesia.	10
5. Técnica quirúrgica.	11
6. Evaluación	11
6.1 Manejo del material de empaque.	11
6.2. Clínica.	12
6.3. Otoscópica.	12
6.4. Microscópica.	13
VI. RESULTADOS.	
1. Manejo del material de empaquetamiento.	14
2. Hallazgos clínicos.	14
3. Hallazgos otoscópicos.	14
4. Hallazgos microscópicos.	16
VII. DISCUSIÓN.	18
VIII. CONCLUSIONES.	24
IX. FIGURAS.	25
X. GRÁFICAS.	33
XI. BIBLIOGRAFÍA.	37

Efecto del empaquetamiento con esponja de colágeno polivinil pirrolidona combinado con la aplicación de ácido hialurónico, sobre la cicatrización posquirúrgica del oído medio.

RESUMEN.

Introducción. En cirugía de oído medio se requiere de un material de empaque que le proporcione soporte a los injertos y favorezca su cicatrización. Para esto se han utilizado diversos materiales solos o en combinación con ácido hialurónico (AH), pero ninguno ha demostrado ser el ideal ya que se ha reportado la formación de adherencias, fibrosis de la mucosa del oído medio (OM) y retención del material de empaque.

La colágena polivinil-pirrolidona (CPVP) es un modulador de la cicatrización y su uso combinado con AH, disminuye la inflamación, la cantidad de colágena formada y mejora la calidad de la cicatrización. Por lo que se puede suponer que el colocar una esponja de CPVP embebida en AH después de una cirugía de oído, favorecerá la cicatrización con menor inflamación y formación de adherencias. **Objetivo.** Determinar el efecto del empaquetamiento con esponja liofilizada CPVP embebida en AH, sobre la cicatrización de la mucosa del oído medio, después de realizar una miringotomía.

Material y métodos. En 24 cobayos se realizó miringotomía derecha y empaquetamiento del OM de la siguiente manera: **Grupo I (n=6):** Miringotomía empaquetada con esponja de colágena bovina absorbible (CBA) y SSF, **Grupo II (n=6):** Miringotomía con CBA y AH, **Grupo III (n=6):** Miringotomía con CPVP y SSF, **Grupo IV (n=6):** Miringotomía con CPVP y AH. Otoscópicamente se evaluó la integridad de la membrana timpánica (MT), grado de retracción de la misma y presencia de líquido transtimpánico y de material residual de empaque. Al cumplirse 4 semanas postcirugía los animales se sometieron a eutanasia con sobredosis anestésica y se realizó estudio histológico de la mucosa del OM. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando ANDEVA y Tukey. Todos los valores de $p < 0.05$ se consideraron como significativos.

Resultados. Los animales tratados con la mezcla de CPVP-AH mostraron cierre total de la miringotomía, sin retracción de la MT, mucosa de OM con menor edema y sin presencia de material residual de empaque en comparación con los de CBA ($p < 0.05$, ANDEVA, Tukey). Histológicamente también mostraron menor inflamación, pero reacción fibroblástica en el 100% de los casos ($p < 0.05$, Andeva, Tukey).

Conclusiones. En el cobayo, el colocar una esponja de CPVP embebida en AH después de una miringotomía, favorece la cicatrización de la misma con menor inflamación, sin formación de adherencias, ni fibrosis del OM.

Palabras clave: Material de empaque, colágena bovina absorbible (CBA), Colágeno polivinil pirrolidona (CPVP), ácido hialurónico (AH), miringotomía, inflamación, adherencias, fibrosis.

I. INTRODUCCIÓN.

El aparato auditivo está diseñado para recibir vibraciones mecánicas, conducir las 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 superficie epitelial de la membrana timpánica y su función es recibir las ondas sonoras. El oído medio (OM) es un espacio aéreo localizado en la porción petrosa del hueso temporal y contiene los huesecillos del oído, su función es conducir las ondas sonoras que recibe el oído externo hacia las células receptoras. El interno se forma por el laberinto óseo y membranoso y tiene una doble función, ya que actúa como órgano receptor primario de la audición y conserva el equilibrio.

El oído al igual que otros órganos del cuerpo no está exento de sufrir enfermedades y existen patologías del OM en las que se produce tejido de granulación, cambios en la cadena oscicular, timpanoesclerosis, perforación timpánica residual, granulomas de colesterol, así como colesteatoma, las cuales finalmente provocan la obliteración y disminución del espacio del mismo por la formación de adherencias, membrana timpánica (MT) atelectásica o adhesiva al promontorio que fija la cadena oscicular y ocasionan disminución auditiva secundaria (1). Estas alteraciones pueden tratarse de forma médica con el uso de esteroides y/o antibióticos sistémicos o tópicos (2-4), limitada al control de infecciones activas, pero cuando este no es exitoso, se requiere del uso de procedimientos quirúrgicos con abordaje transcanal, endaural (mediante la combinación de diferentes incisiones tipo Lempert) o postauricular (5) y facilitar la

realización de miringoplastías (para cierre de perforaciones de MT, con oído seco), timpanotomías exploradora (para oídos con MT intacta e hipoacusia conductiva), timpanoplastía con o sin osiculoplastía (para oídos secos, con perforación de MT), mastoidectomía simple o radical (cuando se encuentra afección de mastoides, o en casos de otorrea refractaria o sospecha de colesteatoma), los cuales tienen como propósito identificar y retirar el tejido enfermo irreversible por la infección, ventilar el OM, mastoides, reconstruir el mecanismo auditivo y prevenir la morbilidad de secuelas o complicaciones (5-7).

Como regla general después de realizar la cirugía, utilizando la vía de acceso preferida, se coloca en el OM un material de empaque que de soporte temporal para la reparación de la MT, manteniendo la estabilidad del injerto y cadena oscicular hasta que cicatrice.

Se ha descrito que el material de empaquetamiento debe de cumplir con ciertas características como: disolverse al mismo tiempo que la cicatrización se haya completado, permita la óptima ventilación del OM y facilite la reparación adecuada de los tejidos blandos sin formación de adherencias (8). Sin embargo en ocasiones si el material de empaque no cumple con su función, se puede presentar la formación de tejido de granulación, adherencias y obliteración del OM. Para tratar de evitarlo, se ha reportado el uso de esponjas de colágena bovina absorbible (CBA) (gelfoam) (9). No obstante el uso de estos materiales en la timpanoplastía, han incrementado los reportes de retención de empaque, formación de adherencias, fibrosis de la mucosa y formación de hueso nuevo (10-12). También se han utilizado placas de ácido poliglicólico, pero producen fibrosis en los tejidos circunvecinos ya que tardan mucho en eliminarse (13). Así mismo, se han utilizado geles de ácido hialurónico pero

tampoco han mostrado el éxito deseado, ya que si estos no tienen la viscosidad adecuada, se eliminan rápidamente y no logra dar el soporte necesario para que el OM tenga una cicatrización adecuada (9,14).

El ácido hialurónico (AH) que está compuesto por unidades alternantes de ácido D-glucurónico y N-acetil glucosamina, es un componente de la matriz extracelular (MEC) de la herida fetal, el cual, durante la fase temprana de curación de las heridas en los fetos favorece la proliferación, regeneración y reparación tisular disminuyendo la inflamación y la fibrosis (15,16). Estas propiedades de AH tienen implicaciones clínicas ya que puede ser posible modular la cicatrización de las heridas en niños y adultos para hacerla lo más parecida a la cicatrización fetal, mediante la aplicación del AH en forma exógena (17)

Clínicamente el AH se ha utilizado con buenos resultados en reumatología para la disminución de procesos fibróticos en el tratamiento de la osteocondritis de rodilla (18,19), en ginecología se estudia su aplicación para prevenir la formación de adherencias intraabdominales posquirúrgicas (20) y en cirugía plástica, así como en dermatología, se utiliza como expansor tisular en la piel (21), en urología actualmente se usa en el tratamiento de la cistitis intersticial refractaria (22,23), en la regeneración citocelular de la reconstrucción uretral (24,25) y en el tratamiento endoscópico del reflujo vésico-ureteral del niño (26).

Experimentalmente en oftalmología se está investigando el uso de AH como sustituto vítreo (27). También se ha utilizado para mejorar la cicatrización intestinal (28), en el mecanismo de cicatrización del esófago con quemaduras por cáustico en ratas (29). En otorrinolaringología se investiga su uso como bioimplante para la mucosa de las cuerdas vocales (30) y para favorecer la regeneración de las heridas de la mucosa

nasal después de cirugía y cuerdas vocales (31), también gracias a su biocompatibilidad con la mucosa del OM se ha utilizado como material de empaque (9).

La colágena polivinil-pirrolidona es un biomaterial. (CPVP) Es un fármaco que existe en forma de líquido y esponja, que esta formado por una mezcla de colágena porcina del tipo I irradiada con rayos gamma y polivinil-pirrolidona (CPVP) (32-34), que ha mostrado actividad fibrinolítica al inhibir la expresión de moléculas de ELAM-1, VCAM-1, TGF- β y PDGF-AB de los factores de crecimiento y péptidos fibrógenicos, por lo que actúa como remodelador de procesos fibrosos (35). Este fármaco se ha utilizado con éxito en dermatología y cirugía plástica para el tratamiento de las cicatrices queloides e hipertróficas, en fibrosis dérmicas y de tendones, produciendo disminución del volumen de la cicatriz, desaparición del infiltrado inflamatorio y restablecimiento de la arquitectura dérmica normal de las cicatrices tratadas con este material (16, 36-38).

Experimentalmente se ha reportado que el uso de la combinación de estos medicamentos (AH-CPVP) después de la realización de traqueoplastias y en el trauma de cuerdas vocales, modula la fibrogénesis de colágena durante el proceso de cicatrización, favoreciendo la regeneración tisular con menor inflamación y fibrosis, ya que disminuye la cantidad de colágena formada por gramo de tejido traqueal y de cuerda vocal, lo que mejora la calidad de la cicatrización traqueal (39).

Con base en lo anterior se puede pensar que el colocar una esponja liofilizada de CPVP embebida con AH en OM como soporte después de una cirugía, favorecerá la cicatrización con menor inflamación y formación de adherencias.

II. JUSTIFICACIÓN.

El oído es un órgano expuesto a diferentes patologías infecciosas que tienen como tratamiento de elección la cirugía, cuando el tratamiento médico falla. Sin embargo después de realizar la cirugía, se coloca un material de empaque en OM que le proporcione soporte temporal al injerto y favorezca la cicatrización, éste puede presentar nuevamente la formación de mucosa polipoidea, adherencias, la obliteración del mismo con disminución y pérdida de la audición, lo cual se podría evitar mediante el uso de moduladores de la cicatrización. Por lo anterior en este trabajo se propone el empaquetamiento postquirúrgico del OM con esponjas de colágeno polivinil pirrolidona combinado con la aplicación de ácido hialurónico ya que hay evidencias de que éstos disminuyen la formación de colágena, modulan la organización de la misma y evitan la fibrosis de las heridas.

III. HIPÓTESIS.

Si el ácido hialurónico y la colágeno polivinil pirrolidona (CPVP) favorecen la cicatrización de las heridas de varios órganos, entonces la aplicación de AH y empaquetamiento con esponjas de CPVP después de realizar una cirugía de OM en cobayos, mejorará la cicatrización de la mucosa, evitará la formación de adherencias y la obliteración posquirúrgica del mismo.

IV. OBJETIVOS.

1. Objetivo general.

Determinar el efecto del empaquetamiento con esponja liofilizada de colágeno polivinil pirrolidona embebida en ácido hialurónico, sobre la cicatrización de la mucosa del oído medio, después de realizar una miringotomía en cobayos.

2. Objetivos específicos.

- Evaluar los cambios otoscópicos producidos por el empaquetamiento con esponja liofilizada de colágeno polivinil pirrolidona mezclado con ácido hialurónico sobre la cicatriz formada en la membrana timpánica y mucosa del oído medio, después de realizar una miringotomía en cobayos.

- Valorar los cambios microscópicos producidos por el empaquetamiento con esponja liofilizada de colágeno polivinil pirrolidona mezclado con ácido hialurónico sobre la mucosa de oído medio, después de realizar una miringotomía en cobayos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se realizó un estudio experimental, prospectivo.

1. Recursos.

El financiamiento de esta investigación fue otorgado por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER-ICV).

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, microscópios 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. El responsable de la descripción de los hallazgos histopatológicos, fue el patólogo de este departamento Dr. Miguel Gaxiola Gaxiola.

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

2. Animales de experimentación.

Se utilizaron 24 cobayos de raza Dunkin-Harley, clínicamente sanos, sin importar sexo, ni edad, con un peso entre 500 y 700g. 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 (40) y de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals de los Estados Unidos (41).

2.1. Criterios de inclusión. Se incluyeron cobayos clínicamente sanos, sin antecedentes de alguna enfermedad, ni alteraciones óticas desde su llegada al bioterio del INER-ICV y antes de realizarse el procedimiento quirúrgico de oído.

2.2. Criterios de exclusión. Los animales con datos clínicamente patológicos a su llegada al INER-ICV o con antecedentes de algún procedimiento o enfermedad de oído, fueron excluidos del estudio.

2.3. Criterios de eliminación. Todo animal que presentó signos clínicos de cualquier patología que no haya sido provocada por el empaquetamiento del oído medio, fue eliminado.

3. Grupos de Estudio.

Grupo I (n=6): Miringotomía derecha y empaquetamiento del OM con esponja de colágena bovina absorbible (CBA) (Gelfoam, Pharmacia & Upjohn Company LLC, Minnesota, USA.) y 1 ml solución fisiológica.

Grupo II (n=6): Miringotomía derecha y empaquetamiento del OM con esponja de CBA embebida en AH a dosis de 15 microgramos diluidos en 1 ml de agua destilada (dosis usada para evitar adherencias intraabdominales y estenosis uretrales e intestinales y para prevenir las estenosis traqueales) (Hyaluronic acid potassium SALT, Fluka Laboratory Chemicals, Riedel- de Haën, Germany) (Figura 2) (16).

Grupo III (n=6): Miringotomía derecha y empaquetamiento con esponja de CPVP (que contiene 2.2 mg del fármaco) (Fibroquel, Aspid S.A. de C.V., México D.F) (Figura 3) embebida en 1 ml solución salina.

Grupo IV (n=6): Miringotomía derecha y empaquetamiento con la esponja de CPVP embebida en 15 microgramos de AH diluidos en 1 ml de agua destilada (39).

4. Anestesia.

Los animales se prepararon con 12 horas de ayuno para sólidos y 12 horas para líquidos. La anestesia en todos los grupos de estudio se realizó 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) (35 mg/kg) IM (42). Acto seguido se llevó a cabo tricotomía y lavado con jabón quirúrgico de 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.

5. Técnica quirúrgica.

Con un microscopio (OPMI 19-FC, karl Zeiss, West Germany, Germany), en todos los casos mediante microcirugía se realizó miringotomía derecha con abordaje endaural y empaquetamiento del OM.

Se infiltró con xilocaina al 2% con epinefrina en el CAE en sus cuatro cuadrantes, se realizó una incisión tipo Lempert II, se visualizó la MT (Figura 4), la cual se incidió en el cuadrante anteroinferior con un miringotomo (Figura 5) y se valoró la integridad de la cadena oscicular, acto seguido se procedió al empaquetamiento del OM a través de la miringotomía hasta que la caja fue llenada (Figura 6 y 7), se continuó con el cierre de la incisión Lempert con material de sutura de 4-0 no absorbible (Dermalon, Ethicon, Sao Paulo, Brasil), finalmente se ferulizó el CAE con CBA (Figura 8) y se aplicó mupirocina al 2% (Bactroban, Glaxo Smith Kline, D.F. México) como antibiótico local en la herida.

Previo al empaquetamiento las esponjas liofilizadas de CPVP y CBA, fueron cortadas en cuadros de 1 mm y posteriormente embebidas en 1 ml de AH y SSF dependiendo del grupo de estudio.

6. Evaluación.

6.1. Manejo del material de empaquetamiento.

Se valoró cual de los 2 materiales fue más fácilmente manipulado quirúrgicamente.

6.2. Clínica.

El estudio tuvo una duración de 4 semanas y durante este se realizó evaluación clínica diaria durante la primera semana posquirúrgica y cada tercer día el tiempo restante del estudio. Esta consistió en realizar observación de cada animal dentro de su jaula y se valoró la presencia de infección de la herida quirúrgica, vértigo o nistagmus.

6.3. Otoscópica.

Se realizó evaluación otoscópica postcirugía y al finalizar el estudio. Dentro de esta se evaluó la integridad de la membrana timpánica (MT), grado de retracción de la MT y engrosamiento de esta, presencia de miringoesclerosis, así como la presencia de líquido transtimpánico e infección. También se evaluó el estado de la mucosa (presencia de edema e hiperemia) y residuos del material de empaque en la cavidad del OM.

La valoración de retracción de la MT se realizó mediante la escala descrita por Sadé, Berco, Tos (43): **Grado I:** Membrana timpánica intacta sobre martillo, **Grado II:** Membrana timpánica sobre yunque, **Grado III:** Membrana timpánica atelectásica y **Grado IV:** Membrana timpánica adhesiva.

La presencia de edema e hiperemia en el OM se evaluó como 0= Normal y 1= presencia edema e hiperemia.

La presencia de material de empaque residual en el OM se evaluó de la siguiente manera: 0= Sin material, 1= Presencia de material en el OM.

6.4. Microscópica.

Concluidas las 4 semanas de evaluación los animales se sometieron a eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico (Anestesal, Pfizer, Estado de México, México) y se infiltró formaldehído al 10%, posteriormente se obtuvieron los huesos temporales (Figura 9), los cuales se fijaron durante 24 horas en el formaldehído, concluido este tiempo se disecó toda la mucosa del OM (Figura 10) y fueron embebidas en parafina, se realizaron cortes de 4 micras, se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson y se evaluaron por microscopía de luz.

Histológicamente se valoró la cicatrización de la mucosa del OM e integridad del mismo, grado y presencia de células inflamatorias y colágena. La evaluación de éstos se llevo a cabo en toda la mucosa del OM mediante una escala semi-cuantitativa en la cual a cada parámetro evaluado se le asignó un porcentaje de acuerdo a la intensidad de los cambios histopatológicos (0-10 % ausente, 11-25% leve, 26-50% moderado y del 51-100% severo).

El análisis estadístico de todos los datos se llevó a cabo para observar las diferencias dentro de cada grupo y entre grupos (ANDEVA) y para identificar las diferencias significativas se utilizará la prueba de Tukey. Para comparar la cantidad de material remanente en la cavidad del OM se utilizó una t-student para muestras independientes. Todos los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

Todos los animales sobrevivieron al procedimiento quirúrgico y al tiempo de estudio establecido.

VI. RESULTADOS.

1. Manejo del material de empaquetamiento.

Con respecto al manejo de los materiales de empaquetamiento, se observó que la esponja de CPVP fue más fácil su manipulación e introducción en OM que la CBA.

2. Hallazgos clínicos.

En todos los grupos de estudio, ningún animal (0%) mostró signos clínicos de infección de la herida quirúrgica, vértigo o nistagmus.

3. Hallazgos otoscópicos.

En los animales del grupo I después de retirar la férula del CAE, se observó que ninguno de los cobayo (0%) presentó miringoesclerosis, infección, ni presencia de líquido transtimpánico. En el 16.6 % de los casos (1 cobayo) se presentó perforación de aproximadamente 15% de la MT (Figura 11), mientras que en el 83.4% restante (5 cobayos) se encontró integra. Con respecto al grado de retracción de esta, 1 (16.6%) animal no presentó, 3 (50%) animales desarrollaron retracción grado I y 2 (33.3%) animales presentaron grado II (Gráfica 1). La mucosa del OM en 5 de los animales de experimentación se presentó (83.4%) normal y en 1 (16.6%) animal se encontró con edema e hiperemia (Gráfica 2). Al valorar la cantidad residual de CBA en la cavidad del OM, se observó que 2 (33.3%) animales hubo retención del 10%, 2 (33.3%) del 15%, 1 (16.6%) del 40% y el restante (16.6%) del 50% (Gráfica 3 y 4).

En el grupo II ningún (0%) animal desarrollo miringoesclerosis y solo uno (16.6%) desarrolló una aparente infección con presencia de líquido transtimpánico. Un animal de experimentación (16.6%) presentó perforación de la MT de aproximadamente 30%, mientras que en el 83.4% (5 cobayos) esta se encontró integra, sin embargo en

uno (16.6%) de estos la MT se encontró fibrótica y engrosada. Al evaluar el grado de retracción de la MT, 2 (33.3%) animales no mostraron retracción de esta, 2 (33.3%) presentaron grado I, 1 (16.6%) grado II y el restante (16.6%) grado III (Gráfica 1). La mucosa del OM en 2 (33.3%) casos se observó normal y en los otros 4 (66.6%) hiperémica y edematosa (Gráfica 2). En relación a la cantidad residual de la esponja de CBA, 3 (50%) cobayos no presentaron restos de este material, 2 (33.3%) el 10% y el (16.6%) animal restante 60% (Gráfica 3 y 4).

En los cobayos tratados con la esponja liofilizada de CPVP (grupo III) ningún (0%) animal desarrollo miringoesclerosis, infección o presencia de líquido transtimpánico. Un animal (16.6%) mostró perforación residual del 5% de la miringotomía y en los otros 5 (83.4%) cobayos la MT se encontró íntegra. Con respecto a la retracción, en 3 (50%) no se observó, en 2 (33,3%) grado I y uno desarrollo grado II (16.6%) (Gráfica 1). La mucosa del OM en 5 (83.4%) casos se observó normal y en el cobayo restante con edema leve (16.6%) (Gráfica 2). Al valorar la cantidad residual de la esponja de CPVP, en ningún caso se observó la presencia de esta (Gráfica 3 y 4).

En los animales del grupo IV ningún cobayo (0%) presentó miringoesclerosis, infección, ni presencia de líquido transtimpánico. En el 100 % de los casos (6 cobayo) la MT se encontró íntegra y sin retracción (Gráfica 1), así como con la mucosa normal (Gráfica 2). Al valorar la cantidad residual de la esponja de CPVP en ningún caso (0%) hubo presencia de esta (Gráfica 3 y 4) (Figura 12).

Al comparar la presencia de mirigoesclerosis, infección e integridad de la membrana y engrosamiento de la misma, no se observó ninguna diferencia estadística

significativa ($p=NS$ ANDEVA, Tukey) al comparar dentro de cada grupo y entre los grupos.

Al valorar el grado de retracción entre grupos se observó que los animales tratados con CPVP y CPVP + AH muestran menor grado de retracción que los tratados con Gelfoam, sin embargo solo fue significativo la menor retracción del grupo IV en comparación con el grupo I ($p<0.02$, ANDEVA, $p<0.01$, Tukey) (Gráfica 1).

En relación al estado de la mucosa al final del estudio, se observó que los animales del grupo II desarrollaron mayor edema e hiperemia que los otros 3 grupos de estudio ($p<0.05$, ANDEVA, Tukey). (Gráfica 2).

Con respecto a la presencia de material residual de empaque dentro de cada grupo no se observó diferencia ($p=NS$, ANDEVA, Tukey), pero al comparar entre grupos los animales tratados con la esponja de CBA mostraron mayor cantidad de este que los tratados con la de CPVP ($p<0.01$, ANDEVA, Tukey) (Gráfica 3 y 4)

4. Hallazgos microscópicos.

En ningún caso hubo presencia de fibras de colágena de nueva formación.

Los estudios de microscopía de luz de los animales del grupo I mostraron que en el 100% de los casos desarrollaron inflamación de la mucosa de OM, severa en 3 casos (50%), 2 (33.3%) moderado y 1 (16.6%) leve (Gráfica 5). En todos los casos (100%) se observó infiltrado linfocitario, en 3 (50%) neutrófilos y macrófagos, de los cuales 2 (33.3%) mostraron microabscesos y 1 (16.6%) células gigantes a cuerpo extraño, además 3 (50%) animales desarrollaron reacción fibroblástica (Figura 13).

En el grupo II también se observó inflamación de la mucosa del OM en todos (100%) los animales. En 5 (83.4%) esta fue severa y en 1 (16.6%) leve (Gráfica 5). En todos

los casos (100%) se presentó infiltrado linfocitario, 2 (33.3%) mostraron neutrófilos, macrófagos, microabscesos, así como células gigantes a cuerpo extraño, ningún (0%) animal mostró reacción fibroblástica (Figura 14).

El estudio histológico en el grupo III reveló que en el 100% de los casos se presentó inflamación de los cuales 2 (33.3%) fue severa, 1 (16.6%) moderada y 3 (50%) leve (Gráfica 5). También en el 100% de los casos se observó infiltrado linfocitario, 1 animal (16.6%) mostró engrosamiento de la lámina propia con presencia de neutrófilos, macrófagos y células gigantes a cuerpo extraño, además en 2 (33.3%) animales se observó reacción fibroblástica (Figura 15).

En el grupo IV, 1 (16.6%) animal mostró inflamación leve y otro (16.6%) moderada a base de linfocitos (Gráfica 5), además el 100% de los animales (6 cobayos) presentaron reacción fibroblástica. En ningún caso se observaron microabscesos, neutrófilos, macrófagos, ni células gigantes a cuerpo extraño (Figura 16).

El grado de inflamación dentro de cada grupo no mostró diferencia importante, pero al compararla entre grupos, los animales en los que el oído se empaquetó con CPVP + AH desarrollaron menor reacción inflamatoria ($p < 0.01$, ANDEVA, Tukey) (Gráfica 6).

La reacción fibroblástica observada en los animales tratados con la CPVP (grupo III) y CPVP+AH (grupo IV) mostró diferencia significativa ($p < 0.01$, ANDEVA, Tukey) al compararse con los grupos tratados con gelfoam (grupos I y II) (Gráfica 7).

VII. DISCUSIÓN.

En cirugía de oído se utilizan empaques para dar soporte estructural en prótesis osculares, injertos para timpanoplastías o en colgajos de CAE (44), así como también para favorecer la cicatrización evitando y/o disminuyendo la inflamación, edema de la mucosa de OM, formación de adherencias, obliteración del mismo con disminución y pérdida de la audición (9).

Aunque existen reportes experimentales del uso de diferentes materiales, hasta la fecha no se ha encontrado uno que permanezca el tiempo suficiente para que se establezca una cicatrización adecuada y se elimine completamente para evitar el daño anatómico, así como funcional del oído (45,46).

Para el empaquetamiento se han utilizado materiales como las placas de ácido poliglicólico (13), esponjas de colágena bovina absorbible solas o en combinación con ácido hialurónico, solución fisiológica, esteroide, sin embargo, ninguno ha mostrado ser el ideal, ya que no se eliminan en el tiempo adecuado y provocan diferentes grados de inflamación, fibrosis o no conserva la consistencia y volumen original del material de empaque que provoca que se elimine antes de que se establezca la cicatrización (10,14,47-49). Es por lo que es necesario buscar nuevos materiales que sirvan como soporte y favorecer la cicatrización de la mucosa del OM postcirugía.

La colágena polivinil-pirrolidona (CPVP) es un fármaco que existe en forma de líquido y liofilizada. Es una mezcla de colágena porcina del tipo I y polivinil-pirrolidona, la cual actúa como remodelador de procesos fibrosos (32-34) y se ha utilizado para el tratamiento de las cicatrices quelóides e hipertróficas, en fibrosis dérmicas, de tendones y en tráquea, produciendo disminución de los síntomas y el volumen de la

cicatriz, así como la inhibición del infiltrado inflamatorio y el restablecimiento de la arquitectura normal de los tejidos (16, 36-38,50)

Este es un medicamento no tóxico que se ha probado en estudios controlados utilizando voluntarios sanos y pacientes con cicatrices hipertroficas, a los cuales se les ha aplicado y no han mostrado efectos colaterales en un seguimiento de 14 años (51).

Se ha reportado que el uso de este medicamento combinado con ácido hialurónico (AH), disminuye la inflamación y la cantidad de colágena formada por gramo de tejido durante la cicatrización, cuando se ha utilizado en tráquea y cuerdas vocales (39).

En este trabajo, se evaluaron los cambios otoscópicos y microscópicos producidos por el empaquetamiento postquirúrgico del OM con esponjas de colágeno polivinil pirrolidona liofilizadas embebidas en ácido hialurónico.

Los cobayos fueron seleccionados como modelo animal porque las dimensiones de la MT y del OM son grandes (similares al del humano), siendo los abordajes quirúrgicos factibles, ya sea transcanal, retroauricular y endaural, con mínima pérdida de sangre y baja mortalidad (52) .

En este estudio, se realizó un abordaje endaural que permitió ampliar el campo visual del CAE del cobayo y visualizar adecuadamente la MT y OM, lo cual coincide con lo que describen otros autores, los cuales mencionan que el realizar este tipo de abordajes utilizando incisiones tipo Lempert permite al cirujano adaptarse a cualquier situación inesperada durante la cirugía (5).

Durante la realización de este trabajo se observó que las esponjas liofilizadas de CPVP al ser introducidas en el OM, tienen gran expansibilidad con lo que aportan un buen soporte al mismo como lo hacen otros empaques convencionales, además su

capacidad de absorber mayor cantidad de AH evita que este se elimine en su totalidad por la trompa de Eustaquio y tenga que ser aplicado después de la cirugía en varias ocasiones como lo han descrito Rivas (53), Stenfors (54), Ozturk (55) y Li (56).

Con respecto a la presencia de perforación en la MT de 2 animales tratados con CBA y 1 con CPVP sin AH se puede pensar que esta fue originada porque el tamaño de la incisión de la miringotomía fue de mayor longitud a la de la realizada en los otros animales y no hubo la suficiente migración celular para permitir el cierre de esta, además de que posiblemente la falta de AH no favoreció dicha migración como lo describen otros autores que han trabajado con este fármaco y han observado que el AH actúa como un soporte mecánico y que facilita esta (49, 55, 57).

La opacidad de la MT que se observó en un animal del grupo II se puede pensar que fue originada porque hubo una mayor inflamación y formación de tejido cicatrizal como lo describe Amoils (58) y Kutluhan (49) quienes trabajaron con modelos experimentales de membranas timpánicas perforadas y las trataron con CBA, así como con AH y mencionan que la aplicación de AH en la membrana perforada influye sobre la calidad estructural de la cicatrización de la misma, ya que las no tratadas muestran áreas opacas de tejido cicatrizal, mientras que las tratadas se observan más delgadas y con poco tejido cicatrizal. Esto se debe a que produce una más rápida reorganización de las capas fibrosas y más rápida orientación de las fibras de colágena. En este trabajo también observamos que el empaquetamiento con la esponja de CPVP y la CPVP embebida en AH permite mantener delgadas y con poco tejido cicatrizal a las membranas timpánicas operadas, lo que indica que estos

fármacos disminuyen la inflamación local y periférica, así como la cantidad de colágena formada como lo han descrito otros autores (16,50)

La menor retracción de la MT observada en los animales tratados con CPVP y CPVP y AH en comparación con los de CBA pudo ser ocasionado porque estos animales mostraron menor inflamación, formación de colágena y organización de la misma (16,50,59,60) y coinciden con lo reportado por Stenfeldt et al quienes mencionan que los procesos inflamatorios de la MT producen daño en su colágena y en la fuerza mecánica de la misma, la cual llega a debilitarse en los áreas donde la colágena esta afectada y termina retrayéndose (61).

En relación al mayor grado de edema e hiperémia que se observo al final del estudio en la mucosa del OM de los animales tratados con CBA, posiblemente fue ocasionado porque el material de empaque residual actuó como cuerpo extraño y al estar en contacto con la mucosa exacerbo la respuesta inflamatoria en su fase de fagocitosis, así como de degradación y coincide con lo descrito por Hellström (10,11,56,63), Laurent, Li y Suárez quienes mencionan que un resultado postoperatorio indeseable cuando la CBA no se absorbe puede incrementar la reacción inflamatoria, proliferación de fibroblastos y formación de tejido fibroso. Mientras que en los animales tratados con CPVP y con la CPVP-AH hubo presencia de edema e hiperemia, porque esta se degradó más rápido que la CBA y sus características para disminuir la reacción inflamatoria aunada a la del AH evitaron la presencia de estos (16,50, 51,63).

Con respecto a la ausencia total de material residual de empaque en los animales que se utilizó CPVP posiblemente fue ocasionada porque la asociación de la colágena polivinil pirrolidona y los enlaces cruzados favorecidos por la gamma

irradiación, permiten que esta sea degradada fácilmente y le confieren varias propiedades físico-químicas como la imposibilidad de formar geles cuando se diluye a 37°C (51) a diferencia de la CBA que si modifica sus características físico-químicas.

El menor grado de inflamación observado en los animales en los que el oído se empaquetó con CPVP + AH, fue debido a que la primera interrumpe el proceso inflamatorio crónico disminuye la producción parcial de factores solubles fibrogénicos, infiltrado inflamatorio (51), mientras que el AH disminuye el proceso inflamatorio agudo local y periférico (17,64). Aunque esto también puede ser atribuido a las propiedades fisicoquímicas de la CPVP que hace que se desintegre de forma rápida, sin causar reacción a cuerpo extraño (51). A diferencia de la CBA que tarda más en degradarse y actúa como cuerpo extraño en el OM.

En el estudio histológico, la presencia de neutrofilia y macrófagos fue provocada por la misma función de estos durante la reparación de las heridas, que es la de limpiar los detritus del área dañada y en este caso, en los animales tratados CBA se incrementó esta respuesta por la presencia de material residual de empaque (65), a diferencia de los tratados con la mezcla en la que se disminuye tanto la inflamación aguda como la crónica.

La inflamación severa con presencia de linfocitos mostró que existe proceso de inflamación crónica a diferencia de los animales del grupo de AH y CPVP en donde éstos no se presentaron. Estos hallazgos coinciden con los de otros autores que mencionan que en presencia de éstos se disminuye la inflamación (8,59).

Las células gigantes a cuerpo extraño que se observaron en los grupos tratados con CBA, indican la presencia de una respuesta de inflamación crónica granulomatosa,

en la que la CBA residual de empaque provocó la fusión de los macrófagos que fueron a fagocitarlo y por eso se formaron las células gigantes a cuerpo extraño (60). La reacción fibroblástica observada en los animales tratados con CPVP se presentó debido a que la mucosa se encontraba durante la fase de remodelación de la herida en la que los fibroblastos empiezan a disminuir, a diferencia de los animales tratados con CBA en la que se observó que el proceso de reparación estaba en la fase de inflamación tardía y proliferativa por la presencia de material residual de empaque (66).

VIII. CONCLUSIONES.

- El cobayo es un buen modelo experimental para la cirugía de oído medio.
- Las esponjas liofilizadas de CPVP son de fácil manejo quirúrgico, poseen gran expansibilidad y se absorben rápidamente.
- El empaquetamiento del OM con la esponja liofilizada de CPVP embebida en AH después de realizar una miringotomía en cobayo, favorece la cicatrización de la mucosa con menor inflamación, sin formación de adherencias, ni fibrosis del OM.

IX. FIGURAS.



Figura 1. Se observa la esponja de colágena bovina absorbible. (CBA)



Figura 2. Acido hialurónico. (AH).



Figura 3. Esponja liofilizada de colágeno polivinil pirrolidona. (CPVP).



Figura 4. Valoración de la membrana timpánica (MT), mango del martillo (MM) y el reflejo luminoso (RL) después de la realización de la insición tipo Lempert II (IL).



Figura 5. Miringotomía.



Figura 6. Muestra como fue introducida la esponja liofilizada de CPVP embebida en AH.



Figura 7. Fin empaquetamiento del OM de un animal del grupo IV.

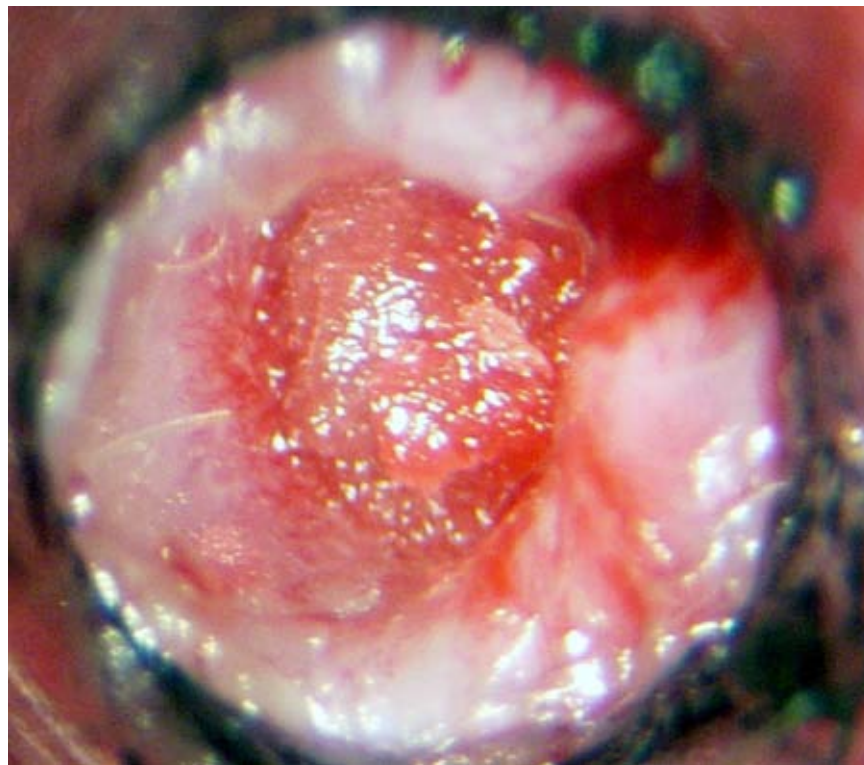


Figura 8. Ferulización de CAE con CBA en un animal del grupo II.



Figura 9. Disección del hueso temporal del un cobayo del grupo IV en el que se observa el OM, MT, laberinto óseo de la cóclea (C) al final del estudio.

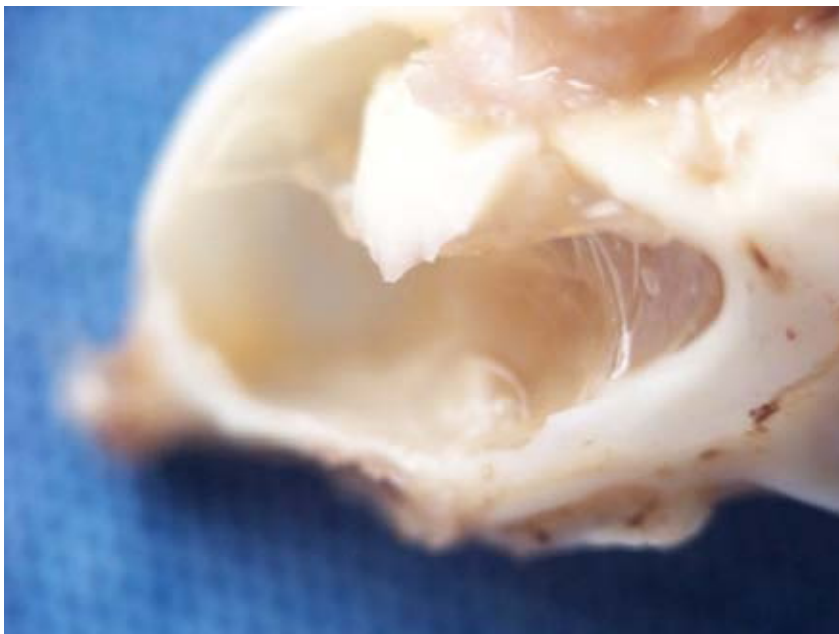


Figura 10. Se observa la mucosa del OM antes de ser disecada para ser sometida a su estudio histológico.



Figura 11. Se observa perforación de la MT de aproximadamente el 20% al finalizar el estudio, en un animal del grupo I.



Figura 12. Muestra la integridad de la MT y la ausencia de material de empaque residual en un animal tratado con la mezcla de CPVP-AH (grupo IV) al término del estudio.

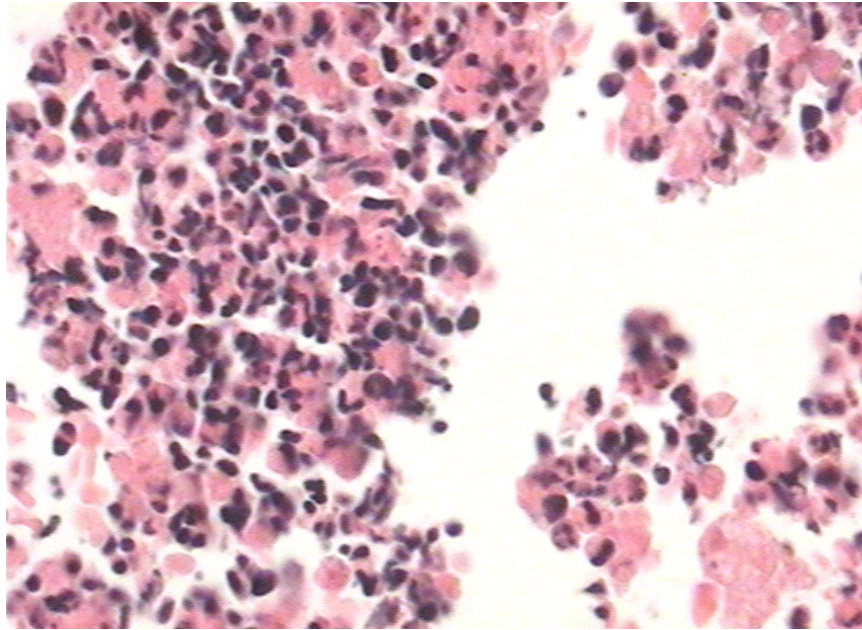


Figura 13. Microfotografía de la mucosa del oído medio de un animal del grupo I en la que se observa el infiltrado inflamatorio de moderado a severo, presencia de neutrófilos (absceso) y macrófagos.

Tinción HE 40X.

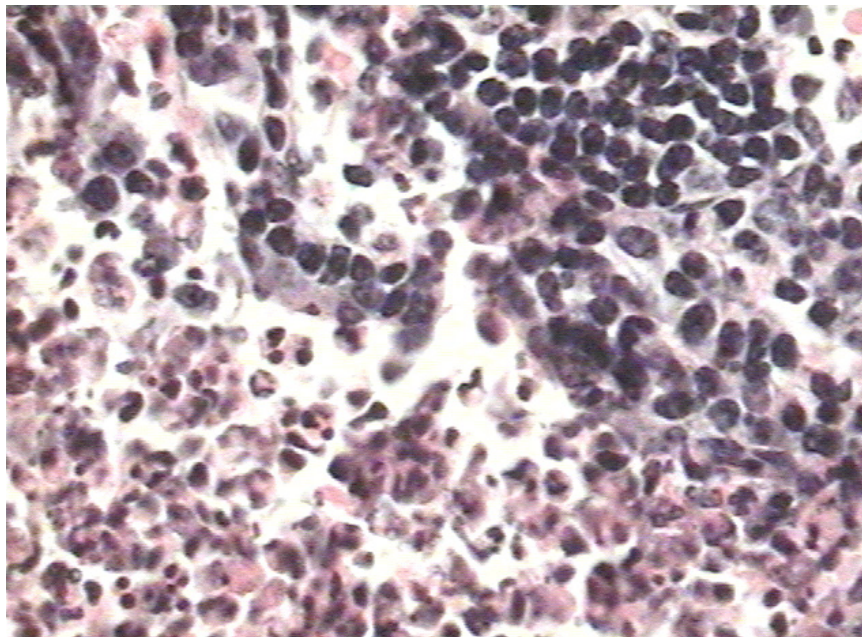


Figura 14. Microfotografía de la mucosa del oído medio de un cobayo tratado con CBA y AH (grupo II), que muestra infiltrado inflamatorio severo de predominio linfocitario y neutrofílico, con presencia de microabscesos. Tinción HE 40X.

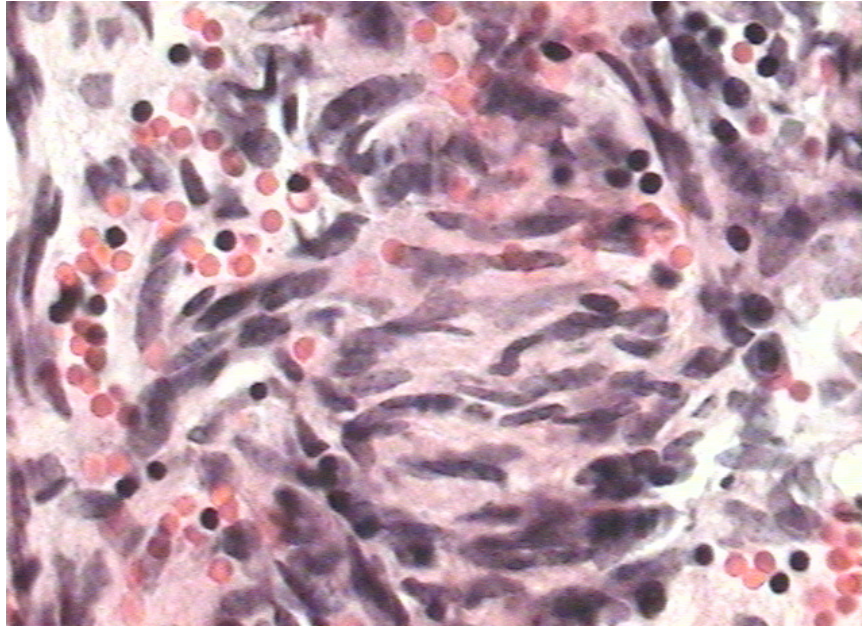


Figura 15. Microfotografía de la mucosa del oído medio de un cobayo tratado con la esponja liofilizada de CPVP que muestra la presencia de infiltrado inflamatorio moderado de predominio linfocitario, presencia de proliferación de fibroblastos leve. Tinción HE, 40X

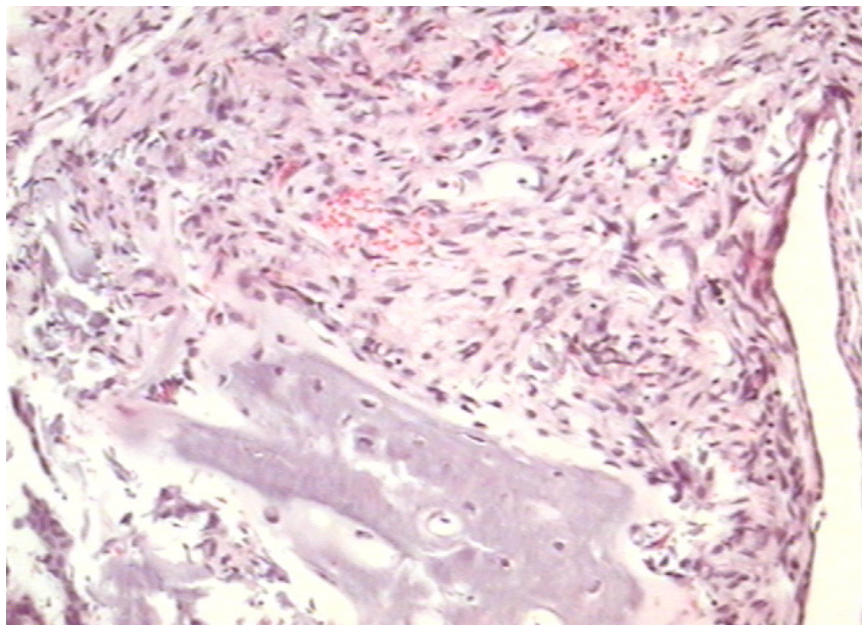
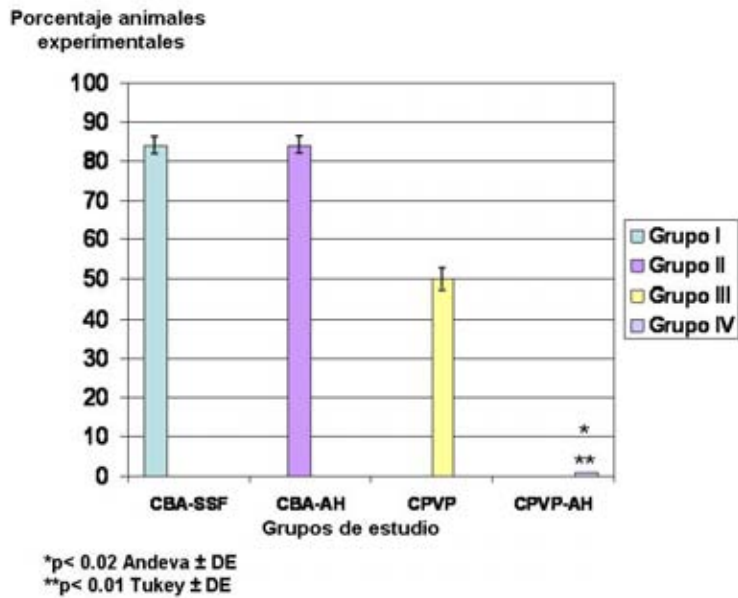


Figura 16. Microfotografía de la mucosa del oído medio de un animal del grupo IV en la que se observa la reacción fibroblástica. Tinción HE, 10X

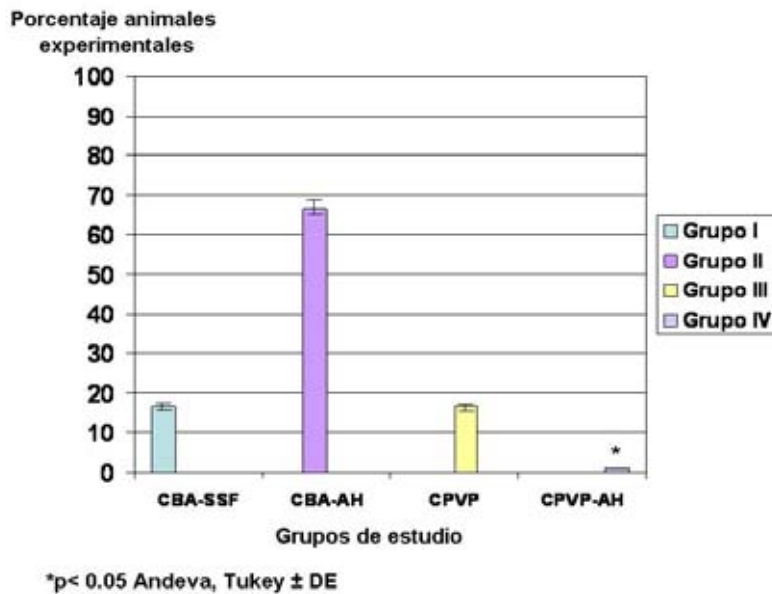
X. GRAFICAS.

Animales con retracción de la membrana timpánica al final del estudio



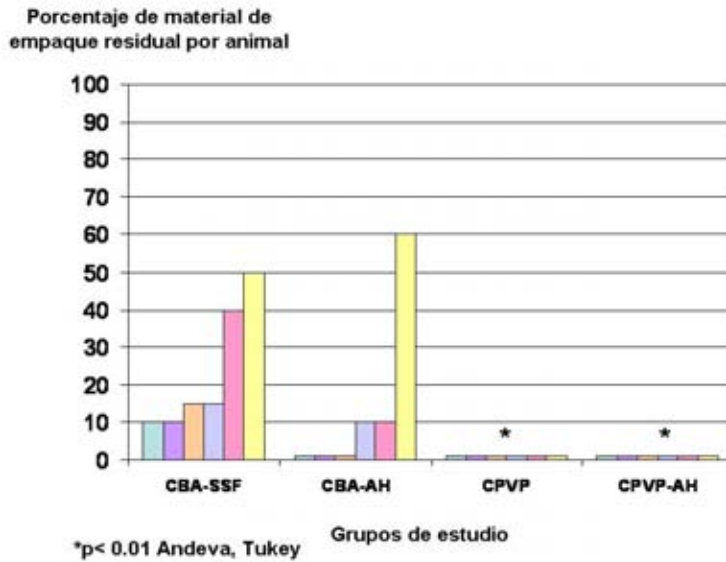
Grafica 1. Muestra el grado de retracción de la membrana timpánica al final del estudio en todos los grupos de estudio.

Animales con edema e hiperemia de la mucosa del oído medio a la evaluación otoscópica al final del estudio.



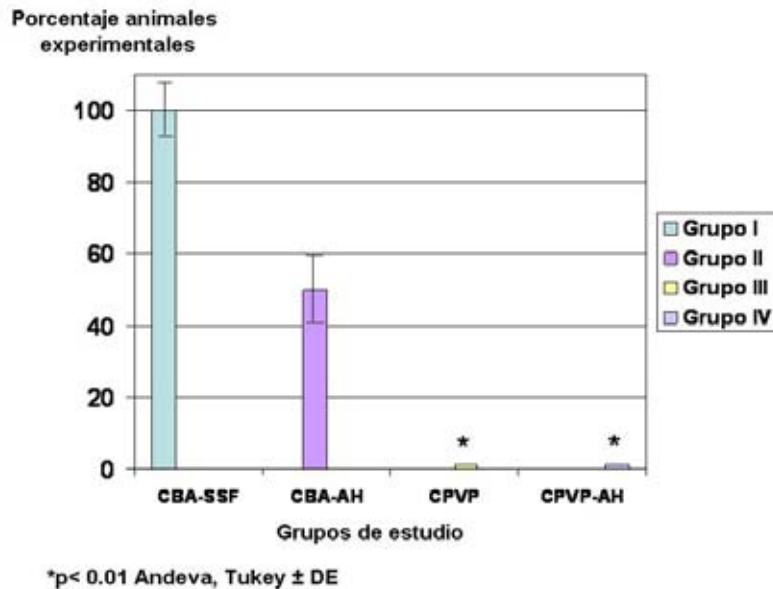
Grafica 2. Se observa la menor presencia (*) de edema e hiperemia en el grupo IV en comparación con los otros 3 grupos de estudio.

Cantidad de material residual en oído medio al final del estudio.



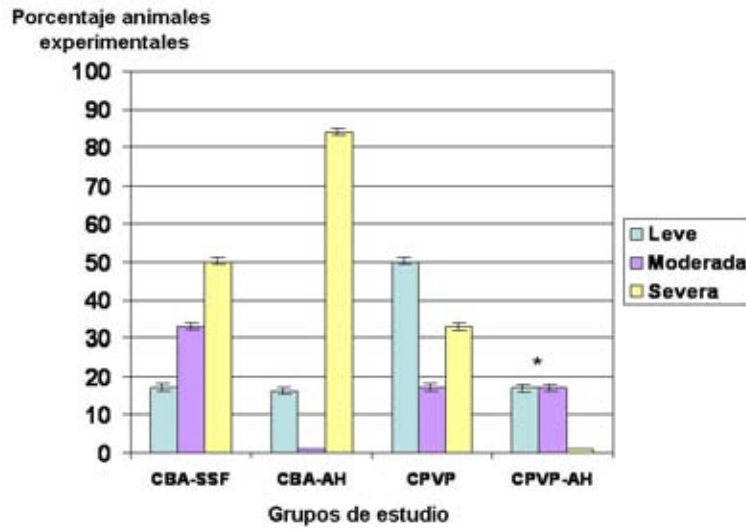
Grafica 3. Porcentaje de material residual de empaque en la cavidad del oído medio por animal de experimentación en cada grupo de estudio al final del estudio.

Animales con material residual en oído medio al final del estudio.



Grafica 4. Porcentaje de animales que mostraron material residual de empaque en la cavidad del oído medio al final del estudio.

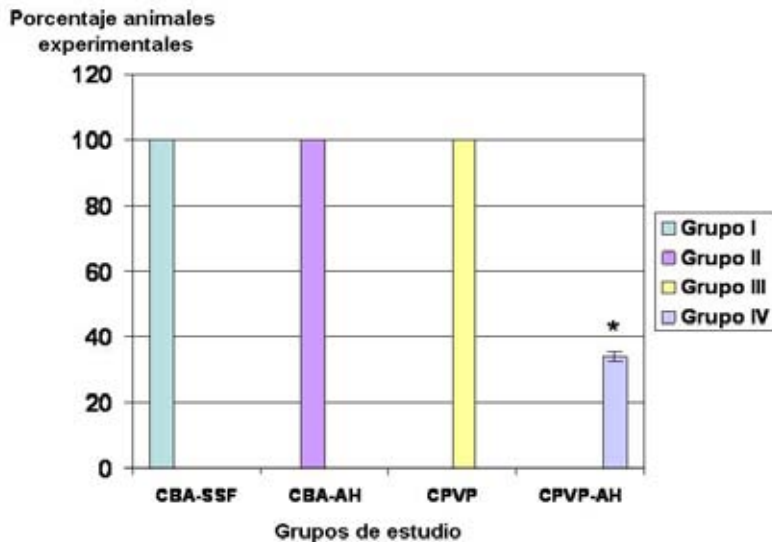
Grado de inflamación microscópica en la mucosa del oído medio al final del estudio.



*p < 0.01 Andeva, Tukey ± DE

Grafica 5. (*) Muestra el menor grado de inflamación microscópico observado en los animales del grupo IV al final del estudio.

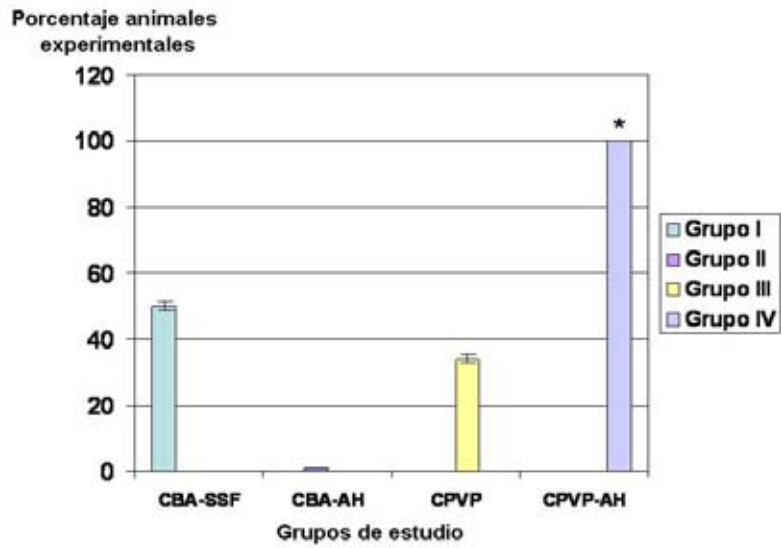
Animales con inflamación microscópica en la mucosa del oído medio al final del estudio



*p < 0.01 Andeva, Tukey ± DE

Grafica 6. Muestra el porcentaje de animales de cada grupo que mostraron inflamación de la mucosa del oído medio al final del estudio.

Reacción fibroblástica en la mucosa del oído medio al final del estudio.



*p < 0.01 Andeva, Tukey ± DE

Grafica 7. Muestra el porcentaje de animales por grupo que mostraron reacción fibroblástica en la mucosa del oído medio al final del estudio.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

1.- 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.

2.- Jordan M. Clinical Approach to treatment of otitis. En Goycoolea MV. Otitis media: The pathogenesis approach. Otolaryngologic Clinics North America. 1991; 24:901-904.

3.- Junk TT, Rhee Ch. Otolaryngologic approach to the diagnosis and management of otitis media. En Goycoolea MV. Otitis media: The pathogenesis approach. Otolaryngologic Clinics North America. 1991; 24:931-945.

4.- Sismanis A. Assessment and treatment of associated upper respiratory tract pathology. En Goycoolea MV. Otitis media: The pathogenesis approach. Otolaryngologic Clinics North America. 1991; 24: 947-955.

5.- Selaimen Da Costa S, Alvez de Souza LC, Toledo Piza MR. The flexible endaural tympanoplasty. Pathology-guided, pathogenesis-oriented surgery for the middle ear. En Paparella MM. Otitis media: Surgical Principles Based on Pathogenesis. Otolaryngologic Clinics North America. 1999; 32: 413-441.

6.- Vambutas A, Paparella MM. Tympanoplasty Prudent considerations of silent otitis media and interactions of middle ear and inner ear. En Paparella MM. Otitis media:

Surgical Principles Based on Pathogenesis. Otolaryngologic Clinics North America. 1999; 32: 505-512.

7.- El-Kashlan HK, Harper LA. Tympanoplasty and ossiculoplasty. En Cummings CW, Flint PW, Harper LA, Haughey BH et al. Otolaryngology Head and Neck Surgery. Vol 4, 4th ed. Elsevier Mosby Philadelphia USA, 2005 3058-3074

8.- Krupala JL, Gianoli GJ, Smith RA. The efficacy of hyaluronic acid foam as a middle ear packing agent in experimental tympanoplasty. Am J Otol. 1998; 19: 546-550.

9.- Angeli S, Contiell S, Gibson B, Ozdek A, McElveen JT, Jr, Van De Water TM. Injectable Form of Cross-Linked Hyaluronan Is Effective for Middle Ear Wound Healing. Annals of Otology, Rhinology and Laryngology. 2007; 116: 667-673.

10.- Hellstrom S, Salen B, Stenfors LE. Absorbable gelatin sponge (Gelfoam) in otosurgery: one cause of undesirable postoperative results? Acta Otolaryngol (Stockh) 1983;96:269-275.

11.- Laurent C, Hellstrom S, Stenfors LH. Hyaluronic acid reduces connective tissue formation in middle ears filled with absorbable gelatin sponge: an experimental study. Am J Otolaryngol 1986;7:181-186.

12.- Liening DA, Lundy L, Silberberg B, Finstien K. A comparison of the biocompatibility of three absorbable hemostatic agents in the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 116:454-457.

13.- Peltonen LI, Jero J, Sukura A, Pistola L, Konttinen YT, and Aarnisalo AA. Biocompatibility of Polylactides in the Middle Ear: An Experimental Animal Study. *Otology and Neurotology*. 2007; 28: 850-853.

14.- Laurent C, Hellstrom S, Appelgren LE, Sehlin J, Lilja K. Fate of exogenous hyaluronic acid in the middle ear. *Am J Otolaryngol* 1986;7:334-40.

15.- Longaker MT, Harrison MR, Crombleholme TM, et al. Studies in Fetal Wound Healing: I. A Factor in Fetal Serum that Stimulates Deposition of Hialuronic Acid. *J Pediatr Surg*. 1989; 24: 789-792.

16.- Olmos-Zuñiga JR, Santos-Cordero A, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola M, Mora-Fol R, Franco-Oropeza A y Santillan-Doherty P. Efecto del ácido hialurónico sobre la cicatrización traqueal en un modelo experimental canino. *Acta Otorrinolaringológica Española*. 2004; 55: 81-8.

17.- Longaker MT, Whitby DJ, Adzick NS et al. Studies in Fetal Wound Healing: VI. Second and Early Third Trimester Fetal Wound Demonstrate Rapid Collagen Deposition without Scar Formation. *J Pediatr Surg*. 1990; 25: 63-69.

18.- Simon LS. Viscosupplementation Therapy with Intra-articular Hyaluronic Acid. Fact or Fantasy? *Reumatic Diseases Clinics of North America*. 1999; 25: 345-357.

19.- Wen DY. Intra-articular Hyaluronic Acid Injection for Knee Osteoarthritis. *American Family Physician*. 2000; 62: 565-570.

20.- Sawada T, Hasegawa K, Tsukada K, et al: Adhesion Preventive Effect of Hyaluronic Acid after Intraperitoneal Surgery in Mice. *Human Reproduction*. 1999; 14: 1470-1472.

21.- Duranti F, Salti G, Bovani B, et al: Injectable Hyaluronic Acid Gel for Soft Tissue Augmentation. A Clinical and Histological Study. *Dermatologic Surgery*. 1998; 24: 1317-1325.

22.- Italiano G, Abatangelo G Jr, Calabro A, et al: Guiding Spontaneous Tissue Regeneration for Urethral Reconstruction: Long-term Studies in the Rabbit. *Urological Research*. 1998; 26: 281-284.

23.- Porru D, Campus G, Tudino D, et al. Result of Treatment of Refractory Interstitial Cystitis with Intravesical Hyaluronic Acid. *Urologia Internationalis* 1997; 59: 26-29.

24.- Italiano G, Abatangelo G Jr, Calabro A, et al: Reconstructive Surgery of the Urethra: A Pilot Study in the Rabbit on the Use of Hyaluronan Benzyl Ester (Hyaff-11) Biodegradable Grafts. *Urological Research*. 1997; 25: 137-142.

- 25.- Hernández AG: Efectos del Ácido Hialurónico Sobre el Mecanismo de Cicatrización en la Anastomosis de Uretra. Un estudio Experimental. (Tesis de Especialidad). México, D. F.: Facultad de Medicina. U.N.A.M. 2000.
- 26.- Lackgren G, Wahlin N, Stenberg A: Endoscopic Treatment of Children with Vesico-ureteric Reflux. *Acta Pediátrica Suppl* 1999; 88: 62-67.
- 27.- Nakagawa M, Tanaka M, Miyata T: Evaluation of Collagen Gel and Hyaluronic Acid as Vitreous Substitutes. *Ophthalmic Research*. 1997; 29(6):409-420.
- 28.- De la Cruz YH: Efecto del Ácido Hialurónico Sobre el Mecanismo de Cicatrización del Intestino. Estudio Experimental. (Tesis de Especialidad). México, D.F.: Facultad de Medicina. UNAM. 1993.
- 29.- Quiroz GJ: Efecto del Ácido Hialurónico Sobre el Mecanismo de Cicatrización del Esófago con Quemadura por Cáustico. Un estudio Experimental. (Tesis de Especialidad). México, D. F.: Facultad de Medicina. UNAM. 1996.
- 30.- Chan RW, Titze IR: Hyaluronic Acid (With Fibronectin) as a Bioimplante for the Vocal Fold Mucosa. *Laryngoscope* 1997; 109: 1942-1949.
- 31.- Soldati D, Rahm F, Pasche P: Mucosal Wound Healing After Nasal Surgery. A Controlled Clinical Trial on the Efficacy of Hyaluronic Acid Containing Cream. *Drug under Experimental and Clinical Research*. 1999; 25: 253-261.

32.- Chimal J, Bravo T, Krotz F and Díaz L. Implantes de fibroquel aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata: un estudio histológico. Rev. Biomed 1997; 8: 81-88.

33.- Chimal J, Lira M, De la Cruz et al. Healing of fractures rat femoral bones enhanced by fibroquel. A radiological, histological and histochemistry study. Wound Repair and Regeneration. 1996; 4: A147.

34.- Krotz Gómez Fernando Edgar. Modulación del metabolismo celular por colágena-pvp (Tesis doctoral). México, D.F., CCH, 1999.)

35.- Furuzawa C.J., Krötzsch G.F., Reyes R. and Díaz L. Inhibition of the Expression of Adhesión Molecules ELAM-1 and VCMA-1 in Human Skin Biopsies from Hypertrophic and Keloid Scar Treated. Wound Repair and Regeneration 1996; 4: A137.

36.- Charous SJ, Ossof RH, Reinisch L and Davidson JM. Canine subglotic stenosis as a model for excessive fibrosis: a pilot immunohistochemical analysis. Wound Rep. Reg. 1996; 4: 444-453.

37.- Darzi MA, Chowdri NA, Kaul SK and Khan M. Evaluation of various methods of treating keloids and hypertrophic scar: A 10 years follow up study. British Journal of Plastic Surgery. 1992; 45: 374-79.

38.- Loyola-Garcia U. Respuesta Terapéutica A La Colágeno-Polivinil Pirrolidona En Un Modelo Experimental De Estenosis Traqueal Canino. Tesis Especialidad de Cirugía Torácica. México D.F. Facultad de Medicina. UNAM, 2001.

39.- Santillán Artolózaga Alberto. Efecto de diferentes moduladores cicatrízales en la traqueoplastía. Tesis Especialidad de Otorrinolaringología, Cirugía de Cabeza y Cuello. México D.F. Facultad de Medicina. UNAM, 2006.

40.- 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.

41.- 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.

42.- 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.

43.- Chole RA, Sudhoff HH. Cap 133. Chronic otitis media, mastoiditis and petrositis. En Cummings CW, Flint PW, Harper LA, Haughey BH etal. Otolaryngology Head and Neck Surgery. Vol 4, 4th ed. Elseiver Mosby Philadelphia USA, 2005; 2988-3012.

44.- Park AH, Jackson A, Hunter L McGill L, Simonse SE, Alder SC, Zheng XZ, Cross-Linked Hydrogels for middle Ear parking. Otolology & Neurotology. 2006; 27: 1170-1175.

45.- Bagger-Sjoberg D. Sodium hyaluronate application to the open inner ear: an ultrastructural investigation. Am J Otol 1991; 12:35-39.

46.- Laurent C. Hellstrom S. Anniki M. Inner ear effects of exogenous hyaluronan in the middle ear of the rat. Acta Otolaryngol (Stockh) 1988;105:273-280.

47.- Martini A. Morra B. Aimoni C, Radice M. Use of a hyaluronan-based biomembrane in the treatment of chronic cholesteatomatous otitis media. Am J Otol 2000; 21: 468-473.)

48.- Angeli SI. Hyaluronate gel stapedectomy. Otolaryngol Head Neck Surg 2006; 134:225-231.)

49.- Kutluhan A, Ugras S, Inalkac E, Akpolat N. The effects of hyaluronic acid on myringoplasty in rats. Tr. J. of Medical Sciences. 1999, 29: 401-407.

50.- Olmos-Zúñiga JR, Hernández-Jiménez C, Díaz-Martínez E, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A, Gaxiola-Gaxiola M, Villalba-Caloca J, Baltazares-Lipp M, Santillán-Doherty P, Santibáñez-Salgado JA. Wound Healing Modulators In A Tracheoplasty Canine Model. *Journal Of Investigative Surgery*; 2007; 20: 333-338.

51.- Krötzsch E, Díaz de León E, Furuzawa GJ, Marquez R, Quiroz E, Citokine expresión is down regulated by collagen/polinyllpirrolidone in hyperthrophic scars J. *Invest Dermatol*. 1998; 111: 828-834.

52.- Arch-Tirado E,Verduzco-Mendoza A, Azuara-Pliego E, Hernández-Orozco F, Collado-Corona MA. Utilidad del cobayo como modelo de estudios audiológicos y propuesta de accesos quirúrgicos al oído y cuello. *Cir Ciruj* 2005;73:339-344.

53.- Rivas MP, Casain T, Alonso A. Effects of sodium hyaluronate on tympanic membrana perforations. *J Int Med Res*. 1992; 20: 353-359

54.- Stenfors LE. Repair of tympanic membrana perforations using hyaluronic acid: an alternative to myringoplasty. *J Laryngol Otol*. 1989; 103: 39-4.)

55.- Ozturk K, Yaman H, Cihat Avunduk M, Arbag H, Keles B, Uyar Y. Effectiveness of merogel hyaluronic acid on tympanic membrana perforations. *Acta Otolarigol*; 2006; 126: 1158-1163.

56.- Li G, Feghali JG, Dinces E, McElveen Van De Water T. Evaluation of esterified hyaluronic acid as middle ear-packing material. Arch otolaryngol Head Neck Surg. 2001; 127: 534-539.

57.- Culp LA, Molecular composition and origin of substrate attached material from normal and virus transformed cells. J. Supramol Struct. 1976; 239-255.

58.- 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.

59.- Mast BA, Diegelman RF, Krummel TM, Cohen IK. Scarless Wound Healing In The Mammalian Fetus. Surg Gynecol Obstet. 1992; 174: 441-51.

60.- Peacock EE. Control of wound healing and scar formation in surgical patients. Arch Surg. 1981; 116: 1325-1329.

61.- Stenfeldt K, Johansson C, Hellström S. The Collagen Structure of the Tympanic Membrane Collagen Types I, II, and III in the Healthy Tympanic Membrane, During Healing of a Perforation, and during Infection. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2006;132:293-298.

62.- Halloran C, Slavin P, Pathophysiology of wound healing. Pathophysiology of Wound Healing . Surgery (Oxford). 20: I-V.

63.- Suárez Colin A, Salgado RM, Apis AM, Kröttsch E. Inducción del tejido de granulación por pasta de Lassar vs colágena polivinil pirrolidona en úlceras por insuficiencia venosa. Cir Plast. 2004; 14: 5-13.

64.- Adolph VR, DiSanto SK, Bleacher JC, et al: The Potential Role of the Lymphocyte in Fetal Wound Healing. J. Pediatric Surg. 1993; 28: 1316-1620.

65.- Williamson D, Harding K. Wound Healing. Medicine. 2000; 28: 3-6.

66.- Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. Surgery. 2005; 23: 37-42.