



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Miringoplastia con Membrana Amniótica en un
Modelo Murino de Perforación Timpánica
Cronificada

D^a Nathalie Fages Cárceles

2022



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Miringoplastia con Membrana Amniótica en un
Modelo Murino de Perforación Timpánica
Cronificada

D^a Nathalie Fages Cárceles

2022



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Miringoplastia con Membrana Amniótica en un Modelo Murino de Perforación Timpánica Cronificada

D^a Nathalie Fages Cárceles

DIRECTORES

Tomás Esteban Sánchez

Noemí Marín Atucha

MURCIA 2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer al Dr. Tomás Esteban Sánchez el haberme impulsado y motivado para hacer esta tesis, gracias por tu ayuda incondicional en todo el recorrido de este proyecto, sin ti no habría sido posible.

También agradecer a la Dra. Noemí Marín Atucha por su gran ayuda en el laboratorio y por guiarme, así como al Dr. José María Moraleda Jiménez por su apoyo y sus valiosos consejos.

Gracias al Dr. Miguel Blanquer Blanquer por su esencial colaboración, así como a Carlos Manuel Martínez Cáceres por su inestimable ayuda para el estudio histológico realizado.

A mis padres, por estar siempre ahí, por haber sido mi refugio cuando más lo he necesitado. A mi hermana Aida, por ser mi confidente y uno de los pilares de mi vida.

A mi familia, Javi, Auri y Cali, por todo el tiempo que esta tesis nos ha quitado y por ser mi mayor ilusión de cada día, por sacarme las mejores sonrisas en los peores momentos.

A todos mis amigos que me han impulsado y motivado para seguir luchando por este proyecto, a pesar de las adversidades.

Por último y no menos importante, no puedo finalizar sin mostrar mi agradecimiento a todos los animales de laboratorio que nos permiten lograr avances en medicina y a todas aquellas personas que intervienen en su correcto mantenimiento y que luchan para que tengan las mejores condiciones posibles.

ABREVIATURAS

AP: Antero-posterior

ATB: Antibiótico

BSS: Solución salina balanceada

C: Control

CAE: Conducto auditivo externo

CC: Cráneo-caudal

CD: Cluster of differentiation

CEIB: Centro de Experimentación e Investigación Biosanitaria

dB: Decibelios

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

FGF: Fibroblast growth factor

FT: Fascia temporal

HBD: Human beta defensin

HGF: Hepatocyte grow factor

HLA: Human leukocyte antigens

IC: Intervalo de confianza

IL: Interleuquina

KGF: Keratinocyte growth factor

MA: Membrana amniótica

NT: Neurotropina

OM: Oído medio

OMA: Otitis media aguda

OMC: Otitis media crónica

PBS: Phosphate buffered saline

PDGF: Platelet derived growth factor

SPF: Specific pathogen free

TC: Tejido conectivo

TGF: Transforming growth factor

TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinases

VA: Vía aérea

VEGF: Vascular endotelial growth factor

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. Anatomía del oído	21
1.1.1. Oído externo.....	21
1.1.2. Oído medio.....	22
1.2. Membrana timpánica	23
1.2.1. Histología de la membrana timpánica humana.....	25
1.2.2. Vascularización de la membrana timpánica.....	27
1.2.3. Histología y vascularización de la membrana timpánica de rata.....	29
1.3. Perforación timpánica	30
1.3.1. Otitis media crónica.....	32
1.3.2. Cicatrización de la membrana timpánica.....	34
1.3.3. Cronificación de una perforación timpánica en modelo animal.....	35
1.4. Timpanoplastia	37
1.4.1. Material de injerto.....	38
1.4.2. Técnica quirúrgica.....	42
1.4.3. Objetivos de la timpanoplastia.....	47
1.5. Placenta y membranas fetales	48
1.5.1. Características macroscópicas e histología de la membrana amniótica...50	
1.5.2. Propiedades de la membrana amniótica.....	51
1.5.3. Usos en medicina.....	53
1.5.4. Usos en miringoplastias.....	54
1.5.5. Obtención, procesamiento y conservación de la membrana amniótica....55	
1.5.5.1. Criopreservación y liofilización.....	55
1.5.6. Métodos de implantación.....	57
2. JUSTIFICACIÓN	61
3. OBJETIVOS	65
3.1. Objetivo principal.....	65
3.2. Objetivos específicos.....	65

4. MATERIAL Y MÉTODO	69
4.1. Instalaciones físicas	69
4.2. Animales	71
4.3. Instrumental y materiales empleados	71
4.4. Diseño del estudio	76
4.5. Criterios de selección	78
4.6. Procedimiento	79
4.6.1. Perforación y cronificación.....	79
4.6.2. Revisión previa a la miringoplastia.....	80
4.6.3. Miringoplastia.....	81
4.6.4. Revisiones posteriores.....	86
4.6.5. Sacrificio y extracción timpánica.....	87
4.6.6. Procesamiento en el laboratorio de Anatomía Patológica.....	89
4.7. Estudio estadístico	90
5. RESULTADOS	95
5.1. Estudio descriptivo	95
5.2. Relación entre el cierre de las perforaciones y el tipo de tratamiento recibido	107
5.3. Relación entre el tamaño de las perforaciones con otras variables	114
5.4. Relación entre la presencia de infección y el uso de antibiótico previo con otras variables	125
5.5. Resultado del estudio histopatológico	132

6. DISCUSIÓN	141
6.1. Consideraciones acerca de las características y la conservación de la membrana amniótica	141
6.2. Resultados acerca del uso de la membrana amniótica en las miringoplastias	143
6.3. Distinción de la cara estromal o epitelial de la membrana amniótica	149
6.4. Infecciones producidas en las miringoplastias realizadas con membrana amniótica	150
7. CONCLUSIONES	159
8. REFERENCIAS	163
9. ANEXOS	179

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Anatomía del oído

El oído humano es un órgano par, localizado en los laterales del tercio medio facial, y encargado de realizar dos funciones fundamentales: la audición y participar en el sistema del equilibrio. Está situado en el hueso temporal y se distinguen tres porciones bien diferenciadas: el oído externo, el oído medio y el oído interno.

Las porciones que tendrán relación con este trabajo son las dos primeras:

1.1.1 Oído externo

Está compuesto por el pabellón auricular y el meato o conducto auditivo externo (Figura 1). En cuanto a sus funciones cabe destacar la protección del oído medio, la estética facial y amplificar la intensidad de la onda sonora.

El pabellón es una estructura principalmente cartilaginosa cubierta por piel, en la cual se distinguen una serie de caras y relieves, siendo los más relevantes el hélix, antihélix, trago, antitrago, la concha y el lóbulo.

El conducto auditivo externo (CAE) mide aproximadamente 25 mm y presenta una curvatura oblicua de fuera a dentro y de atrás a delante, adoptando una forma sigmoidea con concavidad posterior e inferior. Se compone de un tercio externo fibrocartilaginoso y dos tercios internos óseos (1).

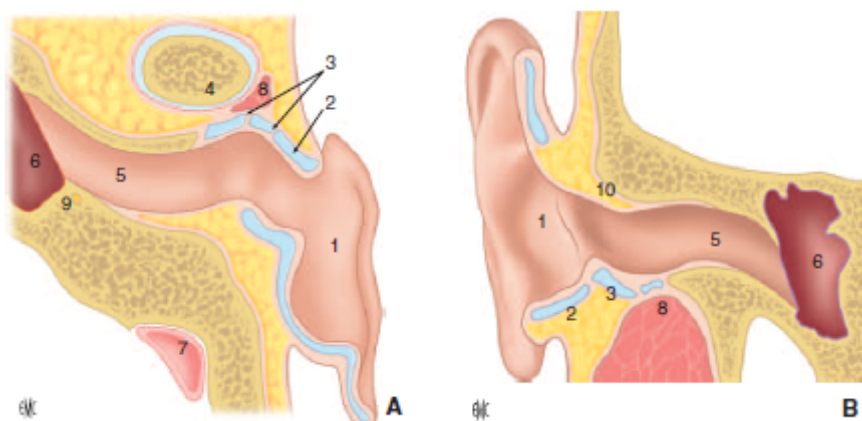


Figura 1. A. Corte transversal conducto auditivo externo. B. Corte coronal conducto auditivo externo (2). 1. Concha; 2. Trago; 3. Incisuras cartilagosas del conducto auditivo (Duverney,Santorini); 4. Cóndilo mandibular; 5. Conducto auditivo externo; 6. Caja timpánica; 7. Seno lateral ; 8. Prolongación parotídea; 9. Nervio facial (tercera porción); 10 . Pars cupulari

1.1.2 Oído medio

El oído medio (OM) está compuesto por la caja del tímpano, los anexos mastoideos y la trompa de Eustaquio.

Está cubierto por un epitelio pseudorrespiratorio, cuyas células mucosas y ciliadas se encuentran distribuidas en mayor cantidad en la porción más anteroinferior del OM mientras que van disminuyendo en número conforme nos desplazamos posteriormente, estando prácticamente ausentes en el antro mastoideo (3).

La caja del tímpano es una cavidad ósea de morfología paralelepípeda delimitada por seis caras, correspondiéndose la cara más lateral a la membrana timpánica, la medial a la cara laberíntica, la superior a la tegmentaria, la inferior conocida también como yugular, la anterior o carotídea/tubárica y, por último, la posterior o mastoidea. Contiene la cadena de huesecillos, formada por el martillo, yunque y estribo, con sus anexos ligamentosos y musculares (4).

De los anexos mastoideos cabe destacar el antro mastoideo, considerado como la celdilla de mayor tamaño de la mastoides y que se comunica directamente con la caja timpánica a través del additus ad antrum.

La trompa de Estaquio es un conducto oteocondromembranoso que comunica la caja del tímpano con la nasofaringe. Está constituida por un tercio óseo posterolateral y por dos tercios condromembranosos anteromediales, formando estos últimos una luz virtual que permanece cerrada en condiciones normales. Se abre de forma activa gracias a la contracción principalmente de los músculos periestafilinos externo e interno (tensor y elevador del velo del paladar respectivamente), y de forma pasiva durante maniobras tales como la deglución, bostezo y estornudos, o bien maniobras provocadas como la maniobra de Valsalva. Su principal función es igualar las presiones entre el oído medio y el oído externo, hecho fundamental y requerido para un correcto funcionamiento del oído. Otra de sus funciones es la de protección frente al ascenso de microorganismos o sustancias nocivas que provengan del cavum, y el aclaramiento de las secreciones originadas en el oído medio (3).

1.2 Membrana timpánica

Anatómicamente, se caracteriza por su forma elíptica orientada hacia abajo y afuera, con una inclinación de unos 45° en el adulto (algo más horizontalizada en el niño). Mide aproximadamente 10 mm de altura y 9 mm de anchura, con un grosor que puede variar de 0,05 a 0,09 mm, y se puede dividir en cuatro cuadrantes: anteriores superior e inferior y posteriores superior e inferior. Tiene una capa medial cubierta por mucosa y otra lateral cubierta por epitelio. Además, se distinguen dos segmentos anatómicos diferentes: la pars tensa y la pars flácida o membrana de Shrapnell, separadas por los ligamentos timpanomaleolares (4).

La pars tensa ocupa la mayoría de la superficie de la membrana timpánica, y mide entre 8 y 9 mm de ancho y entre 9 y 10 mm de alto (5,6). Se caracteriza por su forma de embudo, situándose en su centro un punto ligeramente hundido respecto al resto, aproximadamente 2 mm, que se denomina umbo y que corresponde a la zona de inserción del extremo caudal del mango del martillo. Además, podemos identificar el mango propiamente dicho y la apófisis lateral del martillo.

También es punto de referencia el conocido como triángulo luminoso, que no es más que el reflejo ocasionado por la luz al iluminar la membrana, y que se sitúa en el cuadrante antero-inferior (Figura 2).

La pars tensa se continúa con el annulus o anillo fibroso de Gerlach, anillo fibrocartilaginoso formado por un engrosamiento de la capa fibrosa del tímpano, que se encaja en el surco timpánico (ranura en el hueso temporal) cuyos límites van desde la espina timpánica mayor y menor del hueso timpánico hasta los ligamentos timpanomaleolares (5).

La pars flácida es la más superior, por encima de los ligamentos timpanomaleolares, y se inserta en la escama temporal sin el anillo fibroso. Tiene forma triangular con base superior, mide 2 mm y es menos rígida que la pars tensa (4).

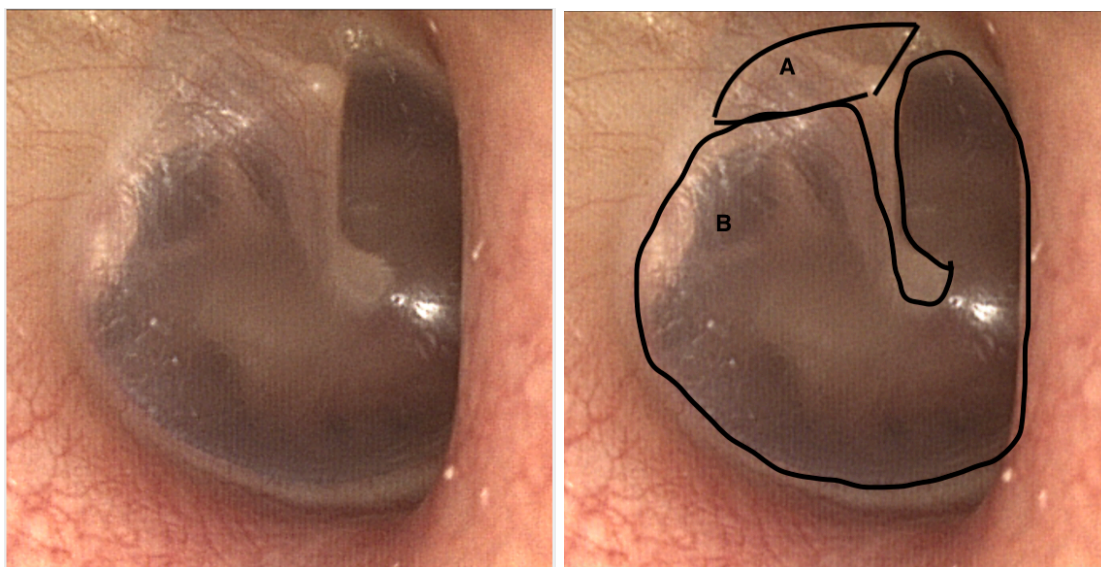


Figura 2: Membrana timpánica humana: **A)** Pars flácida; **B)** Pars tensa

Tanto anatómica como histológicamente, la membrana timpánica de rata es muy parecida a la membrana timpánica humana, con pequeñas particularidades. Entre otras cosas, destaca su menor tamaño, teniendo un diámetro anteroposterior entre 2.2 y 2.4 mm, así como un mayor tamaño proporcional de su pars flácida, que corresponde aproximadamente a un 1/3 de su pars tensa (7) (Figura 3).

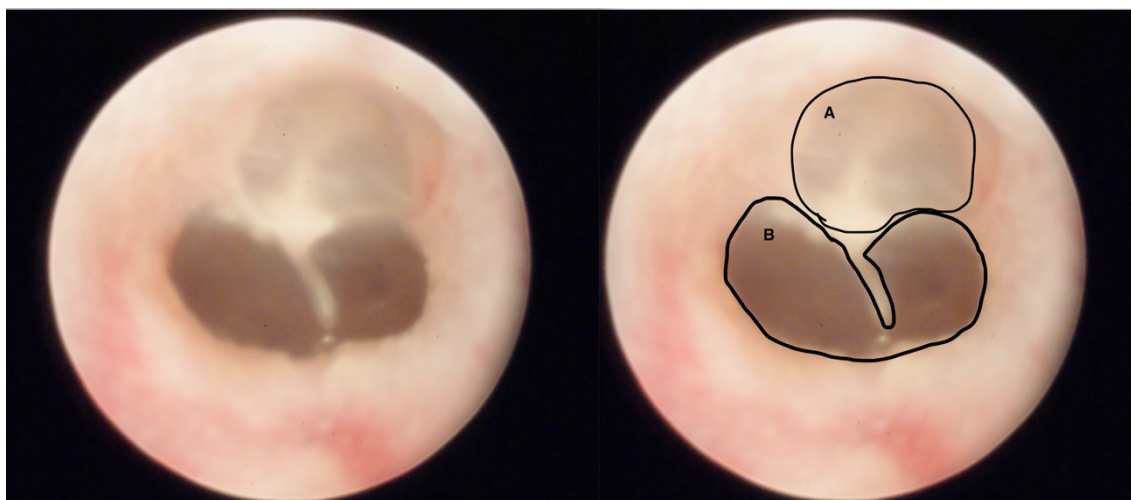


Figura 3: Membrana timpánica de rata: **(A)** Pars flácida; **(B)** Pars tensa

1.2.1 Histología de la membrana timpánica humana

A día de hoy se sabe que la pars flácida es más gruesa que la pars tensa, siendo el espesor de la primera de entre 0,03 y 0,23 mm, mientras que el de la pars tensa varía entre 0,03 y 0,09 (5,8).

La **pars flácida** está compuesta por tres capas: la capa externa o epidérmica, la capa media o lámina propia y la capa interna mucosa.

La capa externa epidérmica es una continuación de la epidermis del CAE y está constituida por entre 5 y 10 hileras de células epiteliales, con abundantes fibrillas de queratina.

Por otro lado, la lámina propia está compuesta por abundantes fibras elásticas y de colágeno desorganizadas, siendo considerablemente más ancha que en la pars tensa. En esta capa también se encuentran numerosos capilares y fibras nerviosas.

Por último, la capa interna mucosa está formada por células escamosas simples en su mayoría, habiendo otras áreas con epitelio cilíndrico pseudoestratificado y epitelio cúbico bajo (5).

La **pars tensa** está compuesta por las mismas tres capas, aunque con algunas distinciones.

La capa externa es similar a la de la pars flácida, aunque pudiendo tener un menor número de hileras que varía entre 2 y 10 de células epiteliales (epitelio escamoso estratificado) (8–10). Dentro de esta capa podemos encontrar cuatro estratos diferentes (Figura 4): el stratum corneum, el stratum granulosum, el stratum spinosum y el stratum basale (5,11).

Se ha demostrado en múltiples estudios que su grosor varía en función de la región de la membrana timpánica, siendo las zonas más gruesas las correspondientes al umbo, al ánnulus y al mango del martillo (10,12–14). Además, se ha comprobado la existencia en estas regiones de “centros proliferativos”, también denominados “centros de crecimiento del epitelio”, que se caracterizan por presentar una mayor capacidad mitótica respecto al resto de la membrana. El epitelio generado en estos centros va migrando progresivamente hacia al resto de la superficie de la membrana (10,12–16).

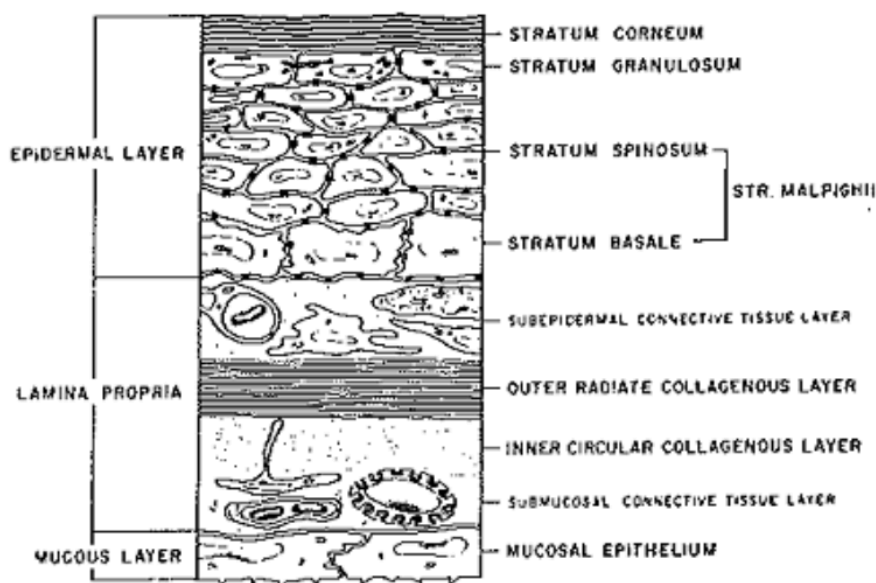


Fig. 3

A schematic diagram of the pars tensa depicting: 1) epidermal layer; 2) lamina propria; and 3) mucosal epithelium. Drawing by Nancy Sally. (Reproduced from DJ LIM In the Otolaryngology (2nd ed.) Ed. by Paparella & Shumrick (ed.), W. B. SAUNDERS 1980).

Figura 4: Capas de la membrana timpánica (17)

En la capa media o lámina propia es donde más diferencias hay, pudiendo observar una primera lámina de tejido conectivo subepitelial, con abundantes fibras de colágeno y fibras elásticas de disposición irregular. También presenta un plexo vascular externo y fibras nerviosas en su interior (5,17). Se corresponde con la continuación de la lámina propia de la pars flácida.

Se sigue de una capa fibrosa media que contiene fibras colágenas y se subdivide en una lámina externa de fibras radiales y una lámina interna de fibras circulares.

Por último, tiene una lámina de tejido conectivo laxo submucoso, parecido al de la capa subepitelial aunque más fina. También posee una red vascular interna y otro plexo venoso (5,17,18).

Por último, tenemos la capa interna mucosa que se continúa con la mucosa de la cavidad del oído medio, formada por epitelio cúbico simple, alternándose con zonas de epitelio cilíndrico pseudoestratificado (5).

1.2.2 Vascularización de la membrana timpánica

Se puede dividir en dos sistemas bien diferenciados (Figuras 5 y 6):

Por un lado, un plexo interno o plexo anular, denominado así por discurrir a lo largo del ánnulus, formando un anillo a través de la capa submucosa de la lámina propia. Proviene de las arterias timpánica anterior y posterior (19). También se ha descrito la participación de la arteria auricular profunda (20). Hay distintas opiniones sobre el origen de cada uno de estos vasos, coincidiendo la mayoría en la maxilar interna, rama a su vez de la carótida externa (19). Otros autores sugieren su origen de la arteria auricular posterior (17,21,22).

Por otro lado, un plexo externo o plexo maleolar, compuesto por las arterias maleolares, ramas de la arteria auricular profunda, a su vez rama de la arteria maxilar interna. Discurren por el mango del martillo hasta que llegan al umbo. También irrigan a la pars flácida por medio de ramificaciones (9,17,19,22).

En la periferia de la pars tensa se produce la anastomosis entre los dos sistemas.

De forma paralela al sistema arterial se encuentra el sistema venoso, que en su mayoría drena hacia el oído medio (9,19).

En un estudio llevado a cabo por Applebaum y colaboradores se observó una mayor vascularización en la mitad posterior de la membrana timpánica, fundamentalmente a expensas de las ramas del plexo maleolar. Por otro lado, en la porción anterior se observó mucha menor vascularización, dependiendo fundamentalmente del plexo anular. Este hallazgo podría justificar en parte el mayor fracaso observado en el cierre de perforaciones timpánicas anteriores (20).

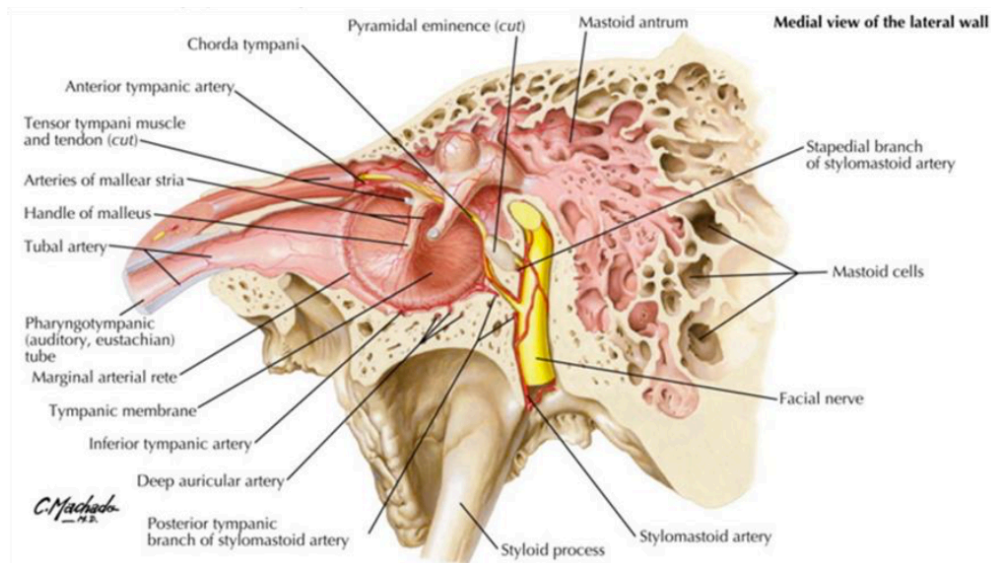


Figura 5: Visión de la vascularización en la pared lateral del oído medio (21)

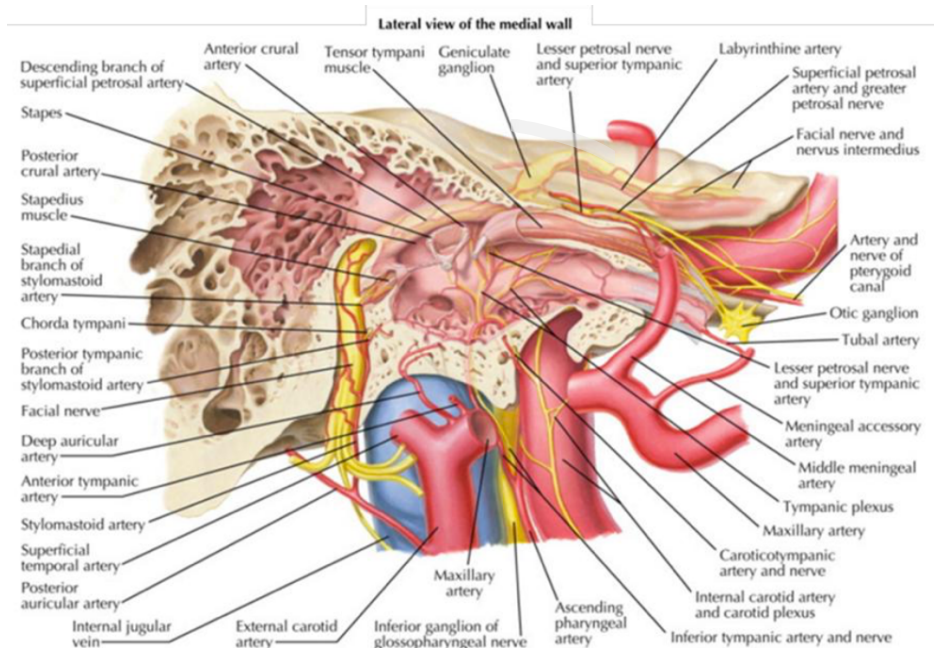


Figura 6: Visión de la vascularización en la pared medial del oído medio (21)

1.2.3 Histología y vascularización de la membrana timpánica de rata

La membrana timpánica de rata es muy parecida a la humana, aunque es de menor espesor que ésta, teniendo entre 0,004 y 0,006 mm de grosor (23), frente a los entre 0,03 y 0,09 mm de la humana.

La pars flácida y la pars tensa poseen igualmente tres capas fundamentales: una externa epidérmica, una intermedia de tejido conectivo y una interna mucosa. Sin embargo, aquí son de menor grosor, como puede ser la capa externa epidérmica de la pars tensa que está formada por 2 -3 hileras de células epiteliales escamosas (24,25). La capa media conectiva de la pars tensa también se caracteriza por abundantes fibras colágenas agrupadas en una disposición radial externa y circular interna, existiendo entre estas dos una capa muy fina de fibras oblicuas (23,25).

En las ratas también se distingue un plexo vascular anular y otro maleolar, aunque, a diferencia de lo que ocurre en humanos, apenas existe una anastomosis entre ambos sistemas.

Presenta un sistema venoso paralelo al arterial y, del mismo modo, presenta una vascularización más pronunciada en su porción timpánica posterior frente a la anterior (26).

1.3 Perforación timpánica

Se denomina perforación timpánica a la solución de continuidad que tiene lugar en la membrana timpánica, creando una comunicación entre el oído externo y el medio. Cuando esto ocurre, se altera la movilidad y vibración normal del tímpano, pudiendo conllevar la pérdida de audición en distintos grados (27).

Puede ocurrir a cualquier edad y su etiología es múltiple, destacando entre las causas más frecuentes las otitis medias agudas de repetición o crónicas y los traumatismos. Otras causas descritas son las secundarias a barotraumas, la presencia de una onda expansiva, los traumatismos cefálicos, los traumatismos acústicos, secundaria a la introducción de objetos, o de forma iatrogénica en cirugías o manipulaciones como la extracción de cerumen con lavado ótico (27,28).

Tradicionalmente se han clasificado en tres grandes grupos: centrales, marginales y subtotales o totales. Las perforaciones centrales, en ocasiones denominadas también no marginales, son aquellas que tienen lugar en la pars tensa y mantienen un reborde timpánico de 360° alrededor de la perforación (29). Por otro lado, las perforaciones marginales quedan definidas como aquellas en las que hay una ausencia de dicho reborde timpánico en cualquier punto de la perforación, estando en contacto con el anillo fibroso de Gerlach. También se considera una perforación marginal cuando se localiza en la pars flácida (30). Por último, se considera una perforación subtotal cuando se afectan al menos 3 cuadrantes, y una perforación total cuando se afecta a la totalidad timpánica (31).

En función del tiempo de evolución se clasifican en agudas o crónicas, siendo estas últimas aquellas que persisten durante más de 3 meses, independientemente de si presentan o no otorrea asociada (32). Si nos referimos al ámbito experimental, se considera una perforación crónica cuando dura de 8 a 15 semanas (33).

La clínica variará según la etiología, pudiendo cursar con un dolor súbito acompañado de hipoacusia, otorrea u otorragia, vértigo o tinnitus.

La mayoría de las perforaciones traumáticas y agudas cierran espontáneamente, existiendo un porcentaje de cierre, según los distintos estudios, de entre un 80 y 94%, independientemente del origen (34,35). Sin embargo, se sabe que cuanto mayor es el tamaño de la perforación o mayores son los procesos infecciosos que asocie, presenta menos posibilidades de cierre espontáneo (36–40).

Por lo tanto, se puede decir que existe una serie de factores que dificultan el cierre espontáneo, mientras que hay otros que lo favorecen.

Como acabamos de comentar, el tamaño es un factor determinante para lograr el cierre de la perforación. Numerosos estudios han demostrado que cuanto mayor es el tamaño de la perforación, más tiempo tarda en cerrarse, de forma directamente proporcional (35,41,42). Según Lou, ante grandes perforaciones traumáticas, la tasa de cierre espontáneo es mucho menor, variando entre un 11 y 56% (43).

El origen de la perforación también condiciona el éxito del cierre espontáneo o quirúrgico. Cuando la causa es un traumatismo o bien un episodio agudo y aislado de una otitis media aguda (OMA), el pronóstico es mejor que en aquellas perforaciones debidas a otitis medias crónicas (OMC) (44). Sin embargo, existen excepciones dentro de las de origen traumático como son aquellas producidas por sustancias corrosivas o bien por calor en contacto directo, debido a la necrosis que tiene lugar en la membrana timpánica (41,42). La presencia de infección perjudica a la capacidad de cierre, ya sea como origen de la perforación (OMC) o bien como consecuencia suya, por ejemplo, por la entrada de agua al oído medio a través de la perforación (35,39).

En cuanto a la localización, no está claro que interfiera en la posibilidad de cierre espontáneo, habiendo estudios en los que no se encontraron diferencias (39,42). Por otro lado, algunos sugieren peor cierre en las de localización anterior (20).

Por último, la edad es otro factor que ha sido ampliamente estudiado. Se piensa que tiene lugar un cierre más precoz en aquellos pacientes más jóvenes. Esto se justificaría por los

cambios anatómicos que tienen lugar en la membrana timpánica con la edad, como la alteración en las fibras de colágeno y aumento de elastina, así como la disminución de la vascularización. Aun así, no se ha demostrado una menor tasa de cierre final en pacientes de mayor edad (39,42).

El otro extremo sería la edad pediátrica, que presenta más incidencia de reperforaciones tras cierre quirúrgico o fracasos en el cierre espontáneo, generalmente asociado a la presencia de hipertrofia adenoidea o rinitis que asocian una disfunción de la trompa de Eustaquio, ocasionando otitis medias serosas recurrentes. Aun así, hay controversia en cuanto a la edad idónea para la realización de cirugía en este grupo, habiéndose visto porcentajes globales de cierre similares en adultos (45).

1.3.1 Otitis media crónica

La otitis media se define como una inflamación o infección del oído medio, y se diferencian distintos subtipos, como son la otitis media aguda, la otitis media crónica efusiva o seromucosa, la otitis media crónica colesteatomatosa, y la otitis media crónica simple o mucosa abierta (3,46).

Ésta última es una de las causas más frecuentes de perforación cronicada y, por tanto, una de las principales causas de intervención quirúrgica para la reconstrucción de la membrana timpánica o miringoplastia.

La otitis media crónica simple, supurativa o mucosa abierta se define por la inflamación crónica de la mucosa del oído medio y cavidad mastoidea, junto con la presencia de una perforación timpánica (3). Sin embargo, a día de hoy no hay consenso respecto a la duración (47,48), siendo para la Organización Mundial de la Salud la presencia de otorrea a través de una perforación timpánica durante más de dos semanas (49), mientras que otros establecen un mínimo de seis semanas (50,51) o incluso más de tres meses (52). Se estima que afecta a más de 300 millones de personas a nivel mundial (49).

Por otro lado, se acepta que la otitis media crónica surge de la continuación y no resolución de una otitis media aguda en el tiempo, ya sea por haber recibido un tratamiento incompleto o insatisfactorio (53).

De este modo, se podría decir que cuando una otitis media aguda se complica con una perforación timpánica, puede evolucionar en cuatro posibles escenarios distintos: en primer lugar, que se resuelva la otitis media aguda y que el defecto timpánico cierre espontáneamente; en segundo lugar, que la otitis media cure pero la perforación se cronifique; en tercer lugar, que tanto la otitis media como la perforación persistan, convirtiéndose en una otitis media crónica supurativa; y en cuarto lugar, que tenga lugar una complicación de una otitis media supurativa (32).

Es importante tener en cuenta estos conceptos ya que, a menudo, el término otitis media crónica se confunde con el simple hecho de ver una perforación cronificada en la membrana timpánica sin inflamación del oído medio asociada.

Por otro lado, una perforación cronificada podría facilitar el desarrollo de una otitis media aguda y secundariamente una otitis media crónica, debido a la comunicación del oído medio con el oído externo y, por lo tanto, la mayor facilidad para la entrada de gérmenes desde el exterior (32).

Otros autores hablan de otitis media crónica activa, en casos de presencia recurrente de otorrea, o bien de otitis media crónica inactiva, cuando hay una perforación permanente seca pero que previamente había pasado por la fase otorreica (49).

A su vez, las otitis mucosas abiertas se pueden clasificar en cuatro estadios en función del nivel de inflamación presente en la mucosa (Figuras 7, 8 y 9). Se habla de estadio 1 si presenta una mucosa eritematosa, estadio 2 si además de eritematosa asocia secreción, estadio 3 cuando presenta tejido polipoideo, y estado 4 cuando presenta tejido polipoideo y secreción (52).

Por otro lado, la afectación auditiva que puede asociar suele ser una hipoacusia transmisiva con una afectación de entre 20 y 50-60 dB. Si la pérdida auditiva supera los 30-35 dB deberemos pensar en una afectación de la cadena de huesecillos (54), y si supera los 60 dB se debe sospechar un daño coclear simultáneo (55).

En cuanto a los factores microbiológicos implicados en la otitis media crónica, los gérmenes que se aíslan con más frecuencia son la *Pseudomona aeruginosa*, seguida del

Staphylococcus aureus, y en menor medida el *Haemophilus influenzae* y el *Proteus mirabilis* (3,56,57).

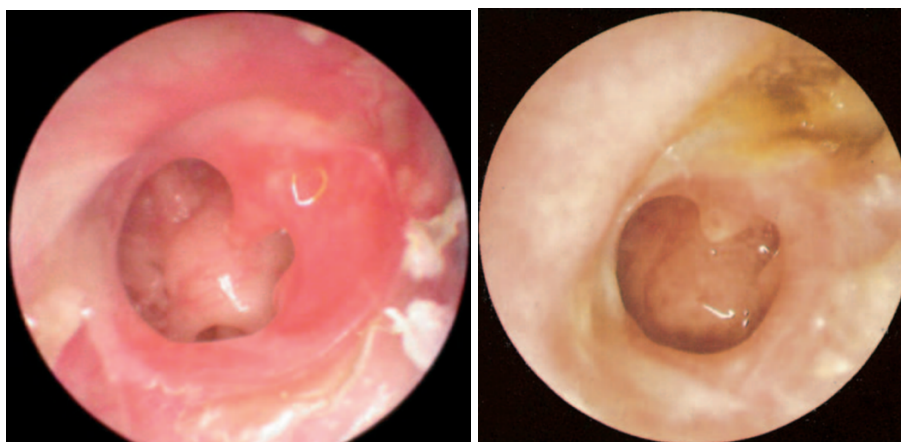


Figura 7 y 8: Otitis mucosa abierta izquierda en estadio 1 (izquierda) y en estadio 2 (derecha) respectivamente. Se aprecia el aspecto más edematoso y secretor de la segunda (52)



Figura 9: Otitis mucosa abierta derecha en estado 4. Se puede apreciar la presencia de pólipos a nivel de promontorio ocupando la perforación, así como otorrea asociada (52)

1.3.2 Cicatrización de la membrana timpánica

En primer lugar, tiene lugar un incremento de la permeabilidad vascular, lo cual secundariamente facilita la fase inflamatoria gracias a la llegada de neutrófilos y otras células inflamatorias. Seguidamente, comienza la fase proliferativa que, a diferencia de

lo que ocurre en el resto del organismo (donde lo que prolifera en primer lugar es el estroma), comienza en la capa más superficial de la membrana timpánica, la capa epitelial, para posteriormente crecer en profundidad hacia la capa media (41). La explicación para este fenómeno está en la presencia de los centros proliferativos que comentamos con anterioridad, que van a ser los responsables de generar nuevas células epiteliales capaces de migrar por la membrana timpánica.

A continuación, tiene lugar la proliferación de la capa media, que suele generar un tejido conectivo más desorganizado, con gran cantidad de colágeno y fibroblastos.

Por último, una vez que se ha cerrado por completo, comienza la fase de remodelación, de modo que, aunque se mantenga la desorganización estructural de la capa media, de modo global se consigue un neotímpano lo más parecido posible al original (44,58,59).

Cabe destacar que, en los casos en los que no se consigue el cierre completo de la perforación, tras finalizar la fase inflamatoria, el borde de la perforación se fibrosa y queda cubierto por un epitelio avascular. Por ello, en caso de realizar una miringoplastia, será precisa la exéresis de dicho borde para conseguir una mejor vascularización del borde de la perforación que favorezca su cierre (20,60,61).

1.3.3 Cronificación de una perforación timpánica en modelo animal

Como ya hemos comentado, desde el punto de vista experimental, se considera una perforación timpánica cronificada cuando dura de 8 a 15 semanas (33,62).

Desde los años 90 se han llevado a cabo múltiples ensayos con modelos animales para estudiar la cronificación de las perforaciones timpánicas. Para ello, se han utilizado distintos instrumentos y sustancias con diferentes resultados.

Por un lado, se pueden diferenciar aquellas incisiones en la membrana timpánica (miringotomías) realizadas con bisturí frío o con láser. Los tipos de láser empleados con tal fin son el láser de CO₂ y el láser de Argón. El primero se caracteriza por tener mayor potencia y se ha demostrado su utilidad en ensayos realizados en ratas y en humanos para cronificar perforaciones timpánicas (63,64). El láser de Argón es menos potente aunque también se ha utilizado para la cronificación de perforaciones timpánicas en modelos con

ratas (65). La principal desventaja respecto al bisturí frío es su menor disponibilidad y mayor coste.

La capacidad de regeneración de la membrana timpánica da lugar, en muchas ocasiones, al cierre espontáneo de la perforación realizada. Por ello, se ha estudiado la aplicación de diferentes sustancias para dificultar el proceso de cicatrización y conseguir menores tasas de cierre espontáneo o, lo que es lo mismo, mayores tasas de cronificación de la perforación.

Respecto a estas sustancias podemos nombrar, entre otras, al 5 – Fluorouracilo, agente quimioterápico antimetabolito que dificulta la capacidad de división celular y que ha sido usado en modelos de cronificación de perforaciones en ratas (66).

Otra sustancia utilizada para tal fin es la Halofuginona, agente antiprotozoario que dificulta la neovascularización y el crecimiento de tejido conjuntivo. Con su uso, las perforaciones tienen una duración media de 3 semanas (67), siendo algo mayor que las 2 semanas de media conseguidas con la Colchicina (68), fármaco con propiedades antimitóticas.

También se ha utilizado la Hidrocortisona en ratas (69), que afecta a los componentes del tejido conjuntivo, y el Glutaraldehído en perros (70), siendo un producto químico tóxico que frena el desarrollo vascular y produce la desnaturalización de las proteínas.

Por último, una de las sustancias más utilizadas en modelo animal para la cronificación de una perforación timpánica es la Mitomicina C. Se trata de un antibiótico antitumoral que produce una interrupción en la replicación del ADN al impedir la mitosis y la formación de proteínas. Además, se caracteriza por dificultar la replicación de las células epiteliales y de los fibroblastos. Ha sido utilizada tanto en ratas (71–73) como en conejillos de indias (74,75), obteniéndose diferentes resultados según la duración de la aplicación o bien si se aplicaba antes o después de la realización de la miringotomía.

Otra modalidad de uso de la mitomicina C es la combinación con otras sustancias, como la dexametasona (76,77). Con esta combinación se han visto mejores resultados, llegando a obtener una cronificación de hasta 3 meses. Nuestro estudio se basará en el modelo de cronificación establecido por nuestro equipo de investigación, llevado a cabo por Tomás

Esteban y colaboradores, en el que se utilizó Mitomicina C a una dosis de 0.4 mg/ml, aplicada durante 10 minutos previa realización de la miringotomía. Los días 3,7,10 y 14 posteriores a la mirngotomía, se les aplicaba Dexametasona a una dosis de 4 mg/ml.

1.4 Timpanoplastia

La timpanoplastia es una técnica quirúrgica que consiste en la reconstrucción de la membrana timpánica y de la cadena osicular en caso de ser necesario. Con ello, lo que se pretende es restablecer una continuidad entre la membrana timpánica y la ventana oval, para poder obtener una correcta transmisión de la onda sonora y prevenir infecciones.

El primer autor descrito en la literatura que intentó cerrar una perforación timpánica fue Banzer, en 1640, utilizando para ello un trozo de cuerno de alce recubierto con vejiga de cerdo (78).

Posteriormente, Itard describe en 1821 la utilización de lana de algodón para mejorar la función auditiva de un paciente, colocándolo al fondo del conducto auditivo externo (79). Otra curiosa aportación fue la de Deleau, que publicó en 1830 la utilización de cebolla para crear una membrana timpánica artificial, en más de 25 casos (80).

En 1849 Yearsley publicó una técnica en la que se aplicaba un fragmento circular de algodón sobre las perforaciones timpánicas para mejorar la hipoacusia de los pacientes (81).

Pocos años después, en 1852, Joseph Toynbee fabricó una prótesis removible que consistía en una goma endurecida con forma circular que simulaba una membrana timpánica, conectada mediante un alambre de plata para su colocación y extracción (82,83).

La definición del término miringoplastia la dio por primera vez Emil Berthold en 1878. Su trabajo consistió en realizar una desepitelización de la membrana timpánica para posteriormente aplicar por encima de la perforación un injerto de piel (84).

Durante muchos años la cirugía otológica fue experimentando con distintas técnicas y materiales hasta que, a partir de los años 50, se produjeron grandes cambios gracias a la aparición y utilización del microscopio óptico en la microcirugía de oído, así como el desarrollo de un correcto instrumental microquirúrgico apropiado.

Actualmente se distinguen cinco tipos de timpanoplastias, cuyas características se basan en los trabajos y clasificaciones llevadas a cabo en los años 50 por Zollner y Wullstein (85,86)

- Tipo I, que consiste en la reparación de la membrana timpánica perforada en presencia de una cadena osicular normal. Es lo que se conoce también como miringoplastia y es la implicada en este trabajo.
- Tipo II, en la que además de la perforación timpánica, se observa una erosión del martillo, realizándose el cierre con un injerto adosado al yunque o remanente del martillo, o con una prótesis parcial entre martillo y cabezuela del estribo.
- Tipo III, en la que únicamente se conserva la integridad del estribo, y en la reparación el injerto queda en contacto con la supraestructura del estribo, o bien una prótesis entre el neotímpano y la cabezuela del estribo.
- Tipo IV, en la que únicamente permanece la platina móvil y el injerto va sobre esta o con columelización entre el neotímpano y la platina.
- Tipo V, en la que la platina está fija y precisa de apertura de la misma.

1.4.1 Material de injerto

En este estudio nos interesa la realización de la timpanoplastia tipo I o miringoplastia, para la cual es necesario utilizar un injerto para cerrar la perforación timpánica. Como principio general, cuanto más rígido sea el material utilizado para el cierre, más estable es la reconstrucción con respecto a los cambios de presión y a las anomalías ventilatorias, pero peor es la transmisión del sonido (86).

Tal y como hemos comenzado a ver en el apartado anterior, son numerosos los materiales que se han ido utilizando a lo largo de la historia para intentar solucionar las perforaciones timpánicas y mejorar la función auditiva. A continuación podemos ver una tabla que resume los principales materiales utilizados hasta principios de siglo XX (Tabla 1) (54).

Tabla 1: Materiales utilizados como membrana timpánica artificial (54)

FECHA	AUTOR	MATERIAL UTILIZADO
1640	Banzer	Fragmento de vejiga de cerdo previamente estirada y colocada en el extremo de un tubo de marfil
1815	Autenrieth	Trozo de vejiga de pescado seca y barnizada colocada en el extremo elíptico de un tubo de plomo
1821	Itard	Lana de algodón
1830	Deleau	Madera o la parte central de la cebolla
1841	Paciente de Yearsley	Papel humedecido con saliva
1845	Paciente de Wilde	Trozo de tocino, tostado sobre una vela
1845	Lincke	Tubos de plata o de oro delgados y cónicos el final de los cuales estaba cubierto con una pieza de piel de pescado
1848	Yearsley	Bolita de lana de algodón
1849	Erhard	Pelota de guata
1852	Toynbee	Caucho indio vulcanizado
1879	McKeown	Coloide
1881	Turnbull	Intestino de cordero
1883	Bezold	Ácido bórico
1883	Tangeman	Injerto autólogo de piel
1883	Blake	Papel de escribir cortado en el tamaño adecuado y humedecido con agua
1883	Poltzer	Modificación del tímpano Toynbee añadiendo estribo de cadáver
1883	Hartmann	Hueso de pescado y guata
1886	Berthold	Membrana vitelina de un huevo
1890	Schalle	Trozos de lino
1890	Kosegarten	Alumbre en polvo
1907	Gomperz	Vaselina/parafina y hoja de plata químicamente pura

Posteriormente, comenzaron a utilizarse injertos autólogos o heterólogos, como es el caso de la primera miringoplastia realizada en 1878 por Emil Berthold usando un injerto de piel.

Se ha descrito una gran variedad de injertos con este fin, siendo de los primeros los injertos cutáneos extraídos de la región retroauricular, del antebrazo o del propio conducto auditivo externo (87). Estos tenían muchos problemas, como la mala integración, la presencia de folículos pilosos o glándulas, las infecciones y la formación de colesteatomas iatrogénicos (88).

Otros materiales ampliamente utilizados han sido los injertos de vena (89,90), con tendencia a atrofiarse y a producir reperforaciones, además de presentar una extracción más laboriosa que otros injertos (88); o los injertos de grasa, siendo extraída generalmente del lóbulo del pabellón auricular al estar en el mismo campo quirúrgico, y útil para perforaciones de pequeño tamaño. Sin embargo, es un tejido frágil y que puede sufrir retracciones (86).

Los injertos más utilizados en la actualidad son los injertos autólogos de fascia del músculo temporal, de pericondrio tragal y de cartílago (91).

Fascia temporal:

Se trata de la aponeurosis que recubre el músculo temporal. Entre sus propiedades destaca por ser un injerto de espesor reducido, por ser fácil de obtener al encontrarse en el mismo campo quirúrgico, y por disponer de una gran cantidad que nos permite elaborar injertos de gran tamaño en caso de ser necesario (92). Una vez extraída, es importante limpiarla de los restos de grasa o músculo que pueda tener adheridos (86).

Pericondrio:

Generalmente se obtiene el pericondrio del cartílago tragal. Para ello, se suele extraer el fragmento de cartílago con el pericondrio y, posteriormente, se diseca y separa este último del primero. Una vez separado el pericondrio, el cartílago tragal puede volver a insertarse en su sitio, de modo que no se pierde el soporte cartilaginoso a este nivel del pabellón auricular. Entre sus ventajas se caracteriza por ser más fácil de manipular y por disminuir el tiempo quirúrgico respecto al uso de la fascia temporal (93). Como inconveniente, debido a su menor tamaño, puede ser insuficiente en perforaciones de mayor amplitud.

Cartílago:

Se obtiene fundamentalmente del trago, aunque también se ha descrito la utilización del cartílago de la concha (94), y puede ser utilizado con su pericondrio incluido o sin él. Se caracteriza por su mayor rigidez respecto a otros injertos, lo cual le otorga cierta ventaja en determinados casos al presentar más consistencia y, por consiguiente, dar lugar a menos retracciones timpánicas, siendo especialmente útil en aquellos casos de disfunción tubárica (95). Sin embargo, entre sus inconvenientes se describe una peor conducción del

sonido debido al grosor del injerto y peor movilidad timpánica, hecho que se consigue solventar disminuyendo el grosor del cartílago según han demostrado algunos autores (95–97). Otro problema es que da lugar a neo-timpanos opacos, con pérdida de su transparencia y peor control de la caja timpánica.

Además, cabe destacar que en las últimas décadas está cobrando importancia la terapia con células madres mesenquimales en distintos campos de la medicina, extendiéndose más allá de la hematología (98–100). Un estudio llevado a cabo por Rahman y col demostró, en un modelo animal con ratas, una mejor tasa de cierre de perforaciones timpánicas (40%) en sujetos a los que se les aplicó células madres mesenquimales, frente a los controles (10%) (101).

En la misma línea, la membrana amniótica supone una importante fuente de células madre multipotentes y está ampliamente aceptada y utilizada en el ámbito de la medicina regenerativa (102,103).

Por otro lado, se pueden encontrar numerosos estudios en la literatura en los que se utilizan distintos materiales no autólogos, con resultados muy diversos.

En una revisión sistemática realizada recientemente por Ghanad I et al (104), en la cual se incluyeron un total de 61 artículos tras aplicar los criterios de exclusión, se describen los siguientes materiales no autólogos con sus respectivas tasas de cierre, teniendo en cuenta el conjunto total de las perforaciones agudas y crónicas: parche de papel (71,1%), Steri-Strip (96,8%), gelatina (86,1%), ácido hialurónico (89,8%), factores de crecimiento (84,5%), celulosa bacteriana (88,2%), atelocolágeno (42,1%), submucosa del intestino delgado porcino (96,4%) y lámina de silicona (64,6%).

Como podemos ver, son muchos los materiales de injerto descritos para la realización de timpanoplastias, con muchos estudios al respecto, y con tasas de cierre parecidas, lo cual nos hace pensar que no se ha encontrado aun un único material idóneo para dicho fin.

Todos estos datos pueden llevarnos a considerar tener en cuenta otros factores, más allá del porcentaje de cierre obtenido, a la hora de elegir un tipo de injerto u otro, como puede ser las diferencias en el tiempo quirúrgico, las complicaciones postquirúrgicas o la

ganancia auditiva, así como la calidad de la neo-membrana para permitir un mejor control de la caja timpánica en el postoperatorio.

1.4.2 Técnica quirúrgica

Existen diferentes vías de abordaje para la realización de la timpanoplastia. La elección de la incisión a realizar dependerá fundamentalmente del tamaño y localización de la perforación, así como del tamaño del meato auditivo. Las más habituales son la endoaural, la retroauricular y la transcanalar.

Para perforaciones de pequeño tamaño o bien las no marginales cuyos bordes se controlan en su totalidad, el abordaje transcanalar es el de elección. Sin embargo, para perforaciones de mayor tamaño, sin buen control de sus bordes o bien con un conducto auditivo externo tortuoso que limita la visión, es preferible el abordaje retroauricular o endoaural (105).

Abordaje transcanalar

Se realiza a través del conducto auditivo externo con la ayuda de un espéculo. Consta de una incisión superior a las 12 horas a la altura de la apófisis corta del martillo hacia el hueso del CAE, una incisión inferior a las 6 horas desde el annulus hacia el hueso del CAE, y una última incisión circunferencial posterior en el CAE que va a unir las dos anteriores (Figura 10). Esta incisión circunferencial debe hacerse de arriba abajo para evitar desgarrar la fina piel del conducto (105).

Con este tipo de abordaje habrá que realizar una incisión adicional para la obtención del injerto.

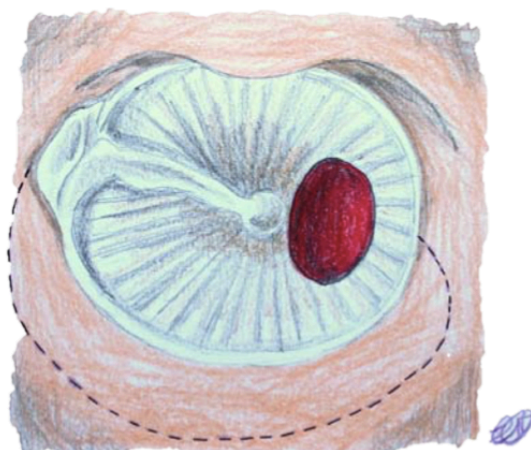


Figura 10: Abordaje transcanalar (54)

Abordaje endoaural

También se realiza a través del CAE, pero se añaden otras incisiones externas al meato que permiten una mayor exposición y, además, acceso a injertos.

El primero en proponer este abordaje fue Lempert, diseñando unas incisiones para mejorar el acceso en la cirugía de la otosclerosis (106). Posteriormente, distintos autores fueron proponiendo modificaciones en las incisiones.

Este abordaje es más rápido y menos agresivo que el retroauricular, y permite la obtención de injertos para la reconstrucción.

Se realiza una incisión intercartilaginosa, entre el cartílago del trago y la raíz del hélix, estando en contacto constantemente con el hueso del CAE. Se extiende paralelamente a la porción anterior del hélix con una forma ligeramente curvada (Figura 11).

Se continua con una segunda incisión con forma semicircunferencial situada a 4-5 mm medialmente del comienzo de la pared posterior del CAE, con una posición entre las 12 horas y las 6 horas, coincidiendo con la unión osteocartilaginosa. Se consigue una buena exposición con la ayuda de retractores (107).

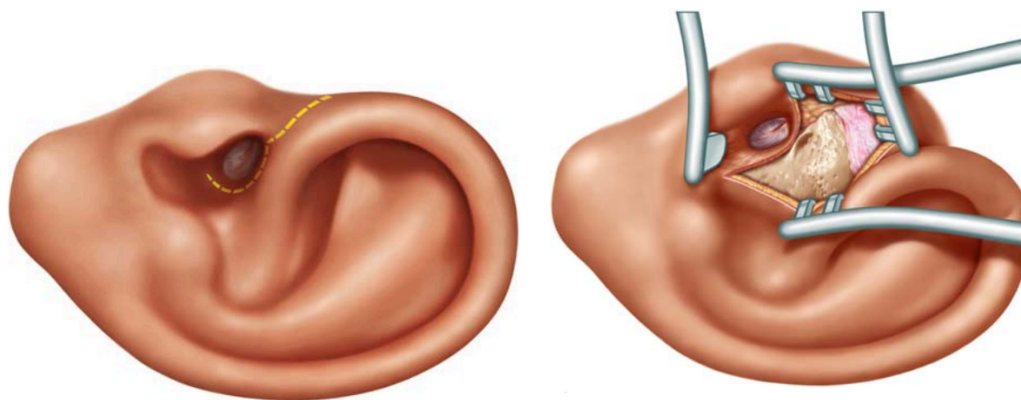


Figura 11: Abordaje endoaural: a la izquierda incisión en amarillo, a la derecha exposición con ayuda de retractores (107)

Abordaje retroauricular

Esta vía es la más utilizada en casos de amplias perforaciones, CAES con una gran prominencia de la pared anterior, o aquellos casos en los que se necesita asociar una mastoidectomía.

La incisión se realiza unos 2 mm detrás del surco retroauricular formado entre el pabellón auricular y la mastoides. Sin embargo, si se necesita la realización de colgajos se realizará hasta con 1,5 cm de separación (107). Se extiende superiormente desde el borde superior del hélix y desciende hasta la punta de la mastoides en su parte más inferior (Figura 12). Con esta incisión se consigue una amplia exposición de la fascia temporal que nos permite obtener un injerto de gran tamaño.

Después se realiza un despegamiento de todo el tejido subcutáneo y se localiza el plano subperióstico, realizando un despegamiento hacia anterior de todo el pabellón auricular hasta localizar el CAE, para realizar una incisión desde posterior a este nivel. Se continua realizando la prolongación de las incisiones del CAE y el levantamiento del colgajo timpanomeatal (105).

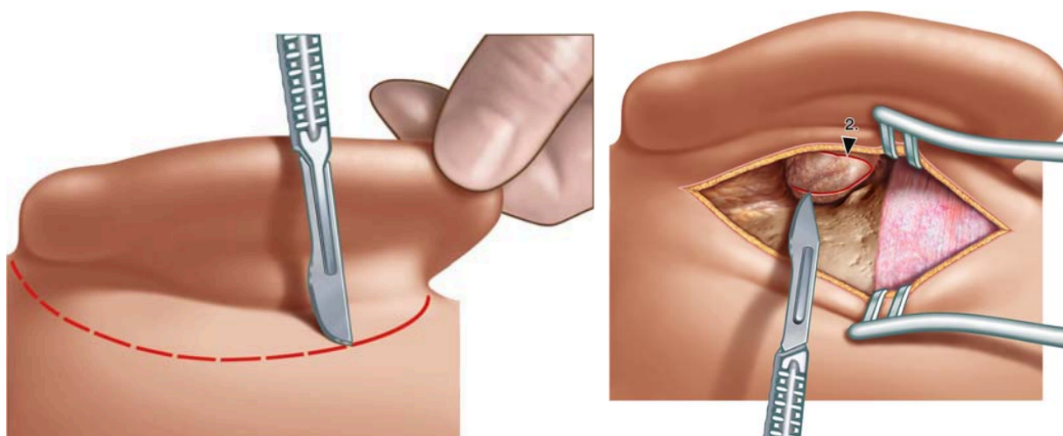


Figura 12: Abordaje retroauricular: a la izquierda incisión retroauricular, a la derecha incisión en el CAE desde acceso posterior (107)

La cirugía se puede realizar con anestesia general o bien con anestesia local y sedación, en función de las preferencias del paciente y del cirujano. En cualquier caso, es fundamental una buena infiltración con una mezcla de anestésico y adrenalina para conseguir una buena vasoconstricción que disminuya el sangrado y facilite la cirugía.

A continuación, es fundamental reavivar los bordes de la perforación para eliminar su anillo fibroso y así conseguir una mejor vascularización que facilitará la cicatrización.

En cuanto a la disposición del injerto utilizado para la reparación de la membrana timpánica, este puede ser colocado mediante una técnica inlay, medial o lateral.

La técnica inlay, “butterfly” o del injerto incrustado se lleva a cabo mediante un fragmento de cartílago que debe ser ligeramente más grande que la perforación para poder encajarlo. Los bordes del cartílago se tallan con una incisión circunferencial que permita su colocación a modo de diábolo, de forma similar a la colocación de un tubo de ventilación transtimpánico (54). A diferencia de las otras técnicas, en esta no se realizan incisiones en el CAE ni se precisa de un material de soporte.

La técnica medial o underlay (Figura 13), denominada así cuando se coloca por debajo del annulus y la capa fibrosa timpánica, es más fácil de elaborar, pero se caracteriza por no tener un soporte medial, por lo que corre el riesgo de hundirse. Para evitarlo se rellena la caja timpánica de un material de soporte (gelita, espongostan).

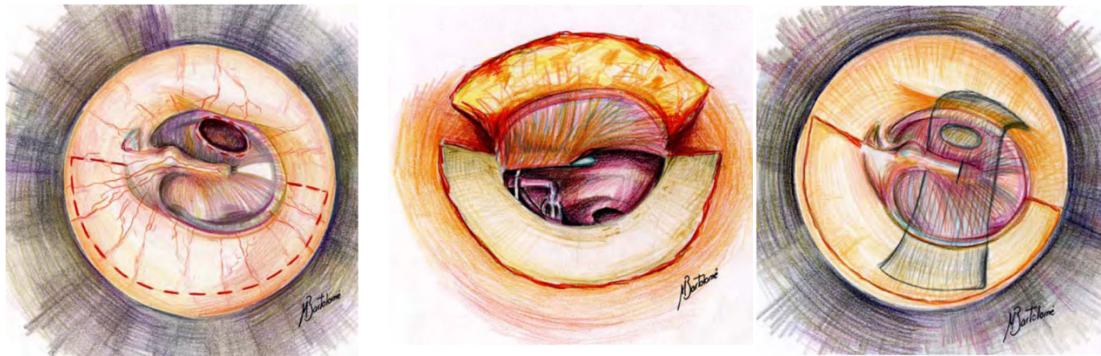


Figura 13: Técnica medial con sus distintos pasos de izquierda a derecha: incisiones; levantamiento del colgajo con exposición de la caja timpánica; colocación del injerto medial al annulus y recolocación de colgajos (108)

La técnica lateral u overlay (Figura 14) es aquella en la que el injerto se localiza lateral al ánnulus y resto timpánico, previa desepitelización completa de los restos de membrana timpánica (88).

La principal dificultad de esta técnica radica en la correcta eliminación de los restos epiteliales para evitar la posterior formación de un colesteatoma. Para ello, una vez que alcanzamos el ánnulus durante el despegamiento, proseguiremos entre la capa epitelial y la fibrosa del tímpano para ir separándola hasta llegar a la perforación en toda su extensión (108).

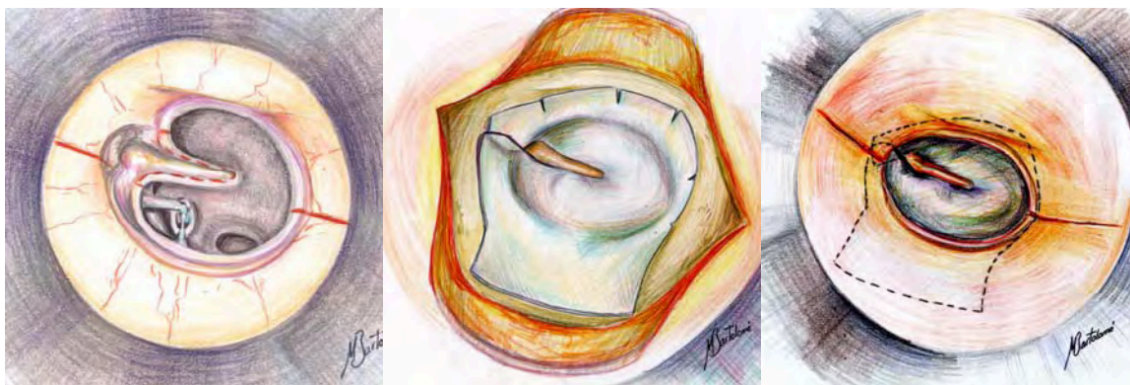


Figura 14: Técnica lateral con sus distintos pasos de izquierda a derecha: incisiones, levantamiento de colgajo y desepitelización; colocación de injerto lateral al annulus; recolocación de colgajos (108)

En una revisión de la literatura llevada a cabo por Massimiliano Nardone y colaboradores, en la que se analizaron más de 1000 pacientes, se describe una tasa global de cierre de la perforación timpánica de 82,1%. Analizándola de forma individual, observaron una mayor tasa de éxito en el cierre con la técnica lateral (86,9%) frente a la técnica medial (77,3%), incluyendo las reperforaciones ocurridas a los 10 años de seguimiento (109).

Como variación, se ha descrito recientemente una técnica denominada doble medial y lateral que combina ambas técnicas anteriormente descritas y que, según los autores, consigue mejores tasas de cierre (de hasta el 95%) que las otras técnicas (110).

1.4.3 Objetivos de la timpanoplastia

Es importante conocer que el principal objetivo de la miringoplastia es lograr la integridad de la membrana timpánica para poder aislar el oído medio del externo, evitando con ello la presencia de infecciones por continuidad o incluso el desarrollo de un colesteatoma por desplazamiento de células epidérmicas a través de la perforación.

De forma secundaria, la cirugía podría beneficiar la audición del paciente si se consigue una buena calidad del neotímpano que permita una buena movilidad, así como una

continuidad con la cadena osicular para lograr una adecuada transmisión del sonido. En este aspecto los resultados pueden ser más variables (54).

1.5 Placenta y membranas fetales

La placenta es un órgano fundamental para el intercambio de gases y nutrientes entre el feto y la madre, permitiendo así el correcto desarrollo y crecimiento fetal.

Está compuesta por el cordón umbilical, las membranas (amnion y corion), las vellosidades y la decidua (111).

Por una parte, tiene un origen fetal, proveniente de una porción del saco coriónico, y por otra parte un origen materno, la decidua, que deriva del endometrio. Esta última se denominará decidua basal, parietal o capsular en función de su localización (112,113).

El corion es la membrana fetal que cubre el saco coriónico y que está en contacto directo con la membrana materna (decidua). Durante el desarrollo embrionario y placentario, la cavidad coriónica rodeada por el corion va disminuyendo de tamaño a expensas del crecimiento del saco amniótico, rodeado por el amnios.

Inicialmente, el saco coriónico está cubierto por completo por vellosidades coriónicas que, a medida que el saco crece, se comprimen junto a la decidua capsular, llegando a degenerar en esta zona. Esto da lugar a la diferenciación del corion liso y el corion vellosos. Este último se fusiona con la decidua basal materna (Figura 15).

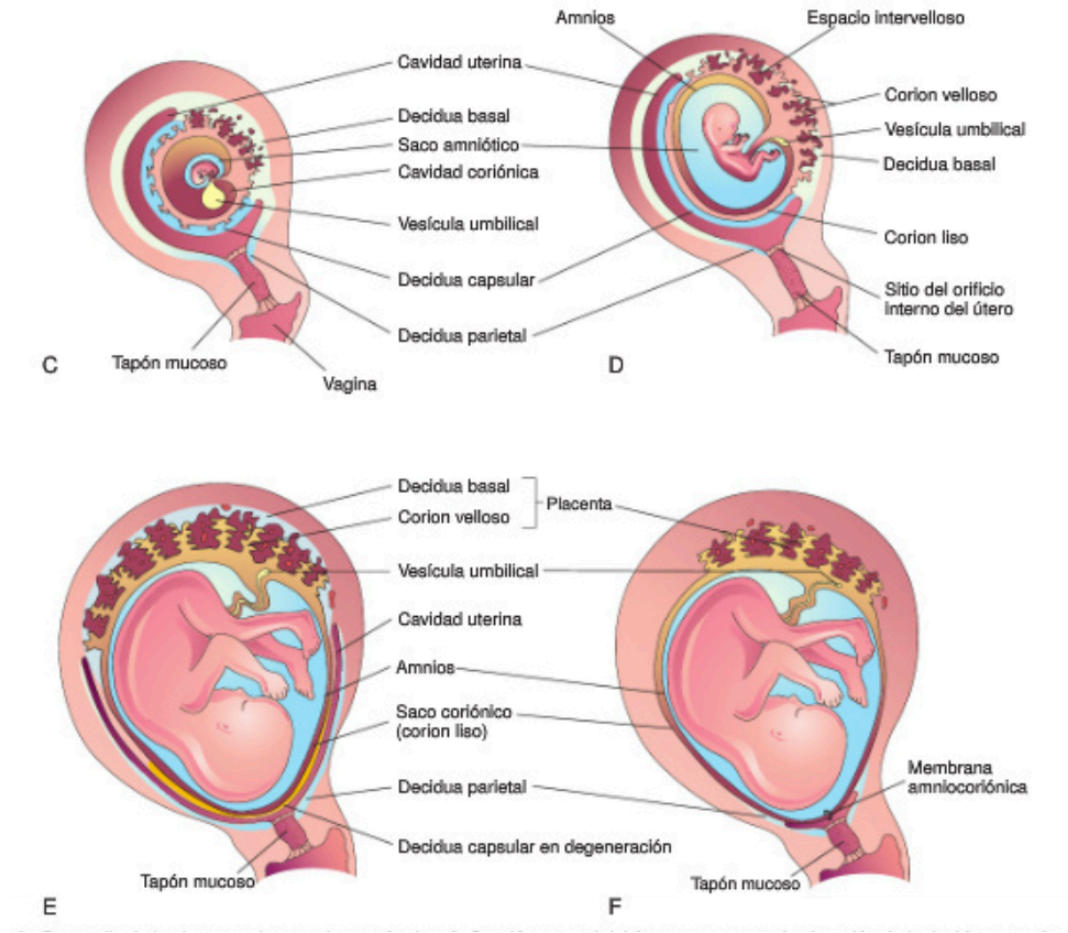


Figura 15: C a F) Secciones sagitales de un útero grávido (gestante) desde la semana 5 a la 22, que muestra la relación cambiante entre las membranas fetales y la decidua (113)

El amnios o membrana amniótica es la membrana más interna embrionaria y rodea el saco amniótico, que a su vez contiene al líquido amniótico, el cual protege al feto y brinda un medio adecuado para su crecimiento. Como hemos comentado, el saco amniótico crece más que el saco coriónico, produciéndose finalmente la unión del amnios y el corion liso con la formación de la membrana amniocoriónica. Aunque ambas capas quedan adyacentes, no están completamente fusionadas, de manera que pueden separarse fácilmente mediante disección roma (114).

Finalmente, esta membrana se fusiona con la decidua capsular que posteriormente degenerará y, tras la desaparición de esta parte de la decidua, se adhiere a la decidua

parietal. En el momento en que se rompe la membrana amniocoriónica es cuando se produce la salida de líquido amniótico a través del útero y vagina.

1.5.1 Características macroscópicas e histología de la membrana amniótica

La membrana amniótica (amnios o amnion) tiene un espesor medio de 0,2 a 0,4 mm.

Se caracteriza macroscópicamente por ser de aspecto liso, brillante, transparente, con una coloración ligeramente grisácea-azulada. Es avascular y carece de conexiones nerviosas o linfáticas. Para su uso, el amnios debe ser separado del corion y la placenta lo más pronto posible tras el alumbramiento (111,115).

Histológicamente se puede dividir en tres capas, una capa epitelial adyacente al feto, una membrana basal y el estroma. El estroma a su vez se divide en una capa compacta, una capa fibroblástica y una capa externa esponjosa (Figura 16) (116,117).

La capa epitelial está compuesta por células cuboides, denominadas células del epitelio amniótico humano, y distribuidas como una monocapa sobre la membrana basal.

La membrana basal se encuentra sobre una capa de estroma de tejido conectivo, caracterizado por la abundante presencia de colágeno y de escasas células (fibroblastos y células madre mesenquimales amnióticas). Se subdivide en una capa compacta, otra fibroblástica y otra esponjosa (111).

Es importante recalcar la presencia de dos tipos de células madres, las epiteliales y las mesenquimales, cuya intervención será fundamental para las distintas propiedades de la membrana.

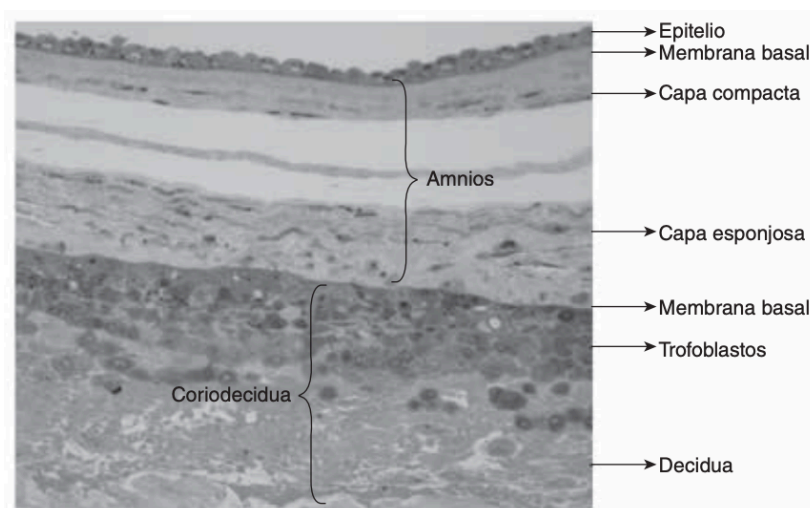


Figura 16: Corte semifino (1 µm) transversal de la membrana fetal humana de 40 semanas de gestación obtenida mediante cesárea programada. Se distinguen las dos regiones que la constituyen: amnios y corion (20X) (Modificada de la Tesis de Maestría de Guadalupe García-López, UNAM, 2007) (117)

1.5.2 Propiedades de la membrana amniótica

Se caracteriza por presentar abundantes factores de crecimiento y citoquinas que le otorgan una serie de propiedades a destacar:

Es especialmente útil para ayudar en una adecuada reepitelización, pudiendo acelerar dicho proceso. Algunos de los factores de crecimiento que intervienen para ello son el FGF-6, VEGF, KGF, HGF y NT-4 entre otros (115,116)

Posee propiedades antiinflamatorias mediadas por algunas interleuquinas (ej: IL-10, IL-1, IL-1Ra). También contribuye en ello su capacidad para atrapar células inflamatorias e inducirles la apoptosis (116).

Destaca una capacidad dual frente a la angiogénesis. Por un lado, posee factores antiangiogénicos potentes como pueden ser endostatinas o el factor inhibidor de la metaloproteasa (TIMP-1, 2, 3 y 4) entre otros. Las células del epitelio amniótico son capaces de suprimir la proliferación capilar y, además, junto con las células madre mesenquimales amnióticas, producen colágeno XVIII que tiene propiedades

antiangiogénicas (116). Esto es especialmente útil en enfermedades corneales que cursan con neovascularización (115).

Por otro lado, se ha evidenciado una actividad pro-angiogénica favorecida por factores como PDGF o VEGF, secretados por las células madre mesenquimales, cuya utilidad destaca para el tratamiento de úlceras cutáneas y cicatrización de heridas (116).

Actúa como inhibidor de la fibrosis mediante una regulación a la baja de la expresión de TGF- β 3 y su receptor, promoviendo la curación de las heridas en lugar de la formación de cicatrices.

También presenta propiedades antibacterianas, especialmente contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, entre las cuales destaca *Klebsiella pneumonia*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella flexneri* (116). Por un lado, como se ha visto al ser utilizada en defectos corneales, se postula que al producirse el cierre biológico de la herida sobre la que se aplica, se produce una instauración más rápida de tejido de granulación con buena vascularización que facilita la presencia de leucocitos y la eliminación de restos necróticos (115).

Por otro lado, se ha visto que intervienen factores como son la elafina, HBD-2 y 3, la transferrina o la lisozima entre otros (116).

Presenta una escasa inmunogenicidad que se atribuye a la baja expresión de HLA-A, B, C y DR, así como a la ausencia de expresión de CD86, CD40, CD80. Gracias a esto se ha visto que no produce respuestas inmunológicas a nivel local en el lugar del implante, y tampoco favorece la presencia de anticuerpos HLA en el suero de los receptores (111). Esto facilita su uso en medicina por la escasa probabilidad de rechazo y, de este modo, permite evitar la necesidad de realizar estudios de compatibilidad (116). Algunos investigadores como Kupo et al. investigaron la respuesta inmune generada en un xenotrasplante, usando membrana amniótica humana en ratas, obteniendo también buena tolerancia (118).

Gracias a todas estas propiedades podríamos pensar que se trata de un material idóneo para un injerto, especialmente en lugares en los que interese la transparencia del mismo (como podría ser la cornea o la membrana timpánica).

1.5.3 Usos en medicina

El primer uso de la membrana amniótica en medicina tuvo lugar en 1910 como trasplante cutáneo (119). Poco después, en 1913, comenzó a ser utilizada para el tratamiento de úlceras y quemaduras cutáneas (120). Se demostró que su uso aceleraba el proceso de epitelización y reducía el dolor en estos pacientes, habiendo sido ampliamente utilizada posteriormente con esta finalidad.

En 1940 tuvo su primer uso en oftalmología, llevado a cabo por De Röth (121), siendo a día de hoy el campo de la medicina en el que su uso está más extendido, destacando su utilidad para cubrir defectos, perforaciones o quemaduras corneales (122–124) para la reconstrucción de la conjuntiva tras la cirugía del pterigion (125), como refuerzo del soporte límbico (123,124) o para reducir la fibrosis en la cirugía del estrabismo (126).

Ha sido utilizada con buenos resultados en la cirugía de cabeza y cuello para cubrir heridas producidas tras la necrosis de colgajos, como por ejemplo en disecciones cervicales por laringectomías o por parotidectomías (127).

También ha sido descrito su uso como injerto para el cierre de defectos en cavidad oral o faringe. Destaca un estudio realizado en 2013 por Khademi et al. en el que utilizaron membrana amniótica para cubrir los defectos producidos tras la exéresis de lesiones tumorales a nivel de suelo de boca, retromolares, paladar o lengua. En todos los pacientes se observó una buena epitelización con formación de tejido de granulación y buen control del dolor (128).

Entre otros usos más variados destaca como remplazamiento de la mucosa nasal en la enfermedad de Rendu-Osler-Weber (129), tratamiento de enfermedades periodontales (130), reconstrucción de suelo pélvico o como injerto para realización de una vaginoplastia en casos de agenesis vaginal (131).

Dentro de la otología, el primer artículo en el que se menciona su uso data de 1944, cuando fue utilizada por Max Sugar para cubrir cavidades mastoideas tras realizar una mastoidectomía radical (132). Esta aplicación como injerto para reepitelizar cavidades mastoideas ha sido utilizada posteriormente por otros autores, obteniendo buenos

resultados (133,134). El primer uso como injerto para realización de miringoplastias fue descrito en 1954 por William J Schrimpf, obteniendo el cierre de la perforación en 48 de los 53 pacientes del estudio (135).

1.5.4 Usos en miringoplastias

Los estudios más recientes respecto al uso de membrana amniótica en las miringoplastias son aquellos publicados entre 2005 y 2014. El primero de ellos fue llevado a cabo en Malasia por Harvinder et al donde compararon la tasa de cierre de las perforaciones y el cierre del umbral diferencial auditivo en las miringoplastias realizadas con membrana amniótica liofilizada frente a fascia temporal, obteniendo mejores resultados con la membrana amniótica (136).

El segundo data de 2008 y se realizó en Corea por Seo-Kyun Mun et al. Estudiaron un total de 14 pacientes a los que les realizaron una miringoplastia con membrana amniótica, obteniendo una tasa de cierre del 93% (137).

El tercero fue llevado a cabo en 2010, en Egipto, por Fouad y colaboradores. Compararon el uso de membrana amniótica congelada con el uso de fascia de temporal y concluyeron que no había diferencias estadísticamente significativas en el cierre de la perforación ni del umbral diferencial auditivo, aunque sí existía una reducción estadísticamente significativa del tiempo medio de la intervención (54 minutos frente a 75 minutos) (138).

El último se realizó en 2014 en Estados Unidos por Griffith y colaboradores, y utilizaron membrana amniótica deshidratada para el cierre de perforaciones, obteniendo tan solo un 42,9% de cierre de la perforación aunque una mejoría auditiva del 100% (139).

Posteriormente, se han planteado dos nuevos estudios comparando la timpanoplastia con membrana amniótica y con fascia temporal, que aparecen reflejados en la literatura en la U.S National Library of Medicine, llevados a cabo en Baqiyatallah (Irán, 2017) (140) y en Columbia (Misuri, EEUU, 2018) (141), sin haber sido aún publicados los resultados.

1.5.5 Obtención, procesamiento y conservación de la membrana amniótica

La membrana amniótica se obtiene de la placenta tras partos realizados mediante cesárea electiva. Esto es así para reducir al mínimo la posibilidad de contaminación bacteriana, la cual es mayor si se obtiene por vía vaginal.

Las pacientes donantes deben haber firmado el consentimiento informado con la autorización y, además, deben ser sanas, sin antecedentes personales de interés y con buen control durante el embarazo. Previamente al parto se les realiza una serología para descartar infección por virus de la hepatitis B, hepatitis C, sífilis y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (111,115,142).

Tras la extracción quirúrgica en condiciones de esterilidad, la membrana amniótica es procesada en el banco de tejidos y se separa del corion. Se lava con solución salina y PBS (phosphate buffered saline o tampón fosfato salino), así como con una solución antibacteriana variable en la literatura, siendo una de las más utilizadas una mezcla que contiene penicilina 50 µg/ml, estreptomicina 50 µg/ml, neomicina 100 µg/ml y anfotericina 2,5 µg/ml (111,115,142,143). Tras esto se corta en piezas de aproximadamente 3 x 4 cm y se une con un papel de nitrocelulosa esterilizado.

El método de conservación más usado, sobre todo para la membrana destinada a la cirugía ocular, es la criopreservación. Para ello, los fragmentos son introducidos en viales estériles que contienen una mezcla de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y glicerol en una proporción 1:1, y se almacenan a -80° C (111,115,116,143). El medio crioprotector puede ser distinto, habiéndose descrito otros medios como el Eusol-C o el alcohol (115), el dimetilsulfóxido (DMSO) o incluso el nitrógeno líquido (144).

1.5.5.1 Criopreservación y liofilización

Los procesos llevados a cabo en la actualidad para conservar la membrana amniótica se pueden diferenciar en dos grandes grupos: aquellos basados en la disminución de la temperatura y aquellos basados en la deshidratación del tejido (144).

Dentro de los métodos de conservación por frío se pueden distinguir dos tipos:

Aquellos en los que se almacena entre 0 y 4° C, denominada membrana amniótica no preservada, que puede ir con o sin antibióticos en dilución asociados. Con este proceso se consigue un enlentecimiento del metabolismo, pero sin llegar a detenerlo.

Esta membrana es la más parecida al tejido en fresco, con menor daño estructural y con mayor contenido de citoquinas y factores de crecimiento (144).

Sin embargo, se acaban produciendo una serie de cambios en su estructura que, en función del líquido de conservación empleado, permite una viabilidad que puede variar entre 24 horas (145,146) y 12 días (147), no permitiendo mantenerla conservada durante largos periodos de tiempo.

Por otro lado, se habla de membrana amniótica criopreservada cuando se consigue su conservación con temperaturas inferiores a 0° C. Normalmente se utiliza una temperatura de -80° C, y es fundamental el uso de un líquido de conservación formado por un medio de cultivo (generalmente DMEM) y un crioprotector (generalmente glicerol o DMSO) (144,148–151).

Gracias a los crioprotectores se reduce el daño celular sufrido en los procesos de congelación y descongelación (152,153). Aun así, el daño epitelial es mayor que en la técnica previa, lo cual en parte es beneficioso por disminuir la posible inmunogenicidad presente (143). Además, la criopreservación mantiene la arquitectura original de la matriz extracelular de la membrana amniótica y la actividad de las señales biológicas clave (que se puede ver disminuida, por ejemplo, en los liofilizados) (143).

Uno de sus principales inconvenientes es que requiere de condiciones especiales y costosas para el transporte y almacenamiento.

Por último, destaca la conservación por dsecación o liofilización que, a diferencia de los anteriores, permite su almacenaje a temperatura ambiente.

El procedimiento consta de distintas etapas, comenzando por un primer paso de congelación que forma hielo, seguido de la extracción del agua por sublimación (pasando de hielo a gas). Posteriormente tiene lugar una dsecación secundaria en la que se eleva la temperatura hasta el valor máximo que tolere el tejido, lo cual reduce el agua residual hasta niveles incompatibles con el crecimiento biológico y reacciones químicas (144). Tras esto queda envasada y para su uso requiere de una última fase de hidratación.

Su principal ventaja es que se mantiene envasada a temperatura ambiente, lo cual facilita su almacenamiento y su transporte.

Como inconveniente se ha visto que presenta menos factores de crecimiento (116).

1.5.6 Métodos de implantación

Su uso extendido en oftalmología ha permitido definir distintos métodos de implantación en función de la alteración del tejido receptor. Así, puede utilizarse como injerto, como recubrimiento, o como una combinación de ambos.

Se utiliza el injerto en los casos de lesión más profunda en los que hay un defecto tisular, de modo que el borde estromal de la membrana amniótica estará en contacto o sustituirá la matriz estromal ausente, facilitando la presencia de un soporte sobre el cual se generará una nueva epitelización hasta sustituir a esa membrana, que se irá reabsorbiendo progresivamente. Se puede decir que actúa como una membrana basal sobre la que se desarrollará el nuevo epitelio (Figura 19).

Por otro lado, cuando hay un defecto más superficial que solo afecta al epitelio, se utiliza la membrana amniótica como recubrimiento, aplicando su borde epitelial sobre el defecto. Esto favorece la protección mecánica por un lado y, por otro, gracias a los factores de crecimiento y citoquinas presentes en esta cara, favorece que las células epiteliales comiencen a crecer bajo ella, promoviendo la regeneración epitelial y reduciendo la inflamación (111,154).

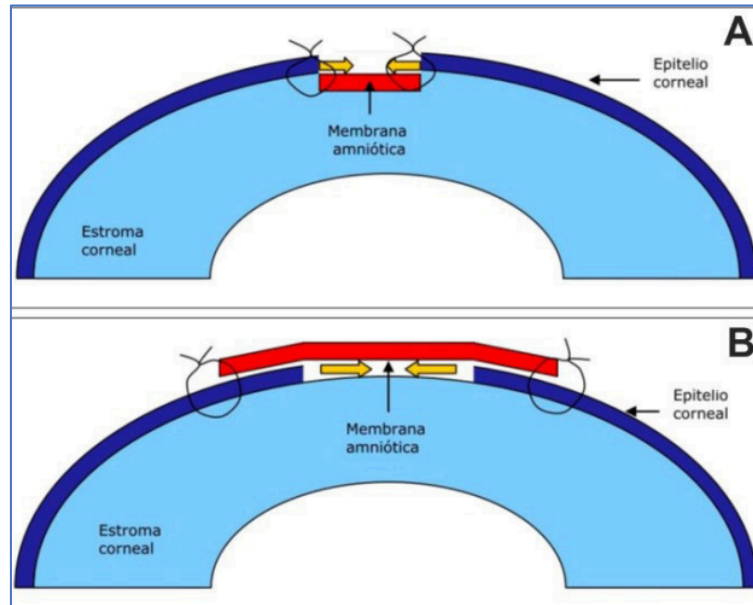


Figura 19: A) Membrana amniótica como injerto. B) Membrana amniótica como recubrimiento
(154)

2. JUSTIFICACIÓN

Como hemos visto, existe una gran variedad de materiales utilizados como injerto para la realización de una miringoplastia. Desde la antigüedad hasta día de hoy, se ha probado con injertos autólogos, heterólogos (tanto aloinjertos como xenoinjertos), e incluso con materiales inertes para tal fin.

La existencia de esta gran variedad, sumado al hecho de que se sigan haciendo estudios para investigar nuevos materiales para el cierre de las perforaciones, nos hace pensar que aún no se ha descubierto un material idóneo que prevalezca por encima del resto.

Dicho material idóneo sería aquel que poseyese, por un lado, aquellas características que lo asemejasen lo máximo posible a la membrana timpánica original (transparencia y elasticidad entre otras) y, por otro lado, que fuese de fácil obtención y fácil manipulación en quirófano.

Teniendo en cuenta las numerosas propiedades beneficiosas de la membrana amniótica como son la capacidad antiinflamatoria, antibacteriana, la capacidad de estimular la regeneración tisular, su capacidad antifibrótica y su baja inmunogenicidad, sumado a sus características físicas como son la transparencia y elasticidad, así como su amplio uso aceptado en otros ámbitos de la medicina con buenos resultados, consideramos que sería un material de injerto idóneo para la realización de miringoplastias.

Por otro lado, los escasos estudios clínicos existentes respecto a su uso en miringoplastias, así como la ausencia de estudios preclínicos, nos hace plantearnos la necesidad de elaborar un primer estudio preclínico para demostrar su seguridad y eficacia, así como evaluar su manejo de la forma más acertada, en perforaciones timpánicas previamente cronificadas en un modelo animal.

La finalidad última sería, en un segundo tiempo, desarrollar un modelo clínico que permita su uso en perforaciones timpánicas humanas con la mayor seguridad posible.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Investigar la eficacia de los injertos de membrana amniótica en el tratamiento de las perforaciones timpánicas cronificadas en ratas Sprague Dawley.

3.2 Objetivos específicos

1. Comparar el porcentaje de cierre de perforaciones timpánicas cronificadas en ratas, usando membrana amniótica como injerto, frente al grupo control.
2. Comparar el tiempo transcurrido hasta conseguir el cierre de perforaciones timpánicas cronificadas en ratas, usando membrana amniótica como injerto, frente al grupo control
3. Comparar histopatológicamente los cambios producidos en la membrana timpánica, al usar membrana amniótica como injerto para el cierre de perforaciones timpánicas cronificadas en ratas, frente al grupo control.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 Instalaciones físicas

El trabajo de investigación ha sido llevado a cabo en el laboratorio instalado en el Centro de Experimentación e Investigación Biosanitaria (CEIB), perteneciente a la Universidad de Murcia, localizado en El Palmar. En dicho edificio se encuentran las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal. Consta de dos plantas y se divide en dos zonas, una destinada a la cría y mantenimiento de roedores con diferentes condiciones de bioseguridad y otra zona con salas destinadas a la realización de procedimientos experimentales. Ambas zonas están separadas por el área administrativa.

La zona de mantenimiento consta de jaulas metabólicas rata-ratón, de un sistema de aspiración de virutas, de cabinas de lavado y desinfección de racks y jaulas, así como un equipo de limpieza y esterilización de jaulas. Además, se regulan los factores ambientales para mantener una temperatura y humedad adecuadas, siendo esta de 20°C y 48% respectivamente, así como una buena ventilación y presurización. También se controla la iluminación con un temporizador automático para mantener ciclos de luz de 12 horas y 12 horas de oscuridad, así como aislamiento posible de ruido.

Los roedores fueron mantenidos en cubetas libres de patógenos específicos (SPF), con sistemas de Racks ventilados con presión positiva, y con entrada para agua y comida (Figura 20).

La zona de laboratorio consta de una mesa de trabajo con un microscopio marca Zeiss (Alemania), una fuente de luz fría marca Karl Storz modelo xenon nova 20131520 (Alemania), una báscula digital para poder pesar a las ratas, un contenedor de residuos biológicos, y un amplio espacio para poder realizar las intervenciones y poder registrar los datos (Figura 21).



Figura 20: Ratas en cubetas con sistema Racks ventilados

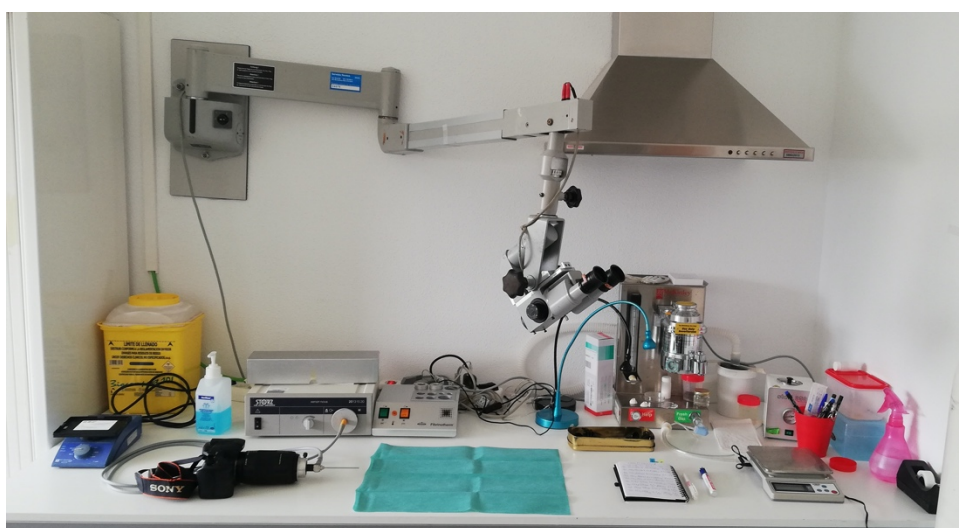


Figura 21: Mesa de laboratorio con parte del material utilizado durante las intervenciones

El trabajo ha sido llevado a cabo respetando los principios éticos sobre protección de animales empleados en investigación nacionalmente, expuestos en la legislación vigente (BOE) (155–157). Para ello contamos con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia.

Además, disponemos de la autorización del Servicio de Sanidad Animal de la Consejería de Agricultura y Agua, concedida por la Dirección General de Ganadería y Pesca (Anexo 1).

4.2 Animales

Para el trabajo se han utilizado ratas de la cepa Sprague Dawley (Figura 22), todas ellas machos y de 8 semanas de edad, sin patología aguda de oído medio o externo.

Se caracterizan por ser muy tranquilas y fáciles de manejar, lo cual las convierte en animales ampliamente utilizados en la investigación médica. Son albinas y de adultas suelen pesar entre 250-300g las hembras y 450-550g los machos. Su vida media suele ser entre 2,5 y 3,5 años. La camada suele tener un tamaño medio de 11 crías, teniendo un periodo de gestación medio de 22 días. A partir de las 4 semanas de vida ya comen una dieta de adultos, considerándose independientes.



Figura 22: Rata macho Sprague Dawley

4.3 Instrumental y materiales empleados

En primer lugar, como material anestésico, hemos utilizado Ketamina a una dosis de 40 a 90 mg/Kg y Xilacina a una dosis de 5-10 mg/kg (158). Las marcas utilizadas fueron Ketolar® de laboratorios Parke Davis SL (ketamina 50mg/ml) y Xilasic® 2% de laboratorios Calier (xilacina 20mg/ml) (Figura 23).

La ketamina es un anestésico general no barbitúrico, usado tanto en humanos como en animales, que se caracteriza por tener una acción rápida y lograr una analgesia profunda, así como sedación, inmovilidad y amnesia. No tiene gran capacidad miorelajante.

Por otro lado, la xilacina es de uso típico en veterinaria, y se caracteriza por sus propiedades sedantes, analgésicas y miorelajantes.

Para su administración se utilizaron jeringuillas de insulina de 1ml de capacidad, con agujas 25 G x 5/8 (0,5 x 16 mm).

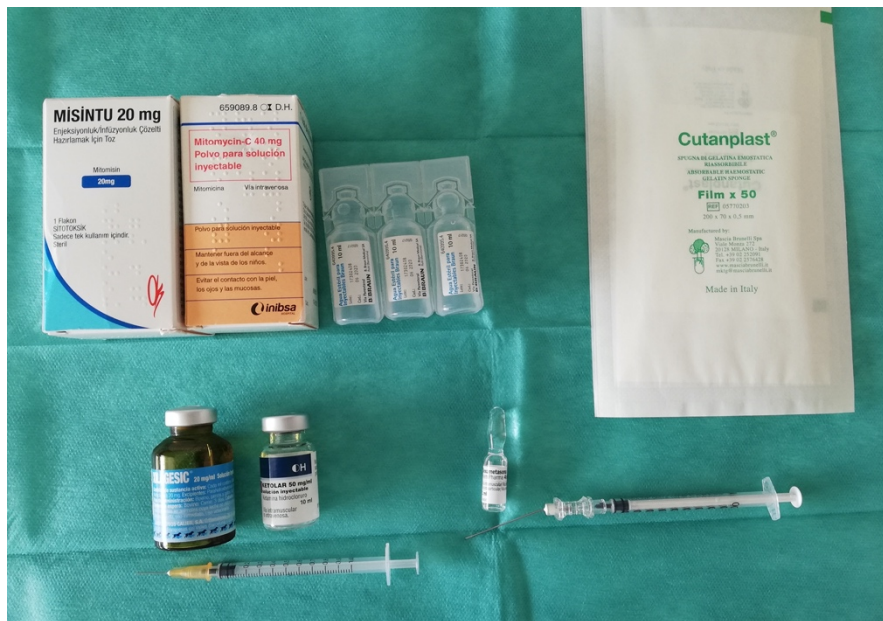


Figura 23: Mitomicina C, Xilacina, Ketamina, Agua estéril, Dexametasona, Cutanplast y agujas y jeringuillas utilizadas

Para el procedimiento se utilizaron paños estériles como campo quirúrgico sobre el cual poner a la rata. Por otro lado, como material quirúrgico se utilizó un espéculo de oído, una micropinza de Hartmann, un punzón agudo y una espátula de Rosen circular nº 5 (0.8 mm de diámetro) de la caja de timpanoplastia acodada del Dr. Salvá (Figura 24).



Figura 24: Espéculo de oído, punzón de timpanoplastia, despegador de Rosen, Micropinza de Hartmann

Aunque todo el trabajo fue realizado mediante visualización a través del microscopio, también se usó la fuente de luz fría de la marca Karl Storz como fuente de luz para la óptica rígida de 0° y 3 mm de diámetro (marca GAES audiotest HD), que se utilizó con un adaptador para fijarla a la cámara Sony, modelo alpha 200 con objetivo macro. Esto permitió poder fotografiar todo el estudio (Figura 25).



Figura 25: Cámara de fotos Sony con adaptador para fijación de óptica y fuente de luz fría

Para cada grupo de ratas se utilizó en el proceso de cronificación un frasco de mitomicina C (Mitomycin C®) fabricada por laboratorios Inibsa y Onko Ilac, que se diluía con agua biodestilada estéril hasta obtener una concentración de 0,4 mg/ml. El exceso sobrante fue desechado en cada serie. También se utilizaron fragmentos de cutanplast (Cutanplast®), una esponja gelatinosa hemostática reabsorbible, que sirvieron como medio para la aplicación de la mitomicina y como medio de soporte para el injerto en la miringoplastia posteriormente.

Además, se usaron ampollas de Dexametasona (Kern Pharma) con una concentración de 4 mg/ml que se aplicaron con una jeringa y una aguja para anestesia intradural biselada tipo Quincke (Spinocan® - B.Braun) de 22G x 1 ½ (0,7 x 40 mm) (Figura).

Por último, utilizamos membrana amniótica humana obtenida de parto por cesárea programada y criopreservada a -80°C sobre una lámina de nitrocelulosa. Los fragmentos eran cuadrados de aproximadamente 3x3 cm y se conservan en tubos estériles que previamente habían sido rellenos con unos 10 ml de una mezcla crioprotectora (Figura 26). Dicha mezcla está constituida por 9 ml de albúmina humana (15%), 9 ml de DMSO (15%) y 42 ml de medio de cultivo TC-199. Además, la membrana había sido lavada previamente con una solución antibiótica que contiene 0,3 ml de Cotrimoxazol (48 mg), 1 ml de Tobramicina (50 mg) y 1 ml de Vancomicina (50 mg).

La membrana amniótica se descongeló a una temperatura de 37°C utilizando un baño María digital de laboratorio marca Nahita modelo 601 (Figura 27).

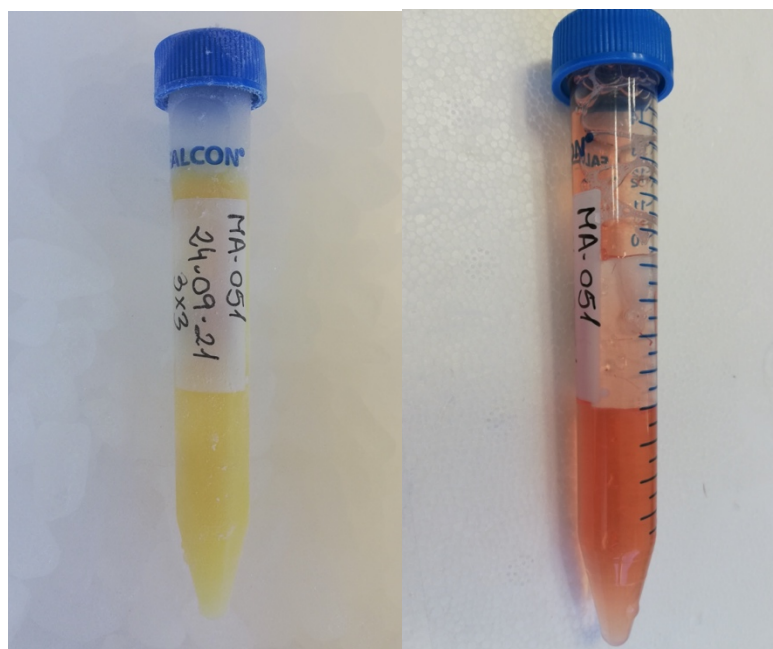


Figura 26: A la izquierda tubo con membrana amniótica congelada en medio crioprotector. A la derecha tras descongelar en baño María, pudiendo apreciarse lámina blanquecina de nitrocelulosa



Figura 27: Baño María digital de laboratorio

4.4 Diseño del estudio

Para este estudio hemos realizado un ensayo prospectivo analítico con un total de 37 ratas Sprague Dawley (74 oídos) y las hemos agrupado en cuatro grupos distintos, que se nombraron con las letras A, B, C y D. De cada uno de ellos surgieron dos subgrupos, como podemos ver a continuación (Tabla 2).

El **grupo A** estaba formado por 8 ratas a cuyos oídos se les realizó una perforación en la membrana timpánica con amputación del mango del martillo. Dicha perforación se cronificó con mitomicina C y dexametasona. A continuación, con los oídos resultantes con perforaciones cronificadas se realizaron dos subgrupos:

Grupo A1: Las perforaciones timpánicas fueron tratadas, en primer lugar, con la reavivación del borde de la perforación y, en segundo lugar, con la colocación de membrana amniótica en modo “diábolo”, con una porción de la membrana amniótica apoyada sobre el resto timpánico y la otra en el interior de la caja timpánica.

Grupo A2: Las perforaciones timpánicas fueron tratadas únicamente con reavivación de los bordes de la perforación.

El **grupo B** estaba formado por 5 ratas a cuyos oídos se les realizó una perforación en la membrana timpánica con amputación del mango del martillo. Dicha perforación se cronificó con mitomicina C y dexametasona. A continuación, con los oídos resultantes con perforaciones cronificadas se realizaron dos subgrupos:

Grupo B1: Las perforaciones timpánicas fueron tratadas, en primer lugar, con la reavivación del borde de la perforación y, en segundo lugar, con la colocación de membrana amniótica en modo “diábolo”, con una porción de la membrana amniótica apoyada sobre el resto timpánico y la otra en el interior de la caja timpánica. Posteriormente se añadió un fragmento de cutanplast por encima que estaba en contacto con la membrana amniótica y el resto timpánico.

Grupo B2: Las perforaciones timpánicas fueron tratadas, en primer lugar, con la reavivación de los bordes de la perforación y, en segundo lugar, con la colocación de un fragmento de cutanplast apoyado en el resto timpánico y cubriendo la totalidad de la perforación.

El **grupo C** estaba formado por 7 ratas a cuyos oídos se les realizó una perforación en la membrana timpánica con amputación del mango del martillo. Dicha perforación se cronificó con mitomicina C y dexametasona. A continuación, con los oídos resultantes con perforaciones cronificadas se realizaron dos subgrupos:

Grupo C1: Las perforaciones timpánicas fueron tratadas, en primer lugar, con la reavivación del borde de la perforación. En segundo lugar, se rellenó la caja timpánica con cutanplast y se colocó un fragmento de membrana amniótica en modo underlay entre la cara medial timpánica y el cutanplast de la caja. Por último, se añadió un fragmento de cutanplast por encima que estaba en contacto con la membrana amniótica y el resto timpánico.

Grupo C2: Las perforaciones timpánicas fueron tratadas, en primer lugar, con la reavivación del borde de la perforación. En segundo lugar, se rellenó la caja timpánica con cutanplast y, por último, se añadió un fragmento de cutanplast por encima que estaba en contacto con los bordes de la perforación y el resto timpánico.

El **grupo D** estaba formado por 17 ratas a cuyos oídos se les realizó una perforación en la membrana timpánica con amputación del mango del martillo. Dicha perforación se cronificó con mitomicina C y dexametasona. A continuación, con los oídos resultantes con perforaciones cronificadas se realizaron dos subgrupos:

Grupo D1: Las perforaciones timpánicas fueron tratadas, en primer lugar, con la reavivación del borde de la perforación y, en segundo lugar, con la colocación de membrana amniótica en modo overlay, extendiendo la membrana sobre la perforación timpánica y estando en contacto con la cara lateral del resto timpánico. Posteriormente se añadió un fragmento de cutanplast por encima que estaba en contacto con la membrana amniótica y el resto timpánico.

Grupo D2: Las perforaciones timpánicas fueron tratadas, en primer lugar, con la reavivación de los bordes de la perforación y, en segundo lugar, con la colocación de un fragmento de cutanplast apoyado en el resto timpánico y cubriendo la totalidad de la perforación.

Tabla 2: Grupos y subgrupos del ensayo con su tratamiento. MA: membrana amniótica

Grupos	Subgrupos	Tratamiento
A	A1	Reavivar + MA diábolo
	A2	Reavivar solo
B	B1	Reavivar + MA diábolo + cutanplast externo
	B2	Reavivar + cutanplast externo
C	C1	Reavivar + cutanplast interno + MA unederlay + cutanplast externo
	C2	Reavivar + cutanplast interno y externo
D	D1	Reavivar + MA overlay + cutanplast externo
	D2	Reavivar + cutanplast externo

4.5 Criterios de selección

Una vez finalizado el proceso de cronificación de las perforaciones timpánicas (semana 8), se revisaron todos los oídos y se aplicaron los siguientes criterios de selección para incluir en el estudio experimental:

Criterios de inclusión:

1. Oídos que presentaban una perforación timpánica seca

Criterios de exclusión:

1. Oídos que presentaban un tímpano íntegro debido al cierre espontáneo de la perforación timpánica.
2. Oídos que presentaban signos de infección activa el día de la realización de la miringoplastia

4.6 Procedimiento

Para comenzar, se realizó un archivo para poder anotar todos los datos del ensayo, incluyendo el número de identificación de cada rata, su peso, la anestesia aplicada en cada intervención, el grupo al que pertenecía, la fecha de la intervención, el oído implicado y observaciones. Una vez obtenida la perforación y en función del tamaño de ésta, se decidió el protocolo terapéutico y se anotó el tamaño de la perforación y la presencia de cierre.

Para la anestesia se utilizó una mezcla de Ketamina a dosis de 90 mg/kg y Xilacina a dosis de 10 mg/kg. En las intervenciones más largas (la realización de la perforación y la aplicación de membrana amniótica) se utilizaron 0.8 ml de la mezcla, con lo que las ratas se mantenían dormidas aproximadamente entre 45 y 60 min. Para las revisiones se utilizó 0.4 ml de dicha mezcla, teniendo en estos casos una duración aproximada de entre 20 y 30 minutos. La anestesia se aplicó de modo intraperitoneal con una aguja de insulina de 0.5 x 16 mm, realizando una punción en el lateral derecho del abdomen.

Una vez dormidas se pesaban y se identificaban con un número que se marcaba en su cola con un rotulador permanente.

4.6.1 Perforación y cronificación

La primera intervención, realizada del Día 0 y común a todas las ratas, consiste en la realización de una perforación timpánica controlada y su cronificación (77). Todos los pasos durante todo el ensayo fueron fotografiados (Anexo 2).

Tras aplicar 0.8 ml de la mezcla de Ketamina – Xilacina y comprobar la integridad de la membrana timpánica y ausencia de enfermedad, se procedió a aplicar la mitomicina C. En primer lugar, se hizo una reconstitución de la mitomicina C en polvo con agua bidestilada hasta conseguir una concentración de 0.4 mg/ml. Para ello, se utilizaron 50 ml de agua bidestilada en las presentaciones de 20 mg de mitomicina C, y 100 ml en las presentaciones de 40 mg. Para cada grupo de ratas se empleó un frasco nuevo, desechando el sobrante.

Posteriormente, se cortaron fragmentos de cutanplast de aproximadamente 3 mm de diámetro mayor y se impregnaban con 0.1 ml de la solución de mitomicina C. Dicho fragmento empapado se aplicó sobre la membrana timpánica con el punzón agudo de la caja de timpanoplastia del Dr Salvá, a través del espéculo de oído, de modo que cubría la totalidad timpánica en contacto directo, y se dejó actuar durante 10 minutos.

Pasado ese tiempo se extrajo el fragmento de cutanplast y se realizó una perforación timpánica utilizando el punzón agudo, a través del espéculo de oído. Además, con el mismo punzón se realizó la amputación del mango del martillo, que se extrajo con la micropinza de Hartmann.

Para medir el tamaño de las perforaciones se utilizó la espátula de Rosen nº5 y se estableció una unidad de medida en base a dicho instrumento. De este modo, hablaremos en unidades rosen, que supondrá el número de veces que aplicamos la espátula para medir la perforación. Se midió el diámetro antero-posterior (AP) y cráneo-caudal (CC).

Todos los tímpanos fueron fotografiados antes y después de la perforación.

Posteriormente, los días 3, 7, 10 y 14, tras aplicar 0.4 ml de la mezcla Ketamina – Xilacina, se aplicó comúnmente en todos los oídos una solución de Dexametasona (concentración de 4 mg/ml) llenando a través de la perforación el oído medio y el externo de cada rata. Para ello se utilizó una aguja para anestesia intradural biselada tipo Quincke de 0.7 x 40 mm con una jeringuilla de 1 ml. Se midió y anotó el tamaño de las perforaciones y se fotografiaron todos los oídos.

4.6.2 Revisión previa a la miringoplastia

El día 49 (semana 7), se revisaron todos los oídos para evaluar el tamaño y el estado de las perforaciones. Para ello se anestesió a las ratas con 0.4 ml de la mezcla Ketamina – Xilacina.

Aquellos casos en los que se detectó una infección activa con otorrea o bien restos costrosos secos, se procedió a su extracción con un aspirador o con la espátula de Rosen, asegurándose de no tocar directamente la membrana timpánica para no producir sangrado.

Posteriormente, en estos casos, se aplicó una solución antibiótica con 3 gotas de la mezcla gentamicina (5 mg/ml), dexametasona (1mg/ml) y tetrizolina hidrocloreto (0.5 mg/ml) (Colircusí Gentadexa ®).

Además, se midieron las perforaciones timpánicas y se fotografiaron.

En función del tamaño se agruparon en perforaciones pequeñas, medianas y grandes. Aunque en todas ellas se midió un diámetro anteroposterior (AP) y otro craneocaudal (CC), para simplificar la clasificación, se consideró perforación pequeña a aquellas con un diámetro AP igual o menor a 1,5; perforación mediana a aquellas entre 1,5 y 2,5 de AP; y perforación grande si poseía un diámetro AP igual o mayor a 2,5.

Si hablamos de equivalencia respecto a los cuadrantes de la pars tensa, se podría decir que hemos considerado pequeñas a aquellas perforaciones que ocupaban menos de 2 cuadrantes ($< 50\%$ del total de la superficie de la pars tensa), medianas a aquellas entre 2 y 3 cuadrantes (entre 50 y 75% de la superficie de la pars tensa) y grandes a aquellas que ocupaban 3 o más cuadrantes ($\geq 75\%$ de la superficie de la pars tensa).

Dentro de cada grupo (pequeñas, medianas y grandes) se decidió de manera aleatoria simple el protocolo terapéutico (membrana amniótica o control). Para ello, se escribió el número de cada rata y oído en un papel que fue doblado por la mitad. Se mezclaron todos los papeles y se extrajo aleatoriamente un determinado número para decidir aquellos individuos a los que se les colocaría la membrana amniótica.

4.6.3 Miringoplastia

El día 56 (semana 8) se consideró finalizado el proceso de cronificación y se procedió a la realización de la miringoplastia. Se fotografiaron todos los oídos (Anexo 1).

Se anestesió a las ratas con 0.8 ml de la mezcla Ketamina – Xilacina. Se comprobó la presencia de las perforaciones previamente agrupadas en pequeñas y grandes, se volvieron a medir y excluyeron aquellas que estuviesen infectadas o que se hubiesen cerrado espontáneamente.

El protocolo terapéutico fue distinto en cada grupo (A, B, C y D), sin embargo, el primer paso fue común en todos ellos, y consistió en reavivar la perforación timpánica utilizando

el punzón agudo para friccionar el borde de la perforación en toda su circunferencia hasta producir un sangrado, eliminando de este modo el anillo fibroso de la perforación.

Además, en todos los grupos se hizo el mismo proceso para la obtención de la membrana amniótica. En primer lugar, se descongeló la membrana amniótica introduciendo el tubo estéril que la contenía en el baño María a 37°C. Tras descongelarse, pasados 2-3 minutos, se procedió a extraer la membrana amniótica unida al papel de nitrocelulosa y colocarla sobre una placa de Petri estéril. Se hicieron varios enjuagues con PBS (phosphate buffered saline) de la marca Gibco® que se aplicaba sobre la membrana por medio de una jeringa hasta conseguir la eliminación completa del material criopreservador que la impregnaba, pasando de tener un color rosado a ser transparente (Figura 28).

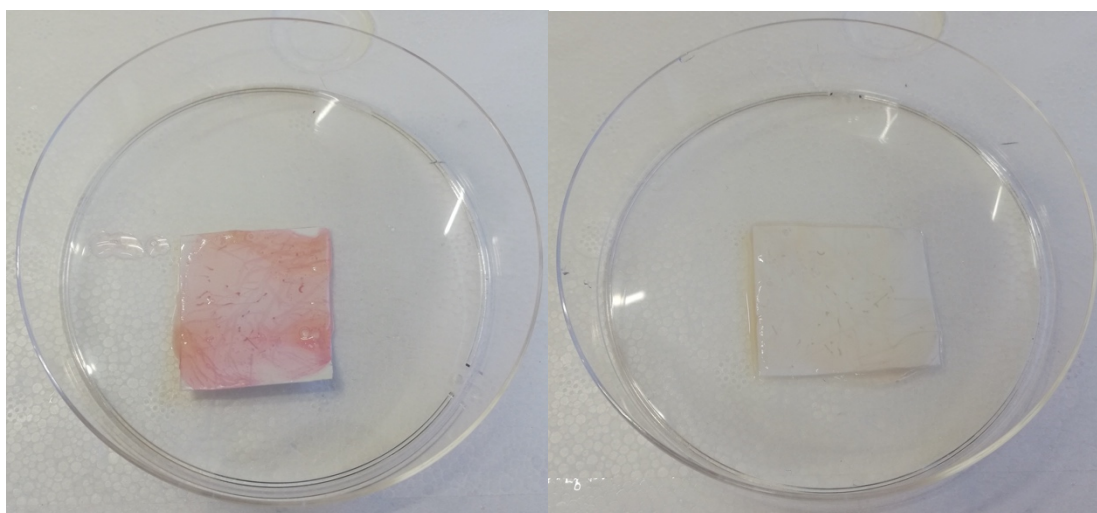


Figura 28: Membrana amniótica sobre papel de nitrocelulosa tras haber sido descongelada. A la izquierda con coloración rosada debido al material crioprotector. A la derecha transparente tras los enjuagues y eliminación del material crioprotector

El **grupo A** partía inicialmente con 8 ratas, lo que supone un total de 16 oídos. Tras excluir aquellos oídos que se cerraron espontáneamente en el proceso de cronificación o bien aquellos que estaban infectados se obtuvo un total de 11 oídos. De estos, 1 oído tenía una perforación pequeña, 4 oídos tenían una perforación mediana y 6 oídos tenían una perforación grande (Tabla 3).

El grupo A1 fue el grupo experimental. A estos oídos, tras reavivar la perforación, se le colocó un fragmento de membrana amniótica que fue previamente recortado con un bisturí hasta obtener un diámetro mayor de entre 3 y 4 unidades Rosen. Dicho fragmento se introdujo a través del espéculo de oído con la ayuda del punzón agudo y de la espátula de Rosen para colocarlo en modo “diábolo” introduciendo una parte en el interior de la caja timpánica a través de la perforación, y otra parte se extendió sobre el resto timpánico cubriendo toda la superficie de la perforación.

El grupo A2 fue el grupo control. A estos oídos únicamente se les realizó la reavivación de los bordes de la perforación con el punzón agudo.

Tabla 3: Grupo A y sus perforaciones agrupadas por tamaño. R: rata. OD: oído derecho. OI: oído izquierdo. AP: antero-posterior. CC: cráneo-caudal. MA: membrana amniótica (Grupo A1). C: control (Grupo A2).

Perforaciones pequeñas ($\leq 1,5$ AP)	Perforaciones medianas (1,5 - 2,5 AP)	Perforaciones grandes ($\geq 2,5$ AP)
- R7 OD (1 x 1): C	- R2 OD (1,75 x 1): MA - R3 OI (2 x 1,75): MA - R3 OD (1,75 x 1): MA - R8 OD (2 x 1,25) MA	- R1 OI (2,5 x 1,5): C - R4 OI (3 x 2): C - R5 OI (2,5 x 1,25): MA - R5 OD (2,5 x 2): MA - R6 OI (3 x 2): C - R8 OI (3,5 x 2): MA

El **grupo B** partía inicialmente con 5 ratas, lo que supone un total de 10 oídos. Tras excluir aquellos oídos que se cerraron espontáneamente en el proceso de cronificación o bien aquellos que estaban infectados se obtuvo un total de 9 oídos. De estos, 1 oído tenía una perforación pequeña, 2 oídos tenían una perforación mediana y 6 oídos tenían una perforación grande (Tabla 4).

El grupo B1 fue el grupo experimental. A estos oídos, tras reavivar la perforación, se le colocó un fragmento de membrana amniótica que fue previamente recortado con un

bisturí hasta obtener un diámetro mayor de entre 3 y 4 unidades Rosen. Dicho fragmento se introdujo a través del espéculo de oído con la ayuda del punzón agudo y de la espátula de Rosen para colocarlo en modo “diábolo” introduciendo una parte en el interior de la caja timpánica a través de la perforación, y otra parte se extendió sobre el resto timpánico cubriendo toda la superficie de la perforación. Posteriormente, se recortaron pequeños fragmentos de cutanplast que se colocaron por encima, contactando con la membrana amniótica y el resto timpánico.

El grupo B2 fue el grupo control. A estos oídos, tras reavivar la perforación, se les colocó fragmentos de cutanplast cubriendo la totalidad de la perforación.

Tabla 4: Grupo B y sus perforaciones agrupadas por tamaño. R: rata. OD: oído derecho. OI: oído izquierdo. AP: antero-posterior. CC: cráneo-caudal. MA: membrana amniótica (Grupo B1). C: control (Grupo B2).

Perforaciones pequeñas ($\leq 1,5$ AP)	Perforaciones medianas ($> 1,5 < 2,5$ AP)	Perforaciones grandes ($\geq 2,5$ AP)
- R9 OI (1,5 x 1): MA	- R9 OD (2 x 1): C - R10 OD (2 x 1,5): MA	- R10 OI (3 x 2): MA - R11 OI (3 x 2): C - R11 OD (3 x 2): C - R12 OI (3 x 2): MA - R13 OI (3 x 2): MA - R13 OD (3 x 2): MA

El **grupo C** partía inicialmente con 7 ratas, lo que supone un total de 14 oídos. Tras excluir aquellos oídos que se cerraron espontáneamente en el proceso de cronificación o bien aquellos que estaban infectados se obtuvo un total de 11 oídos. De estos, 2 oídos tenían una perforación pequeña, 4 oídos tenían una perforación mediana y 5 oídos tenían una perforación grande (Tabla 5).

El grupo C1 fue el grupo experimental. A estos oídos, tras reavivar la perforación, se les llenó la caja timpánica con fragmentos de cutanplast hasta prácticamente contactar con la cara medial timpánica. Para ello se utilizó la espátula de Rosen y el espéculo de oído.

Posteriormente, se recortó la membrana amniótica con el bisturí adecuándola al tamaño calculado de la perforación en unidades Rosen. El fragmento de membrana amniótica se introdujo a modo underlay, quedando posicionada entre el cutanplast de la caja y la cara medial timpánica. Finalmente, se recortaron fragmentos de cutanplast que se posicionaron cubriendo la perforación timpánica, en contacto con la membrana amniótica y la cara lateral timpánica.

El grupo C2 fue el grupo control. A estos oídos, tras reavivar la perforación, se les colocó unos fragmentos de cutanplast rellenando la caja timpánica y otros cubriendo la totalidad de la perforación sobre la cara lateral timpánica.

Tabla 5: Grupo C y sus perforaciones agrupadas por tamaño. R: rata. OD: oído derecho. OI: oído izquierdo. AP: antero-posterior. CC: cráneo-caudal. MA: membrana amniótica (Grupo C1). C: control (Grupo C2).

Perforaciones pequeñas ($\leq 1,5$ AP)	Perforaciones medianas ($> 1,5 < 2,5$ AP)	Perforaciones grandes ($\geq 2,5$ AP)
- R15 OD (0,25 x 0,25): C - R19 OI (1,5 x 1,25): MA	- R16 OD (2 x 1,25): MA - R18 OD (2,25 x 1,5): MA - R19 OD (2 x 1): C - R20 OI (2 x 1,25): MA	- R14 OI (3 x 1,75): MA - R16 OI (3,5 x 1,75): MA - R17 OI (3 x 1,75): C - R18 OI (2,5 x 1,5): C - R20 OD (3 x 1,75): MA

El **grupo D** partía inicialmente con 17 ratas, lo que supone un total de 34 oídos. Tras excluir aquellos oídos que se cerraron espontáneamente en el proceso de cronificación o bien aquellos que estaban infectados se obtuvo un total de 26 oídos. De estos, 9 oídos tenían una perforación pequeña, 6 oídos tenían una perforación mediana y 11 oídos tenían una perforación grande (Tabla 6).

El grupo D1 fue el grupo experimental. A estos oídos, tras reavivar la perforación, se les aplicó la membrana amniótica extendida en modo oeverlay, quedando su cara epitelial

cubriendo la perforación y en contacto parcialmente con el resto timpánico. El tamaño de la MA fue ligeramente superior al de la perforación, fue recortada con bisturí y colocada con ayuda del espéculo de oído, el punzón agudo y la espátula de Rosen. Finalmente, se añadió un fragmento de cutanplast de aproximadamente el mismo tamaño sobre la MA y el resto timpánico.

El grupo D2 fue el grupo control. A estos oídos, tras reavivar la perforación, se les colocó un fragmento de cutanplast cubriendo la totalidad de la perforación y parcialmente el resto timpánico.

Tabla 6: Grupo D y sus perforaciones agrupadas por tamaño. R: rata. OD: oído derecho. OI: oído izquierdo. AP: antero-posterior. CC: cráneo-caudal. MA: membrana amniótica (Grupo D1). C: control (Grupo D2).

Perforaciones pequeñas ($\leq 1,5$ AP)	Perforaciones medianas ($> 1,5 < 2,5$ AP)	Perforaciones grandes ($\geq 2,5$ AP)
- R21 OD (1,25 x 1,25): MA - R24 OI (1 x 1): MA - R25 OI (1 x 0,5): C - R26 OD (1,5 x 1): MA - R27 OI (0,5 x 0,5): MA - R27 OD (0,5 x 0,5): MA - R33 OI (1,5 x 1): C - R33 OD (1,25 x 1): C - R 35 OD (1,25 x 1,25): MA	- R22 OD (2,5 x 1): MA - R28 OD (2,25 x 1,5): MA - R30 OI (1,5 x 1,5): MA - R31 OD (2 x 1,5): C - R35 OI (2 x 1,25): MA - R37 OI (2 x 0,5): C	- R21OI (3 x 2): MA - R22 OI (2,5 x 1,5): C - R23 OI (2,5 x 2): MA - R29 OI (2,5 x 1,5): C - R29 OD (3 x 2): MA - R31 OI (4 x 2): MA - R32 OI (3,5 x 2): C - R32 OD (2,5 x 1,5): C - R34 OI (3 x 1,5): C - R34 OD (2,75 x 1,5): C - R36 OD (2,5 x 1,5): C

4.6.4 Revisiones posteriores

Este apartado vuelve a ser común a todos los grupos. Tras la realización de la miringoplastia, se hicieron revisiones los días 4, 8, 12, 16 y 20 posteriores al proceso, equivalentes a los días 60, 64, 68, 72 y 76 de cada ensayo.

Para ello cada rata fue anestesiada con 0.4 ml de la mezcla Ketamina – Xilacina. En caso de observarse la perforación se midió su diámetro AP y CC con la espátula de Rosen nº5. Por otro lado, en caso de observar alguna costra o material sobre la membrana timpánica se respetó y no se manipuló hasta el último día.

El día 80 (20 tras la miringoplastia) se consideró el último día del ensayo y se procedió a extraer todas las costras o materiales observados y a realizar medidas de las perforaciones. Todos los días se fotografiaron los oídos de las ratas (Anexo 1).

4.6.5 Sacrificio y extracción timpánica

El día 76, una vez fotografiados y anotados los datos de todos los oídos, se procedió al sacrificio de las ratas.

Para ello, mientras estaban anestesiadas con la mezcla de 0.4 ml previamente descrita, se les hacía inhalar una dosis mortal de isoflurano (IsoFlo ®).

Después, se procedió a la extracción de la membrana timpánica de todos los oídos de las ratas, incluyendo aquellos que habían presentado un cierre timpánico espontáneo durante el proceso de cronificación.

Para ello, en primer lugar, se seccionó el pabellón auricular y toda la porción cartilaginosa del CAE hasta llegar al marco óseo. Se extrajo toda la piel del conducto óseo para poder llegar al annulus y acceder por debajo de éste con el punzón agudo de timpanoplastia. Se liberó siguiendo la totalidad de su circunferencia hasta llegar a la pars flácida, momento en el cual se realizó la desarticulación de los huesecillos y se extrajo en bloque el conjunto de annulus, pars tensa y martillo o martillo-yunque (Figuras 29 y 30).

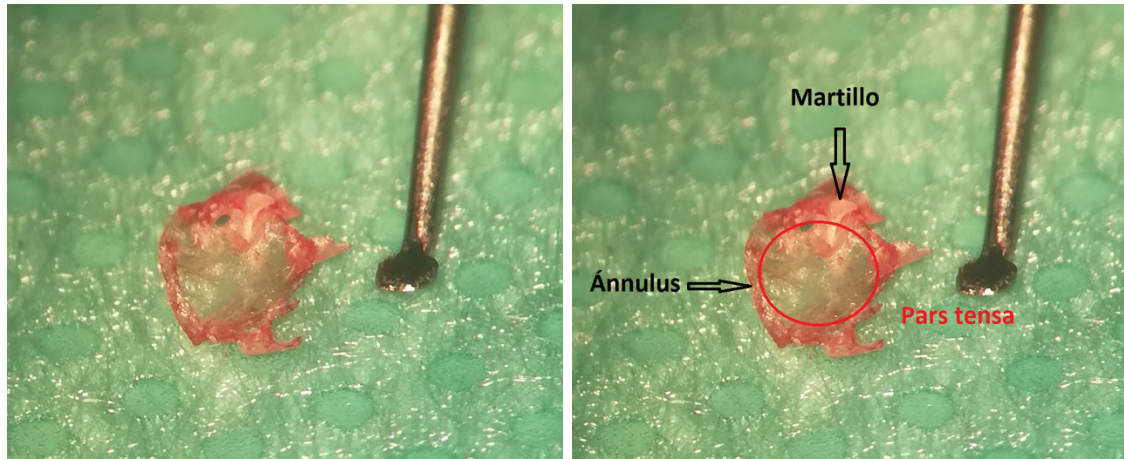


Figura 29: Membrana timpánica de rata extraída respetando la pars tensa (área comprendida en el interior del círculo rojo) y el annulus en su totalidad, así como el martillo parcialmente amputado. Comparación con espátula de Rosen nº5 con un diámetro de 0,8 mm

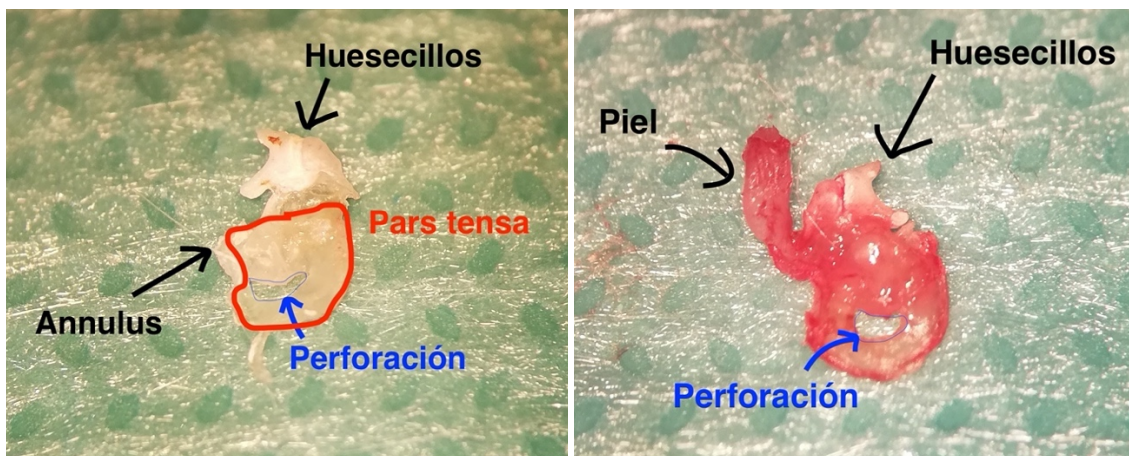


Figura 30: Membranas timpánicas con perforaciones centrales y conservación de huesecillos (martillo y yunque). En la pieza de la derecha se observa, además, un fragmento de piel del CAE

A continuación, se introdujo cada una de las piezas en un tubo de laboratorio Falcon[®] que previamente había sido rellenado con formalina comercial al 4% tamponada (Panreac Química[®]) para su correcta fijación durante un tiempo entre 12 y 24 horas.

4.6.6 Procesamiento en el laboratorio de Anatomía Patológica

Posteriormente, estas muestras se procesaron utilizando un procesador histológico (STP120-3, Thermo Scientific) de la siguiente manera: inclusión en etanol al 50% durante 1 hora, seguido de etanol al 70 % durante 1 hora, seguido de etanol al 96% durante 1 hora y terminando con etanol absoluto en tres pasos de 1 hora. Después, se cambió por un sustituto de xileno en tres pasos de 1 hora. Para finalizar, se incluyó en parafina mediante dos pasos de 1 hora y un tercer paso de 2 horas.

Una vez concluido este procesamiento, cada una de las muestras fue incluida en un bloque de parafina empleando un sistema de inclusión modular (Thermo Histostar). Esto permite una correcta preservación indefinida, además de facilitar el corte de las muestras.

Las muestras fueron seccionadas utilizando un micrótopo de rotación tipo Minot (Thermo HM555, Thermo Scientific) hasta obtener cortes de 3 micrómetros de espesor que se depositaron en un portaobjetos con carga electrostática (SuperFrost Plus Slides, Thermo Scientific), para posteriormente secarlas a 60 °C durante 1 hora, lo cual permite garantizar la adhesión del corte obtenido a la superficie del portaobjetos.

Para finalizar, una vez secados, los portaobjetos se tiñeron utilizando una tinción convencional con hematoxilina eosina. Dicha tinción se caracteriza por tener dos colorantes, por un lado, la hematoxilina, permite teñir de azul aquellas sustancias que tengan carácter ácido (como los núcleos celulares) y, por otro lado, la eosina, permite teñir de color rojo ladrillo a las sustancias que tengan carácter básico (como el citoplasma).

Para lograr esta tinción se llevan a cabo los siguientes pasos:

Se comienza con una inmersión en sustituto de xileno mediante dos pasos de 5 minutos cada uno, se sigue con una inmersión en alcohol absoluto mediante, nuevamente, dos pasos de 5 minutos cada uno. Después, se cambia por una inmersión en etanol al 96% durante 5 minutos y, seguidamente, en etanol al 70% durante 5 minutos más.

Posteriormente se deja en agua corriente durante 5 minutos y se enjuaga con agua destilada. En este momento, se aplica la tinción con hematoxilina acidificada de Harris

(Shandon ®) durante 1 minuto y se vuelve a repetir el lavado en agua corriente durante 5 minutos y el enjuague con agua destilada. Se realiza una inmersión en etanol al 96% durante 1 minuto y se procede a aplicar la tinción con eosina alcohólica (Sahndon ®) durante 30 segundos. Se finaliza realizando nuevamente una inmersión en etanol al 95% mediante dos pasos de 1 minuto, seguido de alcohol absoluto en dos pasos de 5 minutos y terminando con una inmersión en sustituto de xileno mediante dos pasos de 5 minutos cada uno. Tras esto, se hace un montaje en medio permanente (Neo Mount, Merck ®)

Una vez obtenidos los portaobjetos teñidos, se examinaron utilizando un microscopio de campo claro (Zeiss Ax10, Carls Zeiss), equipado con una cámara digital a color de alta resolución (AxioCam 506 Color, Carl Zeiss), usando para ello un software especializado (Zeiss ZEN ver 3.0, Carl Zeiss).

4.7 Estudio estadístico

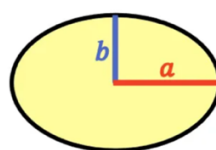
Los datos de cada día del ensayo fueron recogidos y anotados en una tabla de Excel en la que se distinguen un total de 20 variables distintas (Tabla7).

La 1ª columna recoge el número de paciente, entendiendo como tal un único oído de cada rata. Por lo tanto, cada rata suponía un total de 2 pacientes (oído izquierdo y oído derecho). A pesar de ser animales de laboratorio, hemos utilizado el término paciente para simplificar el concepto del conjunto rata-oído derecho y rata-oído izquierdo.

La 2ª especifica el número de la rata, la 3ª la lateralidad del oído, la 4ª la aplicación de antibioterapia previa a la realización de la miringoplastia y de la 5ª a la 10ª se recoge el tamaño de la perforación según el área de la perforación en los días 56, 60, 64, 68, 72 y 76 respectivamente.

Para calcular este área, teniendo en cuenta que una Unidad Rosen equivale a 0,8 mm, realizamos una conversión a milímetros del diámetro mayor y menor para, posteriormente, aplicar la fórmula matemática que permite calcular el área de una elipse (número π x radio mayor (a) x radio menor (b)) (Figura 31):

Área de una Elipse



$$A = \pi \cdot a \cdot b$$

Figura 31: Área de una elipse

La 11ª columna recoge el grupo experimental al que pertenece (membrana amniótica o control), la 12ª el grupo de tratamiento (grupo A, B, C o D), la 13ª el subgrupo de tratamiento (A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2), la 14ª si se produjo cierre o no, la 15ª el tipo de cierre (espontáneo por fracaso de la cronificación, por aplicar membrana amniótica o bien por aplicar el tratamiento del grupo control), la 16ª especifica el día en el que se produjo el cierre, la 17ª si hubo o no infección, la 18ª el día de aparición de la infección, la 19ª si el paciente había sido excluido o no del estudio (coincidiendo con perforaciones cerradas espontáneamente en las que fracasó la cronificación, o bien con presencia de infección el día de realización de la miringoplastia) y la 20ª, en la que se especifica el tipo de perforación que presentaban (pequeña, mediana o grande).

Tabla 7: Registro en la tabla de Excel de los 8 primeros pacientes del estudio

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
PACIENTES	Rata	Oído	ATB previo	Día 56	Día 60	Día 64	Día 68	Día 72	Día 76	Grupo experimental
1	1	1	2	1,88	2,26	2,26	1,88	1,88	2,26	2
2	1	2	2	0	0	0	0	0	0	
3	2	1	2	0	0	0	0	0	0	
4	2	2	2	0,88			0,13		0,25	1
5	3	1	1	1,76				1,88	3,02	1
6	3	2	2	0,88			0		0,88	1
7	4	1	2	3,02		2,26	3,02	3,02	3,02	2
8	4	2	2	0	0	0	0	0	0	

L	M	N	O	P	Q	R	S	T
Grupo tratamiento	Subgrupo tratamiento	Cierre	Tipo cierre	Día del cierre	Infección	Día aparición infección	Excluido	Tamaño perforación
1	2	2			1	76	2	3
		1	1	56	2		1	
		1	1	56	2		1	
1	1	2			2		2	2
1	1	2			2		2	2
1	1	2			2		2	2
1	2	2			1	60	2	3
		1	1	56	2		1	

Una vez completada la tabla, analizamos sus datos mediante el programa para análisis estadístico SPSS versión 25, obteniendo los resultados que mostramos a continuación.

5. RESULTADOS

5.1 Estudio descriptivo

En primer lugar, hemos realizado un análisis descriptivo de las principales variables del estudio y hemos calculado la normalidad de las variables cuantitativas mediante la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov, cuando teníamos un número de datos mayor de 50, y el Shapiro-Wilk cuando era menor de 50.

Cabe destacar que, de los 74 pacientes que comenzaron el estudio, solamente 57 fueron incluidos en el ensayo (77,03%), ya que 17 fueron excluidos tras aplicar los criterios de exclusión (16 por haber presentado un cierre espontáneo de la perforación y 1 por haber presentado otorrea activa en el día 56) (Figura 32).

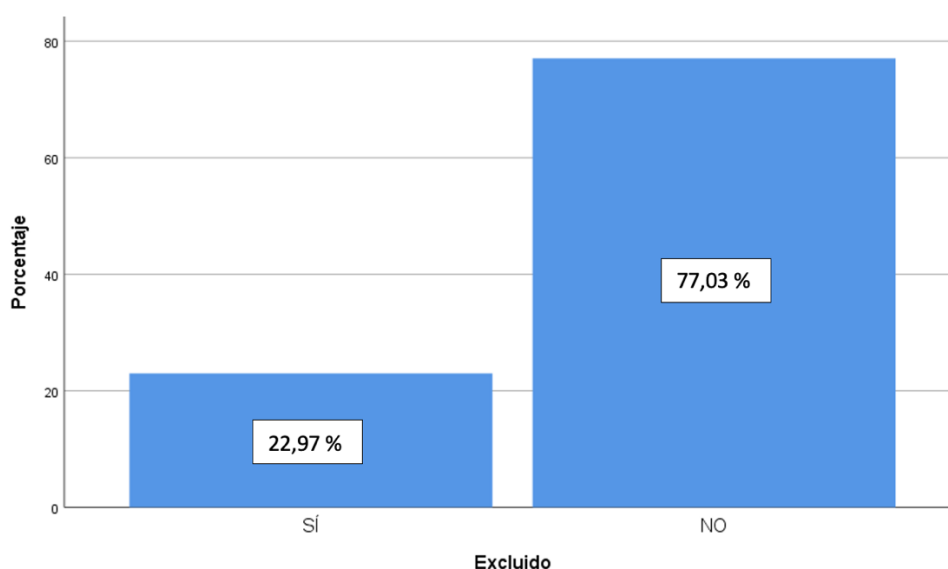


Figura 32: Porcentaje de pacientes excluidos del estudio.

Dicho esto, en un primer análisis, vemos que se ha producido el **cierre de la perforación** en el 31,08 % de los pacientes, compuesto por 23 pacientes de los 74 totales de la muestra inicial (Figura 33). Sin embargo, si desglosamos este resultado, vemos que 16 son cierres espontáneos que estaban presentes el día 56 (69,57%), 5 son cierres producidos en el grupo experimental con membrana amniótica (21,7%) y 2 son cierres en el grupo control (8,7%) (Figura 34).

RESULTADOS

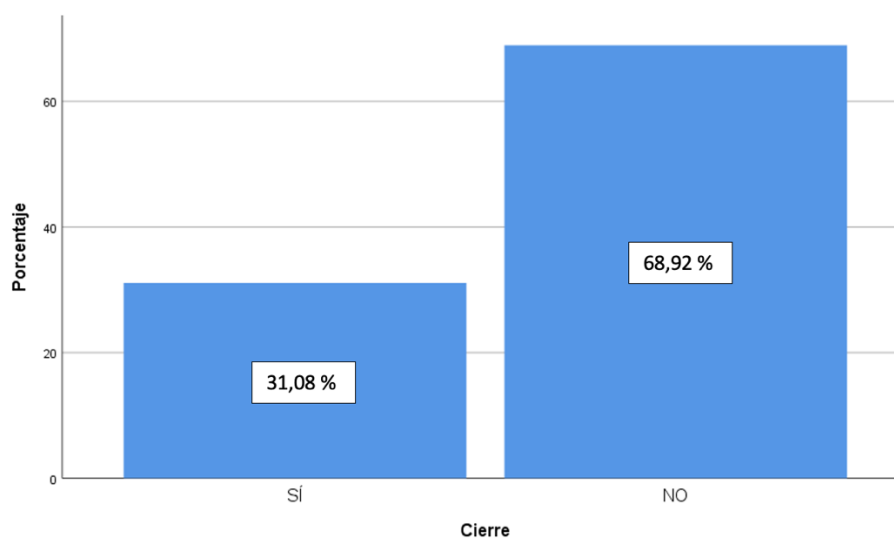


Figura 33: Porcentaje de cierre de las perforaciones en los 74 pacientes iniciales.

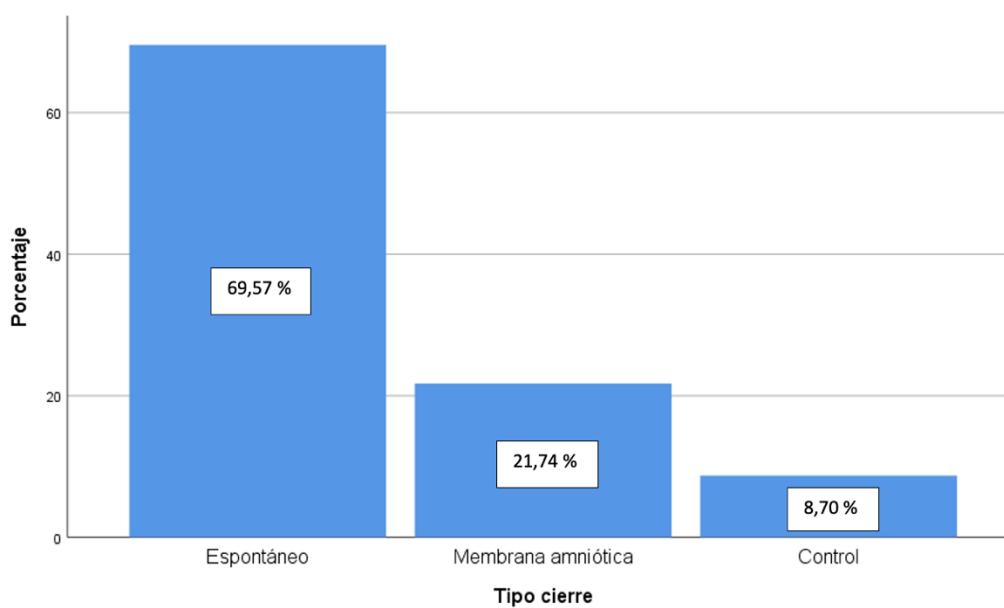


Figura 34: Tipos de cierre dentro de los ocurridos en los 74 pacientes iniciales

Tras ver estos datos, podríamos decir que se produjo un **fracaso del proceso de cronificación** de la perforación timpánica en el 21,62% de los pacientes (16 de 74).

RESULTADOS

Si nos limitamos a analizar los 57 pacientes incluidos en el ensayo, observamos como tan solo se produjo el **cierre de la perforación** en 7 pacientes, lo que supone un 12,28% del total (Figura 35).

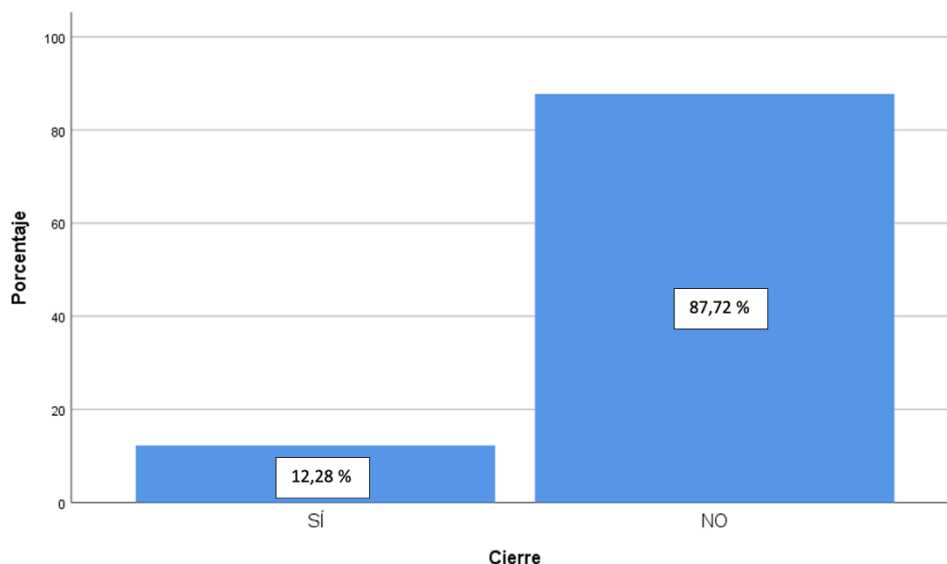


Figura 35: Porcentaje de cierre de las perforaciones en los 57 pacientes que participaron en el ensayo

El **día medio en el que tuvo lugar el cierre** de la perforación fue el día 69,71 (IC 95% 65 - 74,42) con una desviación estándar de 5,08 (Figura 36). Puesto que solo tenemos 7 pacientes para analizar, el test estadístico que se aplicó fue el de Shapiro-Wilk, con un resultado no significativo (p 0,215), lo cual permite decir que tiene una distribución normal.

RESULTADOS

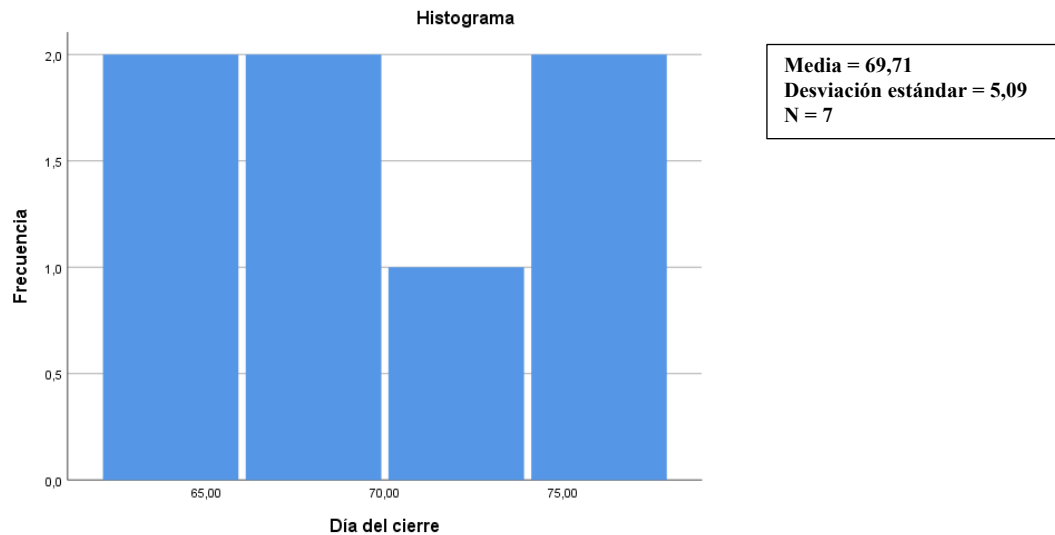


Figura 36: Frecuencia y media de los días de cierre de las perforaciones

A continuación, hemos analizado el **tamaño medio del área de las perforaciones**, medida en mm^2 , obteniendo los siguientes resultados:

El día 56, la media fue de $1,8 \text{ mm}^2$ (IC 95% 1,52-2,07) con una desviación estándar de 1,038 (Figura 37). Este día dispusimos de un tamaño muestral de 57, por lo que el test estadístico que aplicamos fue el de Kolmogorov-Smirnov, obteniendo un valor no significativo ($p 0,094$), lo cual implica que esta variable cuantitativa tiene una distribución normal.

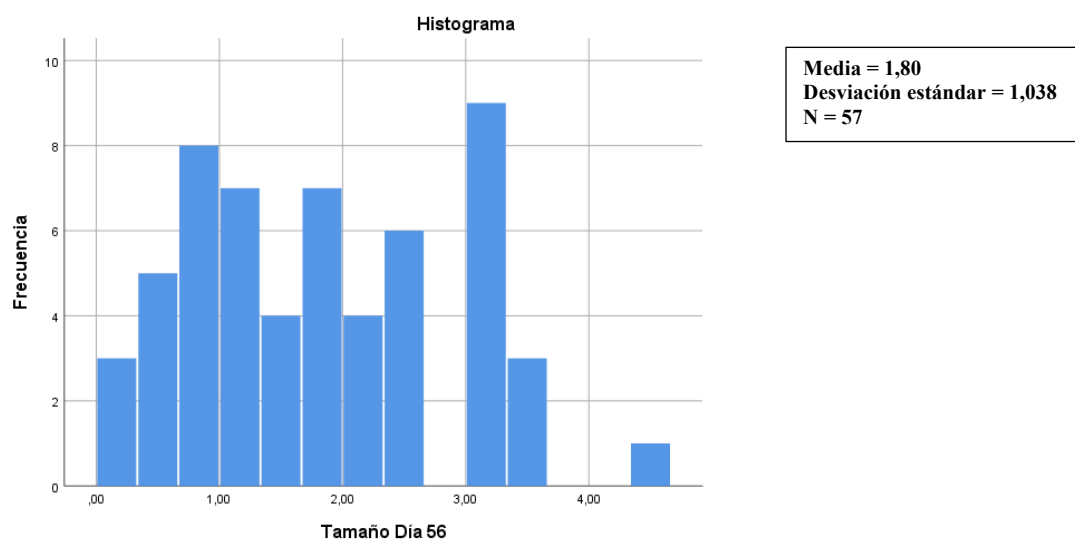


Figura 37: Tamaño en mm^2 de las perforaciones timpánicas el día 56

El resto de días, el tamaño muestral fue inferior a 50. Esto es así debido a que muchas de las perforaciones tenían costras o algún material que las cubría total o parcialmente, de modo que no se podía medir la perforación. En estos casos, hemos utilizado la prueba de Shapiro-Wilk para valorar la significación estadística y, con ello, la normalidad de la distribución.

El día 60, el tamaño medio de la perforación fue de 1,96 mm² (IC 95% 1,62-2,30) con una desviación estándar de 0,984 (Figura 38) y con una p no significativa (p 0,068), lo cual permite aceptar la hipótesis de que la variable tiene una distribución normal.

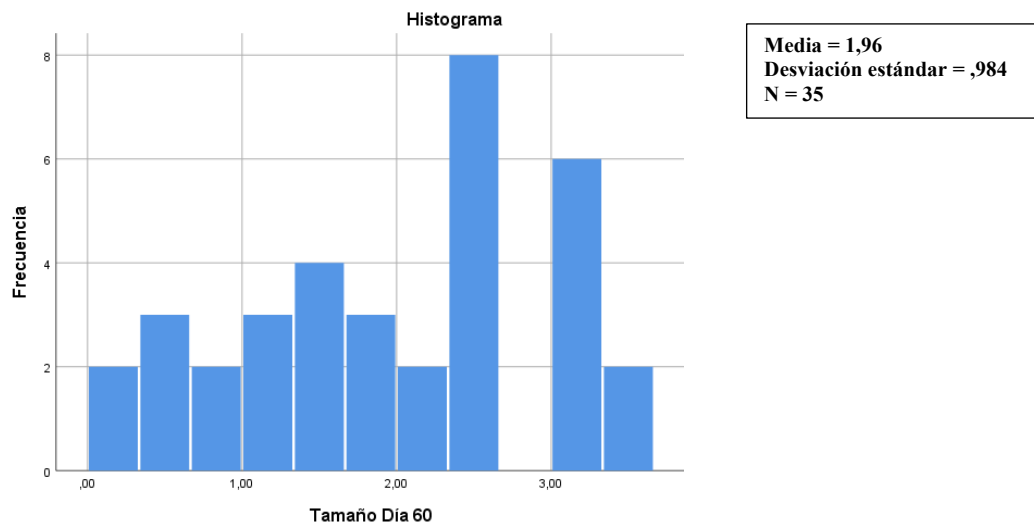


Figura 38: Tamaño en mm² de las perforaciones timpánicas el día 60.

El día 64, el tamaño medio de la perforación fue de 1,89 mm² (IC 95% 1,55-2,22) con una desviación estándar de 1,054 (Figura 39) y una p significativa (p 0,045), lo cual permite aceptar la hipótesis de que la variable no tiene una distribución normal.

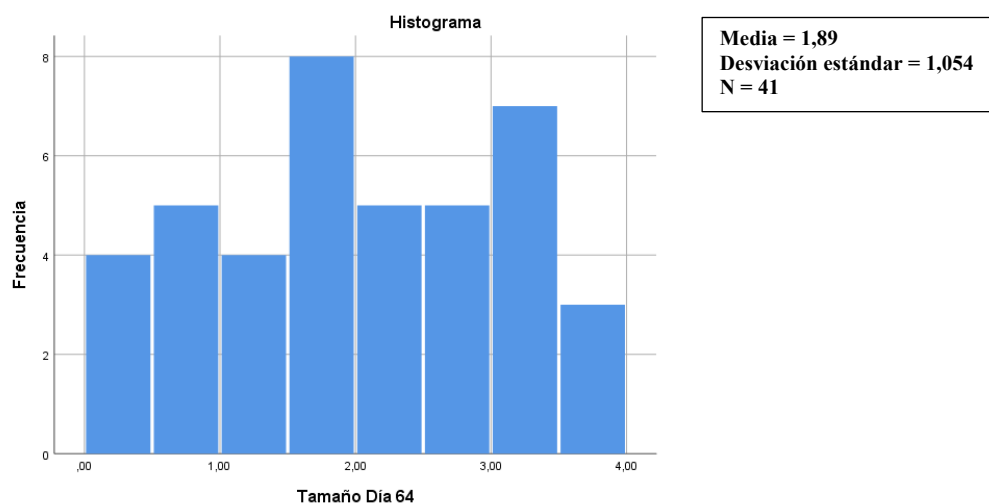


Figura 39: Tamaño en mm² de las perforaciones timpánicas el día 64

El día 68, el tamaño medio de las perforaciones fue de 1,70 mm² (IC 95% 1,38-2,01) con una desviación estándar de 1,074 (Figura 40) y una p significativa (p 0,028), lo cual permite decir que no tiene una distribución normal.

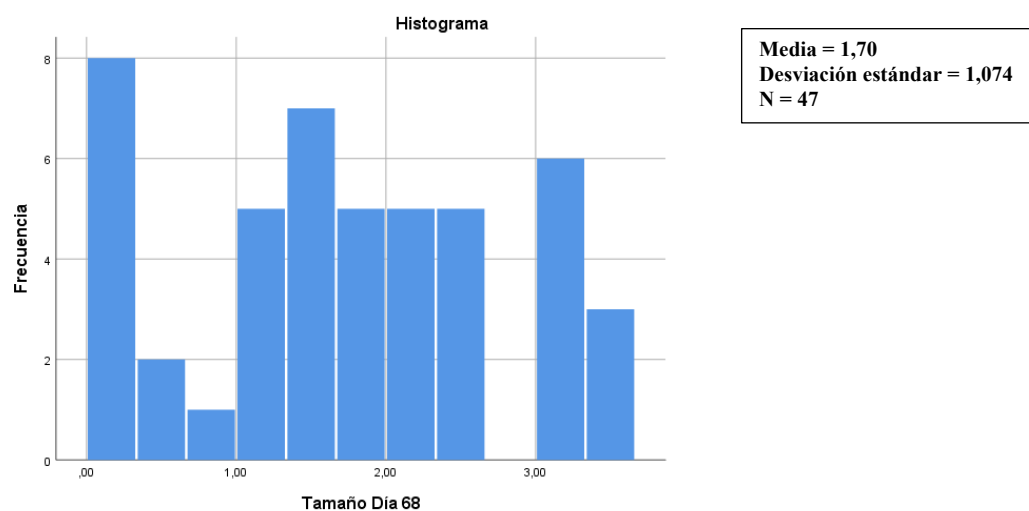


Figura 40: Tamaño en mm² de las perforaciones timpánicas el día 68

El día 72, el tamaño medio de las perforaciones fue de 1,8 mm² (IC 95% 1,50-2,10) con una desviación estándar de 1,008 (Figura 41) y una p significativa (p 0,034), lo cual permite decir que no tiene una distribución normal.

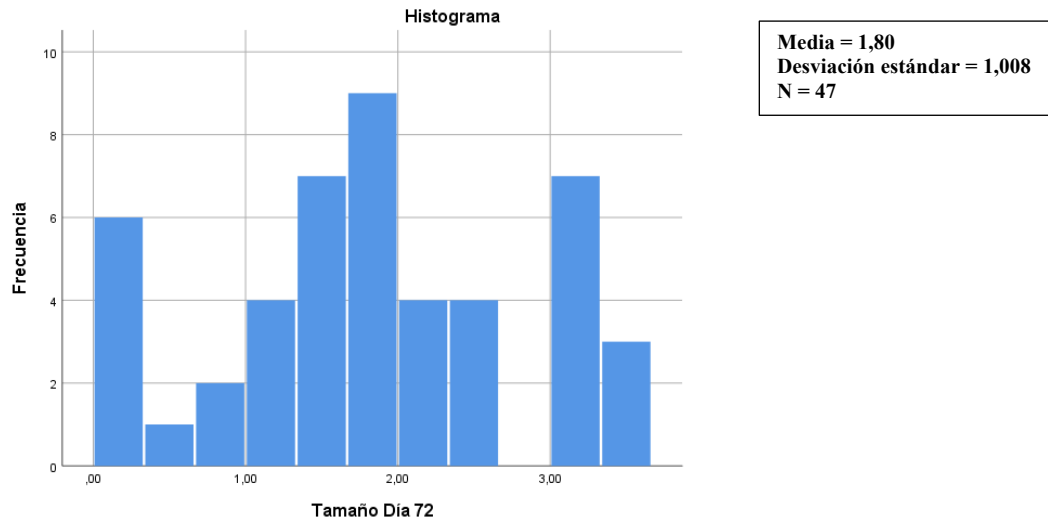


Figura 41: Tamaño en mm² de las perforaciones timpánicas el día 72

Por último, el día 76, el tamaño medio de las perforaciones fue de 1,8 mm² (IC 95% 1,49-2,10) con una desviación estándar de 1,146 (Figura 42). Esta vez, al tratarse del último día del estudio, se eliminaron todas las costras o materiales que impidiesen la correcta visualización de la perforación y se pudieron medir los 57 oídos que participaron en el estudio, por lo que nuevamente se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov que resultó significativo con una p 0,024, lo cual permite decir que no tiene una distribución normal.

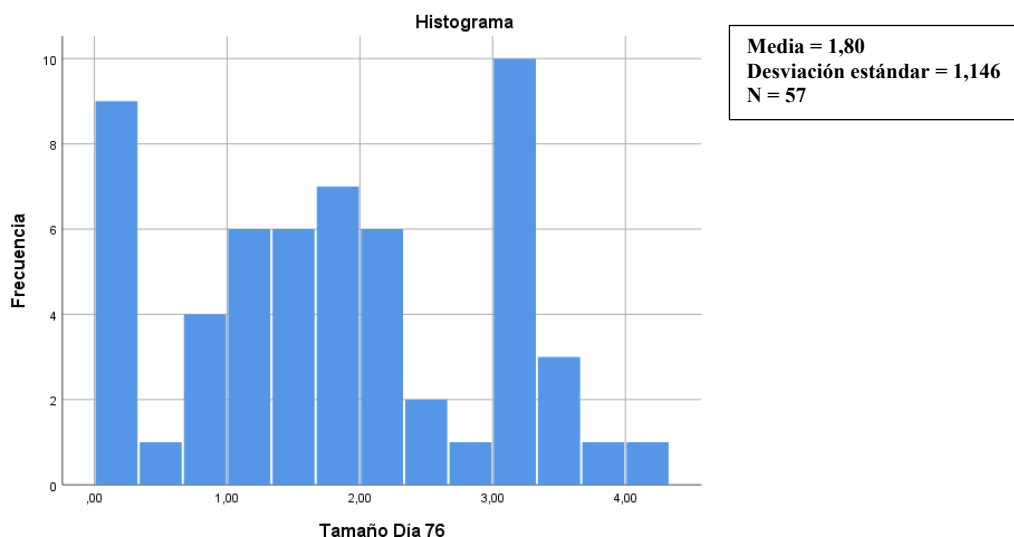


Figura 42: Tamaño en mm² de las perforaciones timpánicas el día 76

Vemos como la media del tamaño de la perforación coincide en el primer día y en los últimos. Esto se podría explicar por los escasos cierres de las perforaciones que se han logrado (se detallará más adelante) y por el aumento de tamaño que se produce tras reavivar la perforación el día 56, de ahí que la media del día 60 y 64 sea mayor.

Tras aplicar la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la de Shapiro-Wilk, vemos que, excepto los del día 56 y el 60, el resto de días tienen una $p < 0,05$, por lo que se puede decir que la mayoría no tiene una distribución normal.

Para simplificar el tamaño de las perforaciones, agrupamos a los 57 pacientes en tres categorías según si considerábamos el **tamaño de la perforación como pequeño, mediano o grande**. Tras analizar estos datos, podemos ver que hay una minoría de 13 perforaciones pequeñas (22,81%), 16 perforaciones medianas (28,07%) y una mayoría de perforaciones grandes en 28 pacientes (49,12%) (Figura 43).

RESULTADOS

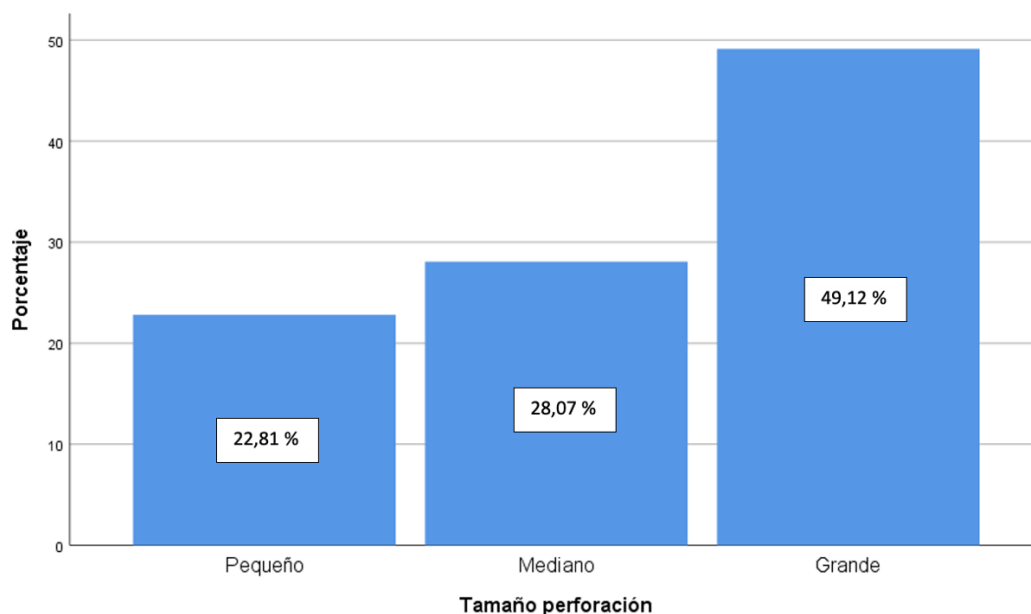


Figura 43: Porcentaje de perforaciones según el tamaño de la perforación

A continuación, procedemos a analizar los **grupos experimentales** y el tratamiento aplicado en los 57 pacientes anteriores. Así, 34 pacientes pertenecieron al grupo experimental con membrana amniótica (59,65%) y 23 al grupo control (40,35%) (Figura 44).

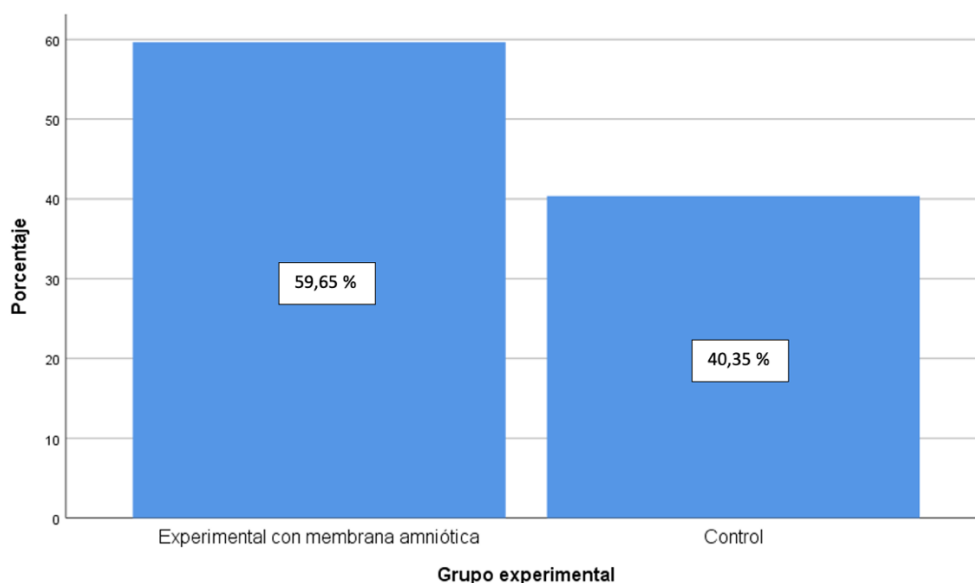


Figura 44: Porcentaje de distribución según la pertenencia al grupo experimental o control

RESULTADOS

Si dividimos en función del **grupo de tratamiento**, tenemos un total de 11 pacientes (19,3%) pertenecientes al grupo A, 9 pacientes (15,79%) en el grupo B, 11 pacientes (19,3%) en el grupo C y 26 pacientes (45,61%) en el grupo D (Figura 45).

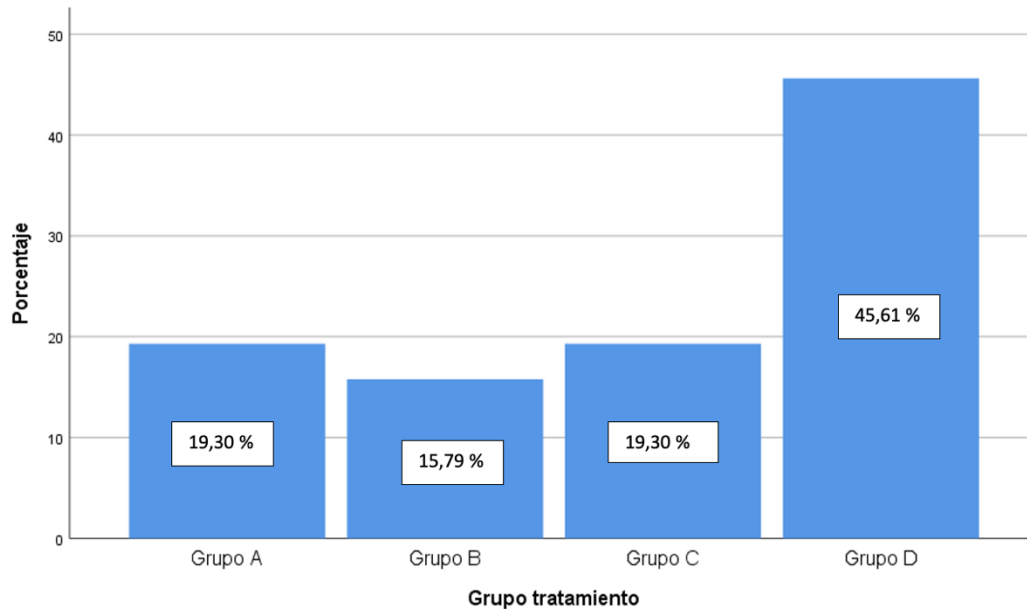


Figura 45: Porcentajes de la distribución del grupo de tratamiento asignado

Dentro de cada uno de estos grupos, existía un subgrupo experimental y otro control. De este modo, en el grupo A hubo 7 pacientes pertenecientes al grupo experimental (subgrupo A1) y 4 en el grupo control (A2); dentro del grupo B hubo 6 pacientes en el grupo experimental (B1) y 3 en el grupo control (B2); dentro del grupo C hubo 7 en el grupo experimental (C1) y 4 en el control (C2); y dentro del grupo D hubo 14 pacientes pertenecientes al grupo experimental (D1) y 12 al grupo control (D2). Estos datos se corresponden con los porcentajes que se muestran en la siguiente gráfica (Figura 46):

RESULTADOS

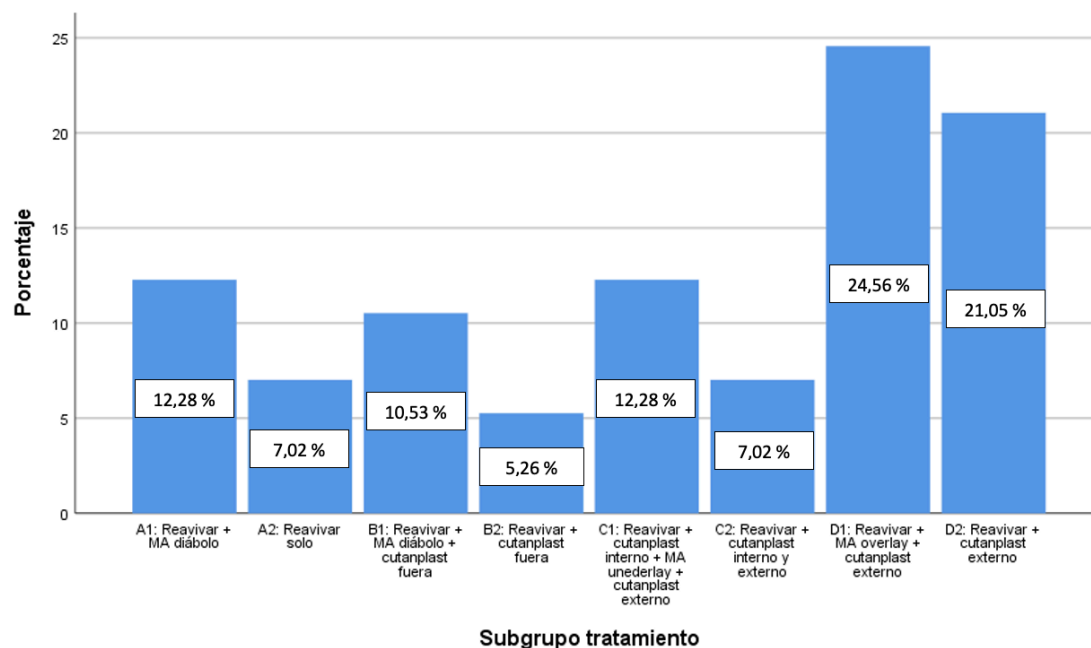


Figura 46: Porcentajes de la distribución del subgrupo de tratamiento asignado

En cuanto a la **aparición de infección**, de los 57 pacientes hubo un total de 11 oídos infectados (19,3%) (Figura 47). Si tenemos en cuenta el total de 74 pacientes iniciales, hubo 1 más que fue excluido por la presencia de otorrea el día 56.

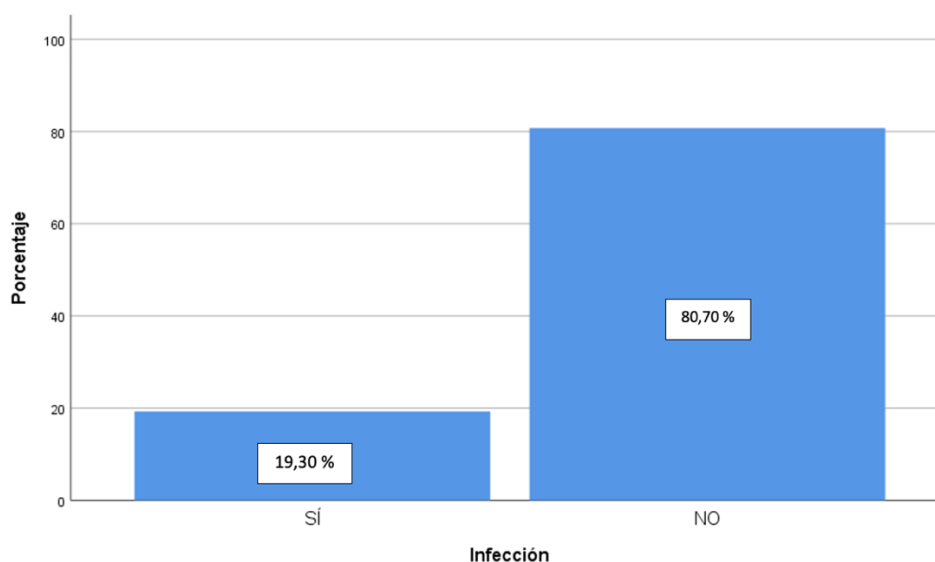


Figura 47: Porcentaje de oídos infectados en el ensayo

RESULTADOS

El **día medio de la aparición de la infección** fue el día 66,18 (IC 95% 61,78 – 70,57) con una desviación estándar de 6,539 (Figura 48). Tras aplicar el test estadístico de Shapiro-Wilk obtenemos un valor significativo ($p = 0,002$) que nos permite decir que no tiene una distribución normal.

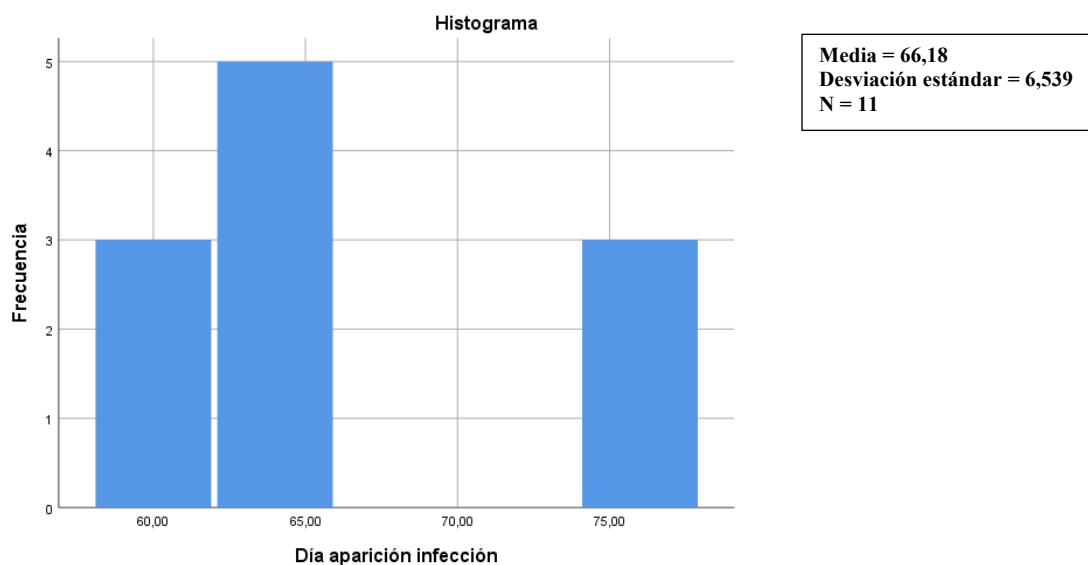


Figura 48: Frecuencia y media del día de aparición de la infección

Por último, a 17 pacientes se les aplicó **tratamiento con antibiótico** la semana de antes de la realización de la miringoplastia, lo que supone un 29,8% de los 57 pacientes (Figura 49).

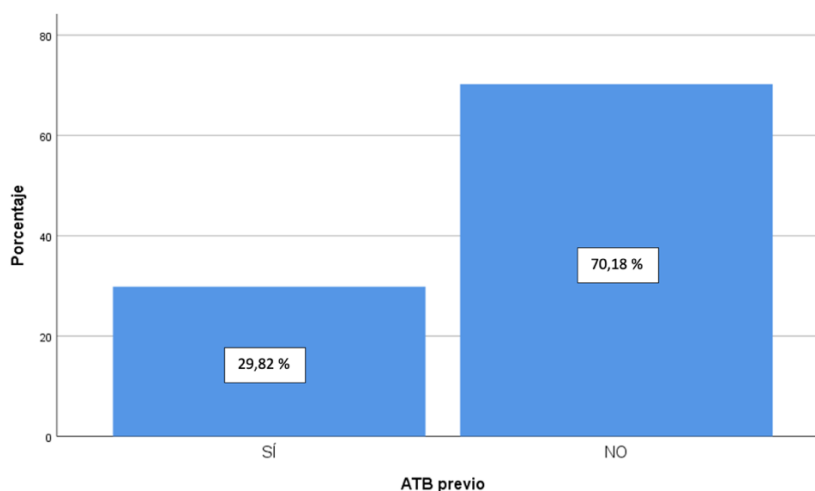


Figura 49: Porcentaje de aplicación de tratamiento antibiótico previo.

5.2 Relación entre el cierre de las perforaciones y el tipo de tratamiento recibido

A continuación, hemos relacionado nuestras principales variables para saber si hay una dependencia entre ellas. Ya vimos en el apartado anterior que nuestras variables cuantitativas no tienen una distribución normal en su mayoría. Además, independientemente de esto, el pequeño tamaño muestral de los distintos grupos, nos lleva a usar test no paramétricos para su estudio. De este modo, cuando una variable cuantitativa se relacionaba con una categórica que tenía 2 grupos, hemos utilizado el test *U de Mann-Whitney*, y si eran 3 o más grupos, la prueba de *Kruskal Wallis*. Cuando hemos querido ver la independencia entre dos variables cualitativas hemos aplicado el test chi-cuadrado.

Según los resultados, se considerará significativo cuando se obtenga una $p < 0,05$, lo cual implicará que se puede aceptar la hipótesis de dependencia entre las variables. Por el contrario, si sale no significativo ($p > 0,05$), con un nivel de confianza del 95% podemos aceptar la hipótesis de independencia entre las variables.

Respecto a esto, tenemos que aclarar que el test chi cuadrado, independientemente de si obtiene un valor significativo ($p < 0,05$), no se considera válido cuando no se cumple el supuesto en el cual no debe haber más de un 25% de las casillas de la tabla cruzada con frecuencia inferior o igual a 5. En nuestro estudio, debido al pequeño tamaño muestral, hemos tenido numerosos test que no podemos considerar válidos, como veremos a continuación.

La principal pregunta de nuestro estudio es **saber si se logran más cierres de perforaciones timpánicas tras aplicar el tratamiento con membrana amniótica frente al control**. El resultado fue que en el grupo de membrana amniótica se cerraron 5 perforaciones de 34 (14,7%), mientras que en el grupo control solo se cerraron 2 perforaciones de 23 (8,7%) (Tabla 8), (Figura 50). Sin embargo, a pesar de que el porcentaje de cierre sea mayor en el grupo de la membrana amniótica, no hay diferencias estadísticamente significativas ($p 0,498$) con el test Chi-Cuadrado. Tampoco las hay al corregir con el test de Fisher ($p 0,689$).

RESULTADOS

Tabla 8: Tabla cruzada: grupo experimental – cierre de la perforación

			Cierre		Total
			SÍ	NO	
Grupo experimental	Experimental con membrana amniótica	Recuento	5	29	34
		% dentro de Grupo experimental	14,7%	85,3%	100,0%
		% dentro de Cierre	71,4%	58,0%	59,6%
	Control	Recuento	2	21	23
		% dentro de Grupo experimental	8,7%	91,3%	100,0%
		% dentro de Cierre	28,6%	42,0%	40,4%
Total	Recuento	7	50	57	
	% dentro de Grupo experimental	12,3%	87,7%	100,0%	
	% dentro de Cierre	100,0%	100,0%	100,0%	

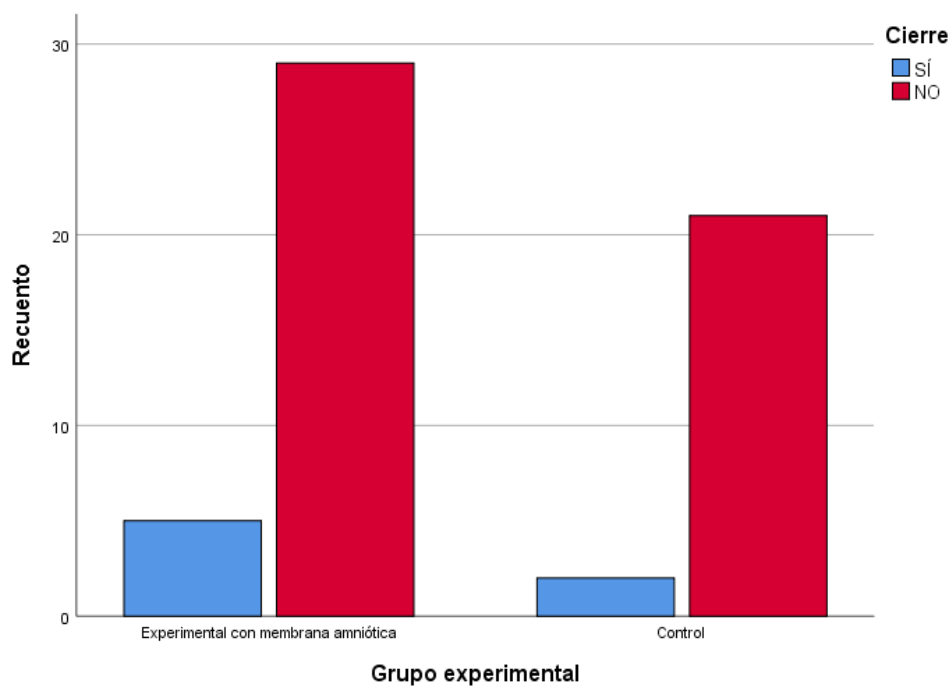


Figura 50: Número de perforaciones cerradas en el grupo de membrana amniótica y en el control

RESULTADOS

Si analizamos los **cierres producidos según el grupo de tratamiento al que pertenecían**, observamos lo siguiente: no se produjo ningún cierre en el grupo A (que incluía MA en diábolo sin cutanplast y su control), se produjo 1 cierre en el grupo B (11,1%) (que incluía MA en diábolo + cutanplast externo y su control), se produjeron 2 cierres en el grupo C (18,2%) (que incluía MA underlay + cutanplast externo e interno y su control) y se produjeron 4 cierres en el grupo D (15,4%) (que incluía MA overlay + cutanplast externo y su control) (Figura 51).

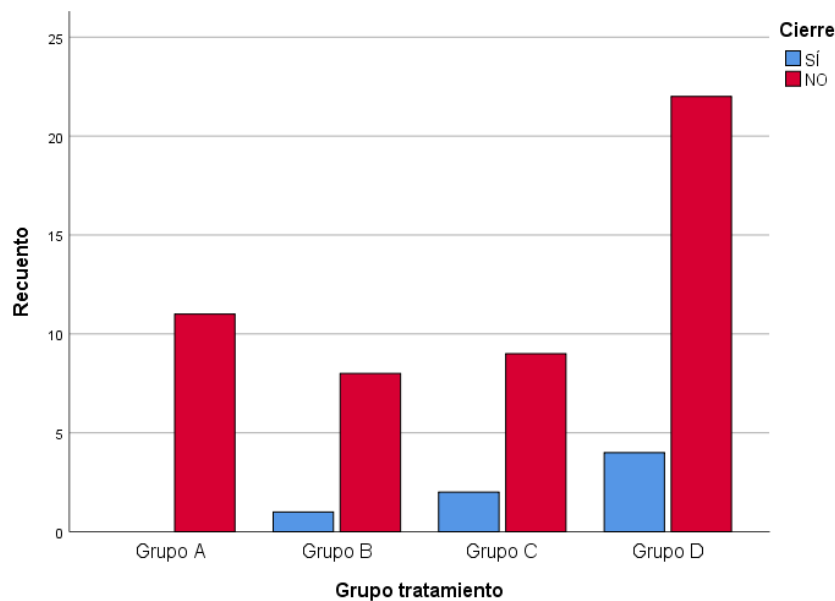


Figura 51: Número de perforaciones cerradas en cada grupo de tratamiento

Dicho de otra forma, de los 7 cierres que se produjeron en total, el 57,1% tuvo lugar en el grupo D, el 28,6% en el grupo C, y el 14,3% en el grupo B (Tabla 9). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,544$) según el Chi-cuadrado. Recaltar que en nuestro caso no es válido el test por el pequeño tamaño muestral.

RESULTADOS

Tabla 9: Tabla cruzada: grupo tratamiento – cierre de la perforación

			Cierre		Total
			SÍ	NO	
Grupo tratamiento	Grupo A	Recuento	0	11	11
		% dentro de Grupo tratamiento	0,0%	100,0%	100,0%
		% dentro de Cierre	0,0%	22,0%	19,3%
	Grupo B	Recuento	1	8	9
		% dentro de Grupo tratamiento	11,1%	88,9%	100,0%
		% dentro de Cierre	14,3%	16,0%	15,8%
	Grupo C	Recuento	2	9	11
		% dentro de Grupo tratamiento	18,2%	81,8%	100,0%
		% dentro de Cierre	28,6%	18,0%	19,3%
	Grupo D	Recuento	4	22	26
		% dentro de Grupo tratamiento	15,4%	84,6%	100,0%
		% dentro de Cierre	57,1%	44,0%	45,6%
Total	Recuento	7	50	57	
	% dentro de Grupo tratamiento	12,3%	87,7%	100,0%	
	% dentro de Cierre	100,0%	100,0%	100,0%	

Si tenemos en cuenta solamente **los grupos en los que hubo cierre de perforaciones (B, C y D) y los correlacionamos con el tipo de cierre (con membrana amniótica o grupo control)**, podemos observar que, en el grupo B, el 100% se cerró con membrana amniótica, en el grupo C, el 50% fue con membrana amniótica y el otro 50% del grupo control, y en el grupo D, el 75% se cerró con membrana amniótica mientras que un 25% con el tratamiento del grupo control (Figura 52) (Tabla 10). Aunque observamos que predomina el cierre con membrana amniótica, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,646$) según el test de Chi-cuadrado. Tampoco es válido en este caso.

RESULTADOS

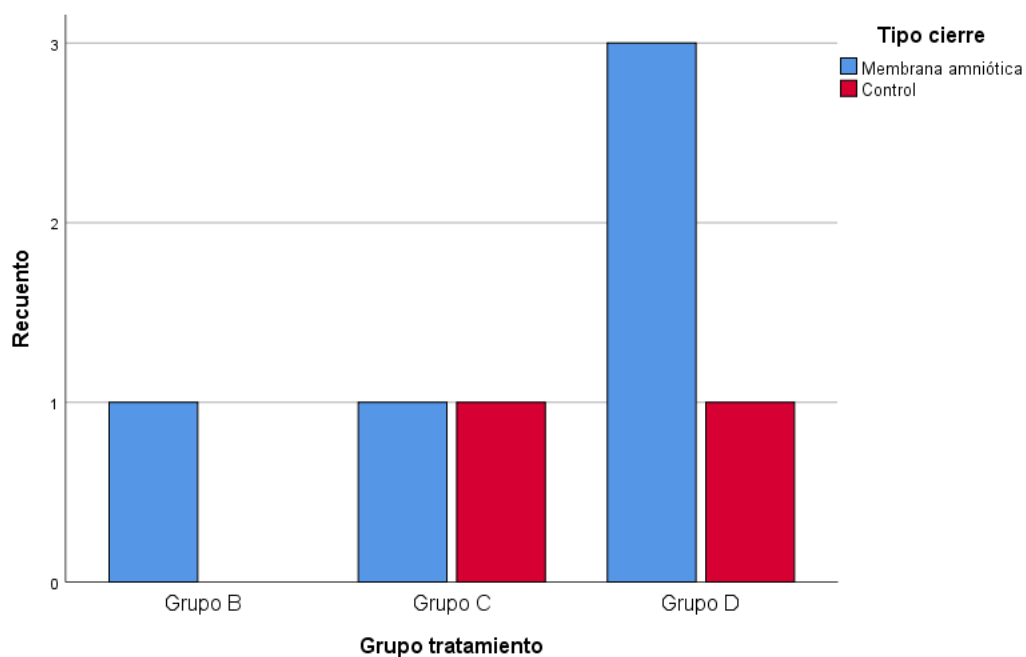


Figura 52: Tipo de cierre según el grupo de tratamiento

Tabla 10: Tabla cruzada: grupo tratamiento – tipo de cierre

			Tipo cierre		Total
			Membrana amniótica	Control	
Grupo tratamiento	Grupo B	Recuento	1	0	1
		% dentro de Grupo tratamiento	100,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de Tipo cierre	20,0%	0,0%	14,3%
	Grupo C	Recuento	1	1	2
		% dentro de Grupo tratamiento	50,0%	50,0%	100,0%
		% dentro de Tipo cierre	20,0%	50,0%	28,6%
	Grupo D	Recuento	3	1	4
		% dentro de Grupo tratamiento	75,0%	25,0%	100,0%
		% dentro de Tipo cierre	60,0%	50,0%	57,1%
Total	Recuento	5	2	7	
	% dentro de Grupo tratamiento	71,4%	28,6%	100,0%	
	% dentro de Tipo cierre	100,0%	100,0%	100,0%	

Por último, analizamos los **cierres que tuvieron lugar en función del subgrupo de tratamiento** al que pertenecieron y vemos que, el subgrupo que mayor número de cierres tuvo fue el D1 (reavivar + MA overlay + cutanplast externo), con un total de 3 cierres, lo que supone el 42,9% del total de cierres (Figura 53).

Los otros 4 subgrupos en los que se logró el cierre de la perforación, con igual representación en todos ellos de 1 único cierre (14,3%), fueron el D2 (reavivar + cutanplast externo), C1 y C2 (reavivar + cutanplast interno + MA underlay + cutanplast externo y el control sin MA), y el B1 (reavivar + MA diábolo + cutanplast externo) (Tabla 11).

A pesar de los resultados, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,785$) con el test Chi-cuadrado. Debido al tamaño muestral tampoco es válido.

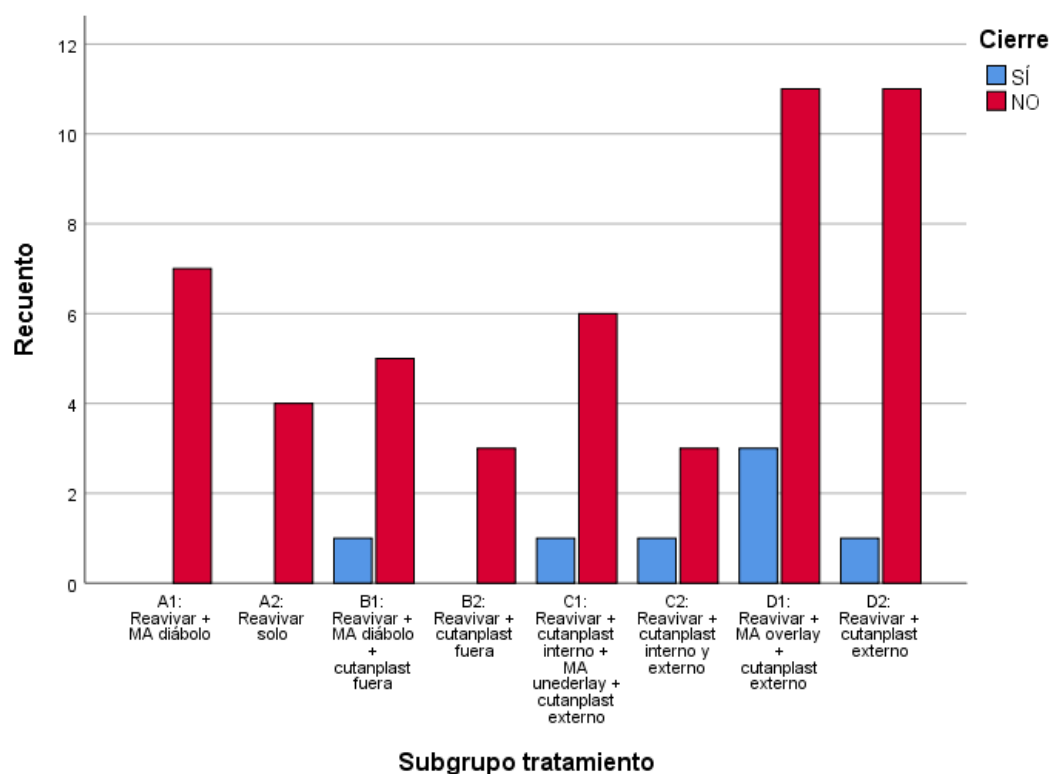


Figura 53: Tipo de cierre según el grupo de tratamiento

RESULTADOS

Tabla 11: Tabla cruzada: subgrupo de tratamiento – tipo de cierre

			Cierre		Total
			SÍ	NO	
Subgrupo tratamiento	A1: Reavivar + MA diábolo	Recuento	0	7	7
		% dentro de Subgrupo tratamiento	0,0%	100,0%	100,0%
		% dentro de Cierre	0,0%	14,0%	12,3%
	A2: Reavivar solo	Recuento	0	4	4
		% dentro de Subgrupo tratamiento	0,0%	100,0%	100,0%
		% dentro de Cierre	0,0%	8,0%	7,0%
	B1: Reavivar + MA diábolo + cutanplast externo	Recuento	1	5	6
		% dentro de Subgrupo tratamiento	16,7%	83,3%	100,0%
		% dentro de Cierre	14,3%	10,0%	10,5%
	B2: Reavivar + cutanplast externo	Recuento	0	3	3
		% dentro de Subgrupo tratamiento	0,0%	100,0%	100,0%
		% dentro de Cierre	0,0%	6,0%	5,3%
	C1: Reavivar + cutanplast interno + MA unederlay + cutanplast externo	Recuento	1	6	7
		% dentro de Subgrupo tratamiento	14,3%	85,7%	100,0%
		% dentro de Cierre	14,3%	12,0%	12,3%
	C2: Reavivar + cutanplast interno y externo	Recuento	1	3	4
		% dentro de Subgrupo tratamiento	25,0%	75,0%	100,0%
		% dentro de Cierre	14,3%	6,0%	7,0%
	D1: Reavivar + MA overlay + cutanplast externo	Recuento	3	11	14
		% dentro de Subgrupo tratamiento	21,4%	78,6%	100,0%
		% dentro de Cierre	42,9%	22,0%	24,6%
	D2: Reavivar + cutanplast externo	Recuento	1	11	12
		% dentro de Subgrupo tratamiento	8,3%	91,7%	100,0%
		% dentro de Cierre	14,3%	22,0%	21,1%
Total		Recuento	7	50	57
		% dentro de Subgrupo tratamiento	12,3%	87,7%	100,0%
		% dentro de Cierre	100,0%	100,0%	100,0%

5.3 Relación entre el tamaño de las perforaciones con otras variables

En este apartado pretendemos ver, en primer lugar, **si el tamaño de la perforación influye en el cierre de la misma.** En la primera tabla que se muestra a continuación (Tabla 12), podemos ver que de las 7 perforaciones que se cerraron, 6 de ellas eran de tamaño pequeño (85,7%) y 1 era de tamaño mediano (14,3%), no habiéndose producido el cierre de ninguna de las perforaciones grandes (Figura 54).

Esta vez sí hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,000$) con el Chi-cuadrado, a pesar de que no puede ser considerado válido este test.

Tabla 12: Tabla cruzada: subgrupo de tratamiento – tipo de cierre

			Tamaño perforación			Total
			Pequeño	Mediano	Grande	
Cierre	SÍ	Recuento	6	1	0	7
		% dentro de Cierre	85,7%	14,3%	0,0%	100,0%
		% dentro de Tamaño perforación	46,2%	6,3%	0,0%	12,3%
	NO	Recuento	7	15	28	50
		% dentro de Cierre	14,0%	30,0%	56,0%	100,0%
		% dentro de Tamaño perforación	53,8%	93,8%	100,0%	87,7%
Total	Recuento		13	16	28	57
	% dentro de Cierre		22,8%	28,1%	49,1%	100,0%
	% dentro de Tamaño perforación		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

RESULTADOS

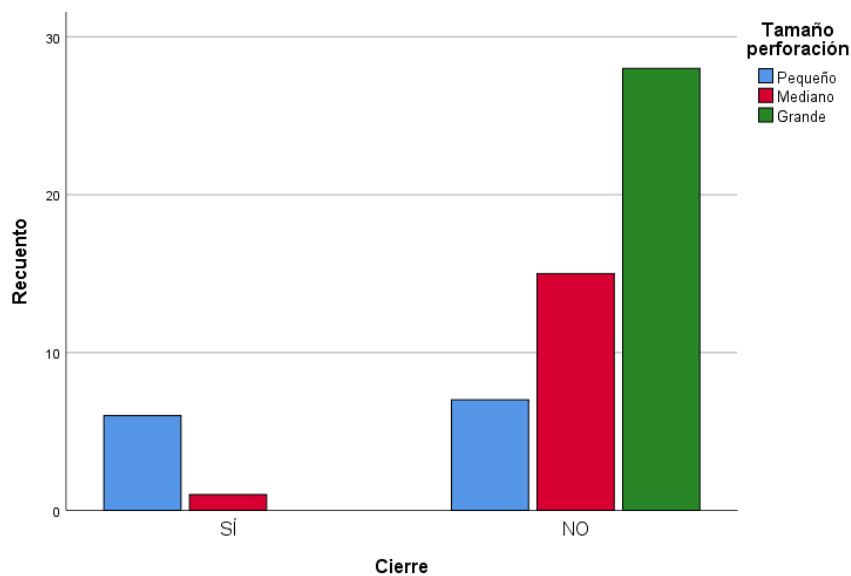


Figura 54: Número de perforaciones cerradas en función del tamaño de la perforación

Por otro lado, si relacionamos el tamaño de las perforaciones con el grupo experimental al que pertenecían, podemos ver que el grupo de membrana amniótica estaba compuesto por un 23,5% de perforaciones pequeñas, un 35,3% de perforaciones medianas y un 41,2% de perforaciones grandes, mientras que en el grupo control había un 21,7% de perforaciones pequeñas, un 17,4% de perforaciones medianas y un 60,9% de perforaciones grandes (Figura 55).

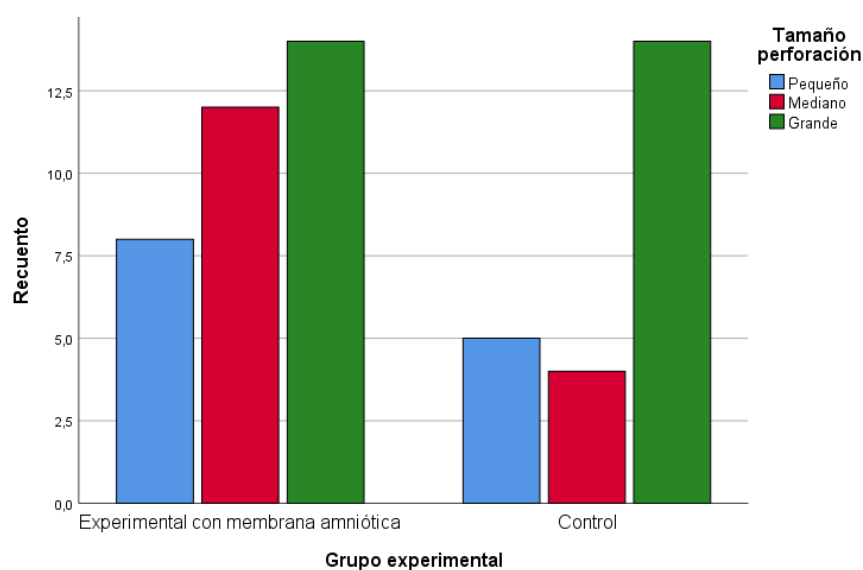


Figura 55: Número de perforaciones cerradas en función del tamaño de la perforación

RESULTADOS

Dicho de otra forma, el tratamiento con membrana amniótica se le aplicó al 61,5% de las perforaciones pequeñas, al 75,3% de las perforaciones medianas y al 50% de las perforaciones grandes, mientras que el tratamiento con el grupo control se le aplicó al 38,5% de las perforaciones pequeñas, al 25% de las perforaciones medianas y al 50 % de las perforaciones grandes (Tabla 13).

Esto nos muestra que, excepto en el grupo de perforaciones grandes, donde el reparto sí fue simétrico, en los otros dos grupos hubo un predominio de tratamiento con membrana amniótica. Aun así, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,263$) según el test Chi-cuadrado.

Tabla 13: Tabla cruzada: grupo experimental – tamaño de la perforación

			Tamaño perforación			Total
			Pequeño	Mediano	Grande	
Grupo experimental	Experimental con membrana amniótica	Recuento	8	12	14	34
		% dentro de Grupo experimental	23,5%	35,3%	41,2%	100,0%
		% dentro de Tamaño perforación	61,5%	75,0%	50,0%	59,6%
	Control	Recuento	5	4	14	23
		% dentro de Grupo experimental	21,7%	17,4%	60,9%	100,0%
		% dentro de Tamaño perforación	38,5%	25,0%	50,0%	40,4%
Total	Recuento	13	16	28	57	
	% dentro de Grupo experimental	22,8%	28,1%	49,1%	100,0%	
	% dentro de	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	Tamaño perforación					

Si ahora relacionamos el **tamaño de la perforación con el grupo de tratamiento**, vemos como el grupo D es el que mayor porcentaje de perforaciones pequeñas tiene, con un 34,6%, seguido del grupo C, con un 18,2%, seguido del grupo B, con un 11,1% y terminando con el grupo A, que tan solo tiene un 9,1% (Tabla 14).

Dicho de otro modo, del total de perforaciones pequeñas, el 69,2% pertenecían al grupo D, el 15,4% al grupo C, el 7,7% al grupo B y el otro 7,7% al grupo A.

RESULTADOS

No hay diferencias significativas ($p = 0,553$) tras aplicar el test Chi-cuadrado, aunque éste no es válido.

En la Figura 56 podemos observar de un modo más visual el número de perforaciones agrupadas por tamaños (pequeña, mediana o grande) en cada uno de los grupos de tratamiento.

Tabla 14: Tabla cruzada: grupo experimental – tamaño de la perforación

			Tamaño perforación			Total
			Pequeño	Mediano	Grande	
Grupo tratamiento	Grupo A	Recuento	1	4	6	11
		% dentro de Grupo tratamiento	9,1%	36,4%	54,5%	100,0%
		% dentro de Tamaño perforación	7,7%	25,0%	21,4%	19,3%
	Grupo B	Recuento	1	2	6	9
		% dentro de Grupo tratamiento	11,1%	22,2%	66,7%	100,0%
		% dentro de Tamaño perforación	7,7%	12,5%	21,4%	15,8%
	Grupo C	Recuento	2	4	5	11
		% dentro de Grupo tratamiento	18,2%	36,4%	45,5%	100,0%
		% dentro de Tamaño perforación	15,4%	25,0%	17,9%	19,3%
	Grupo D	Recuento	9	6	11	26
		% dentro de Grupo tratamiento	34,6%	23,1%	42,3%	100,0%
		% dentro de Tamaño perforación	69,2%	37,5%	39,3%	45,6%
Total		Recuento	13	16	28	57
		% dentro de Grupo tratamiento	22,8%	28,1%	49,1%	100,0%
		% dentro de Tamaño perforación	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

RESULTADOS

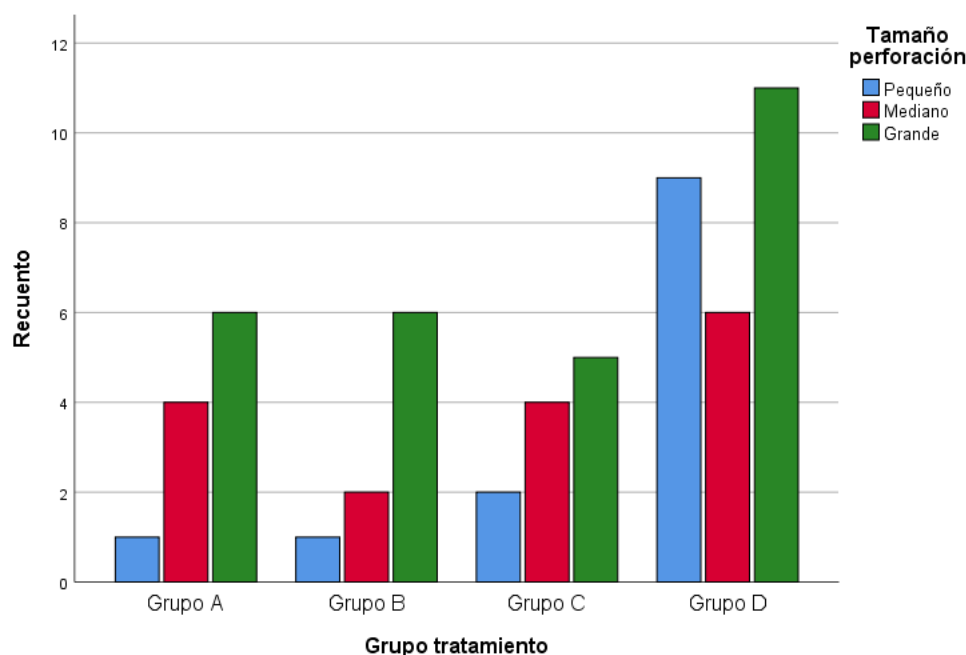


Figura 56: Número de perforaciones en función de su tamaño en cada grupo de tratamiento

Si miramos hacia atrás y comparamos estos datos con los de el porcentaje de cierre obtenido en función del grupo de tratamiento, podemos recordar como el 57,1% de los casos de cierre tuvieron lugar en el grupo D, que coincide con el grupo que mayor porcentaje de perforaciones pequeñas tiene (34,6%) y, en segundo lugar, el 28,6% de los cierres pertenecían al grupo C, coincidiendo con el segundo grupo con mayor porcentaje de perforaciones pequeñas (18,2%).

Esto nos ha llevado a **correlacionar las tres variables (Cierre-Tamaño de perforación- Grupo de tratamiento)** para saber si realmente existe una correlación entre ellas. De este modo, en cada grupo de tratamiento (A, B, C y D) se ha relacionado el tamaño de la perforación con la presencia de cierre, obteniendo la tabla que se muestra a continuación (Tabla 15).

RESULTADOS

Tabla 15: Tabla cruzada: grupo tratamiento – tamaño de la perforación – cierre de la perforación

Grupo tratamiento				Cierre		Total
				SÍ	NO	
<u>A</u>	Tamaño perforación	Pequeño	Recuento		1	1
			% dentro de Tamaño perforación		100,0%	100,0%
			% dentro de Cierre		9,1%	9,1%
		Mediano	Recuento		4	4
			% dentro de Tamaño perforación		100,0%	100,0%
			% dentro de Cierre		36,4%	36,4%
		Grande	Recuento		6	6
			% dentro de Tamaño perforación		100,0%	100,0%
			% dentro de Cierre		54,5%	54,5%
	Total	Recuento			11	11
		% dentro de Tamaño perforación			100,0%	100,0%
		% dentro de Cierre			100,0%	100,0%
<u>B</u>	Tamaño perforación	Pequeño	Recuento	1	0	1
			% dentro de Tamaño perforación	100,0%	0,0%	100,0%
			% dentro de Cierre	100,0%	0,0%	11,1%
		Mediano	Recuento	0	2	2
			% dentro de Tamaño perforación	0,0%	100,0%	100,0%
			% dentro de Cierre	0,0%	25,0%	22,2%
		Grande	Recuento	0	6	6
			% dentro de Tamaño perforación	0,0%	100,0%	100,0%
			% dentro de Cierre	0,0%	75,0%	66,7%
	Total	Recuento		1	8	9
		% dentro de Tamaño perforación		11,1%	88,9%	100,0%
		% dentro de Cierre		100,0%	100,0%	100,0%
<u>C</u>	Tamaño perforación	Pequeño	Recuento	1	1	2
			% dentro de Tamaño perforación	50,0%	50,0%	100,0%
			% dentro de Cierre	50,0%	11,1%	18,2%
		Mediano	Recuento	1	3	4
			% dentro de Tamaño perforación	25,0%	75,0%	100,0%
			% dentro de Cierre	50,0%	33,3%	36,4%
		Grande	Recuento	0	5	5
			% dentro de Tamaño perforación	0,0%	100,0%	100,0%
			% dentro de Cierre	0,0%	55,6%	45,5%
	Total	Recuento		2	9	11
		% dentro de Tamaño perforación		18,2%	81,8%	100,0%
		% dentro de Cierre		100,0%	100,0%	100,0%
Pequeño		Recuento	4	5	9	

RESULTADOS

<u>Grupo</u>	<u>Tamaño</u>		%			
				dentro de Tamaño perforación	dentro de Cierre	
D	perforación			44,4%	55,6%	100,0%
				100,0%	22,7%	34,6%
		Mediano	Recuento	0	6	6
			% dentro de Tamaño perforación	0,0%	100,0%	100,0%
			% dentro de Cierre	0,0%	27,3%	23,1%
		Grande	Recuento	0	11	11
			% dentro de Tamaño perforación	0,0%	100,0%	100,0%
			% dentro de Cierre	0,0%	50,0%	42,3%
	Total		Recuento	4	22	26
			% dentro de Tamaño perforación	15,4%	84,6%	100,0%
			% dentro de Cierre	100,0%	100,0%	100,0%
Total	Tamaño	Pequeño	Recuento	6	7	13
			% dentro de Tamaño perforación	46,2%	53,8%	100,0%
			% dentro de Cierre	85,7%	14,0%	22,8%
		Mediano	Recuento	1	15	16
			% dentro de Tamaño perforación	6,3%	93,8%	100,0%
			% dentro de Cierre	14,3%	30,0%	28,1%
		Grande	Recuento	0	28	28
			% dentro de Tamaño perforación	0,0%	100,0%	100,0%
			% dentro de Cierre	0,0%	56,0%	49,1%
		Total	Recuento	7	50	57
			% dentro de Tamaño perforación	12,3%	87,7%	100,0%
			% dentro de Cierre	100,0%	100,0%	100,0%

Con el test Chi-cuadrado obtuvimos un resultado global significativo ($p = 0,000$) y si lo analizamos por grupos obtenemos una p significativa en el grupo B ($p = 0,011$) y en el grupo D ($p = 0,012$), no siendo significativa en el grupo C ($p = 0,273$).

Por lo tanto, se puede decir que hay una relación entre los cierres producidos en los grupos B y D que coincide con presencia de perforaciones de menor tamaño.

Debemos recordar que el test no es válido.

A continuación, podemos ver la representación gráfica de esta relación entre el tamaño de la perforación en cada grupo de tratamiento y si tuvo lugar o no el cierre de la perforación (Figuras 57, 58 y 59).

RESULTADOS

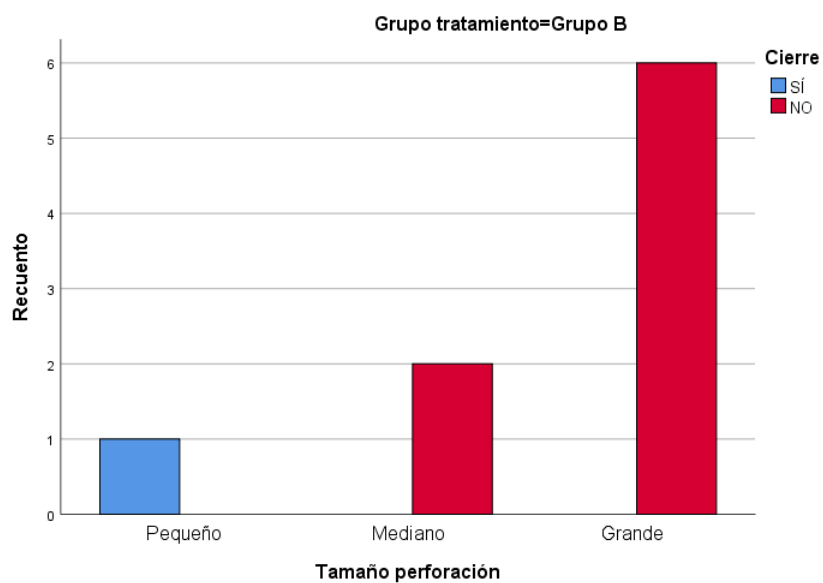


Figura 57: Número de perforaciones cerradas en función de su tamaño en el grupo B

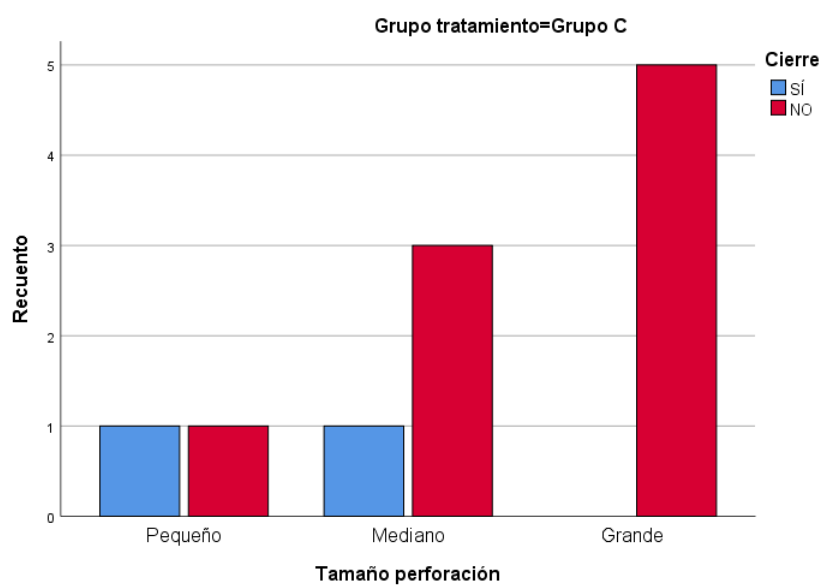


Figura 58: Número de perforaciones cerradas en función de su tamaño en el grupo C

RESULTADOS

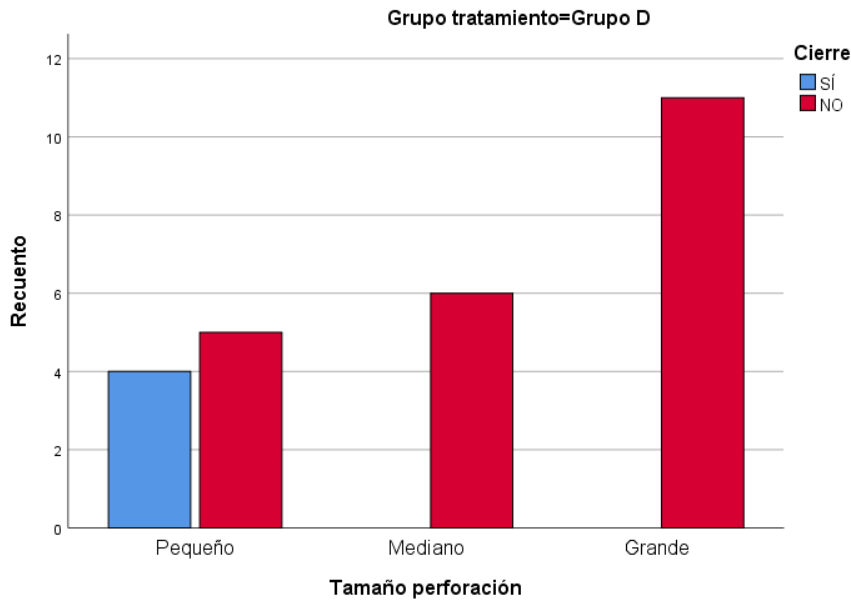


Figura 59: Número de perforaciones cerradas en función de su tamaño en el grupo B

Por lo tanto, con lo visto hasta ahora, podemos decir que hay una relación entre el cierre de la perforación con el tamaño de la perforación, pero no hemos podido demostrar dependencia con el grupo de tratamiento ni el grupo experimental (MA o control).

Si ahora **relacionamos los valores cuantitativos del tamaño de las perforaciones de cada día del ensayo con el grupo experimental al que pertenecían**, vemos que hay una tendencia a una media de menor tamaño en el grupo de membrana amniótica respecto al grupo control excepto en el primer día, en el cual la media del grupo de membrana amniótica es ligeramente superior ($1,83 \text{ mm}^2$) a la del grupo control ($1,75 \text{ mm}^2$) (Figura 60) (Tabla 16).

RESULTADOS

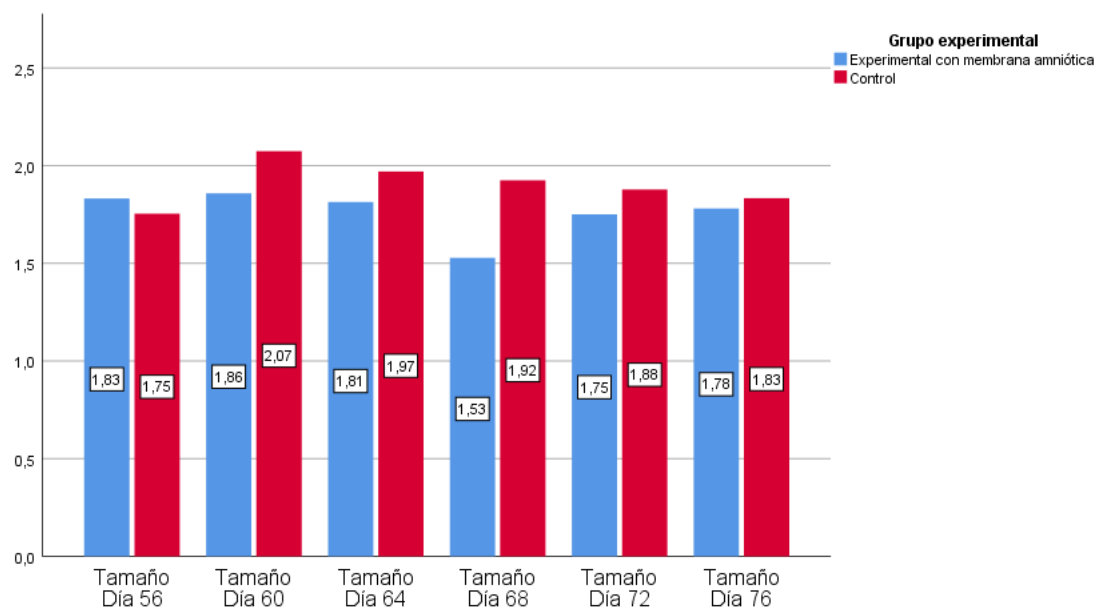


Figura 60: Tamaño medio de las perforaciones según el día del ensayo y el grupo experimental

Tabla 16: Tabla cruzada: grupo experimental – tamaño medio de la perforación por días

			Tamaño Día 56	Tamaño Día 60	Tamaño Día 64	Tamaño Día 68	Tamaño Día 72	Tamaño Día 76
Grupo experimental	Experimental con membrana amniótica	Media	1,83	1,86	1,81	1,53	1,75	1,78
		Desviación estándar	1,10	,96	1,12	1,14	1,09	1,26
		95,0% CL inferior	1,45	1,38	1,31	1,08	1,32	1,34
		95,0% CL superior	2,22	2,33	2,32	1,98	2,18	2,22
	Control	Media	1,75	2,07	1,97	1,92	1,88	1,83
		Desviación estándar	,96	1,03	1,01	,96	,91	,99
		95,0% CL inferior	1,34	1,54	1,50	1,48	1,45	1,41
		95,0% CL superior	2,17	2,60	2,44	2,37	2,30	2,26

RESULTADOS

Pese a la tendencia observada de un menor tamaño en el grupo de membrana amniótica, tras aplicar el test de U de Mann-Whitney, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (p 0,864 el día 56; p 0,466 el día 60; p 0,637 el día 64; p 0,211 el día 68; p 0,863 el día 72; y p 0,857 el día 76).

Si hacemos lo mismo, pero **relacionándolo con el grupo de tratamiento**, podemos ver que el grupo B es el que tenía una media de tamaño de la perforación más grande en todos los días, seguido del grupo A, seguido del grupo C y, por último, el grupo D, que es el que tiene un tamaño medio menor. En la gráfica se puede ver el tamaño medio expresado en mm² en cada grupo y día (Figura 61). Del mismo modo, en la Tabla 17 podemos ver todos los datos.

Tras aplicar la prueba de Kruskal Wallis, observamos un resultado estadísticamente significativo en los días 72 (p 0,018) y 76 (p 0,041). No hay diferencias estadísticamente significativas el resto de días (p 0,305 el día 56; p 0,250 el día 60; p 0,176 el día 64; y p 0,197 el día 68)

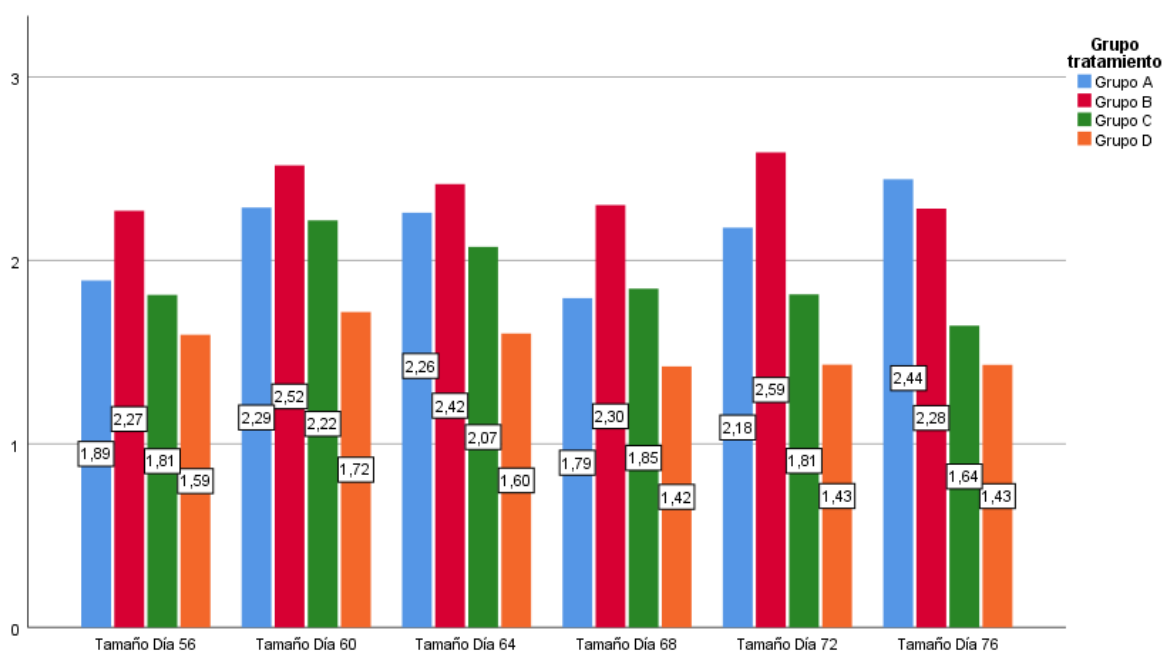


Figura 61: Tamaño medio de las perforaciones según el día del ensayo y el grupo de tratamiento

Tabla 17: Tabla cruzada: grupo tratamiento – tamaño medio de la perforación por días

			Tamaño Día 56	Tamaño Día 60	Tamaño Día 64	Tamaño Día 68	Tamaño Día 72	Tamaño Día 76
Grupo	Grupo	Media	1,89	2,29	2,26	1,79	2,18	2,44
tratamiento	A	Desviación estándar	1,00	1,30	,98	1,31	,82	1,19
		95,0% CL inferior	1,22	,67	1,23	,79	1,49	1,64
		95,0% CL superior	2,57	3,90	3,29	2,80	2,86	3,24
	Grupo	Media	2,27	2,52	2,42	2,30	2,59	2,28
	B	Desviación estándar	,96	1,01	1,35	1,26	1,14	1,16
		95,0% CL inferior	1,54	,92	,74	1,13	1,53	1,39
		95,0% CL superior	3,01	4,12	4,09	3,47	3,64	3,18
	Grupo	Media	1,81	2,22	2,07	1,85	1,81	1,64
	C	Desviación estándar	,94	,99	1,18	,94	,89	1,01
		95,0% CL inferior	1,18	,99	1,09	1,06	1,13	,96
		95,0% CL superior	2,44	3,44	3,06	2,63	2,50	2,33
	Grupo	Media	1,59	1,72	1,60	1,42	1,43	1,43
	D	Desviación estándar	1,11	,89	,93	,93	,93	1,05
		95,0% CL inferior	1,15	1,31	1,19	1,02	1,03	1,01
		95,0% CL superior	2,04	2,12	2,02	1,82	1,84	1,86

5.4 Relación entre la presencia de infección y el uso de antibiótico previo con otras variables

Otro dato que hemos querido analizar es si ha influido el tipo de grupo experimental en la presencia de infecciones. Hemos tenido 6 infecciones en el grupo de membrana amniótica (17,6%) y 5 en el grupo control (21,7%) (Tabla 18) (Figura 62), sin obtener diferencias estadísticamente significativas (p 0,701) tras aplicar el test Chi-cuadrado.

RESULTADOS

Tabla 18: Tabla cruzada: grupo experimental – presencia de infección

			Infección		Total
			SÍ	NO	
Grupo experimental	Experimental con membrana amniótica	Recuento	6	28	34
		% dentro de Grupo experimental	17,6%	82,4%	100,0%
		% dentro de Infección	54,5%	60,9%	59,6%
	Control	Recuento	5	18	23
		% dentro de Grupo experimental	21,7%	78,3%	100,0%
		% dentro de Infección	45,5%	39,1%	40,4%
Total	Recuento	11	46	57	
	% dentro de Grupo experimental	19,3%	80,7%	100,0%	
	% dentro de Infección	100,0%	100,0%	100,0%	

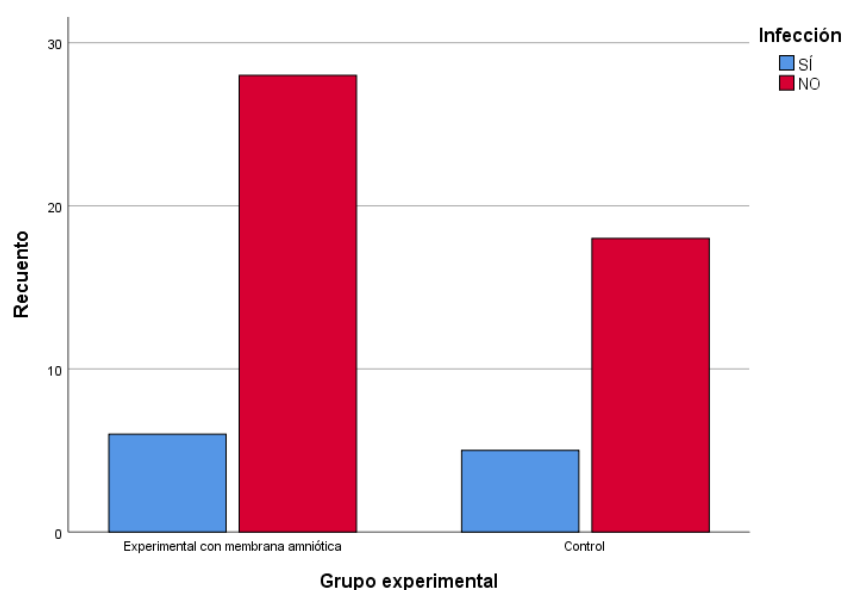


Figura 62: Número de infecciones en el grupo de membrana amniótica y en el grupo control

Si relacionamos la **presencia de infección con el tamaño de la perforación**, podemos ver que, del total de 11 oídos infectados, 8 pertenecían a perforaciones grandes (72,7%), 2 a perforaciones medianas (18,2%) y tan solo había 1 infección en una perforación pequeña (9,1%) (Figura 63) (Tabla19). Parece que hay una tendencia a tener más

RESULTADOS

infecciones cuanto mayor es la perforación, sin embargo, tras aplicar el test Chi-cuadrado, no se han observado diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,208$). Nuevamente, no podemos considerar válido el test ya que no se cumple el supuesto en el cual no debe haber más de un 25% de las casillas de la tabla cruzada con frecuencia inferior o igual a 5.

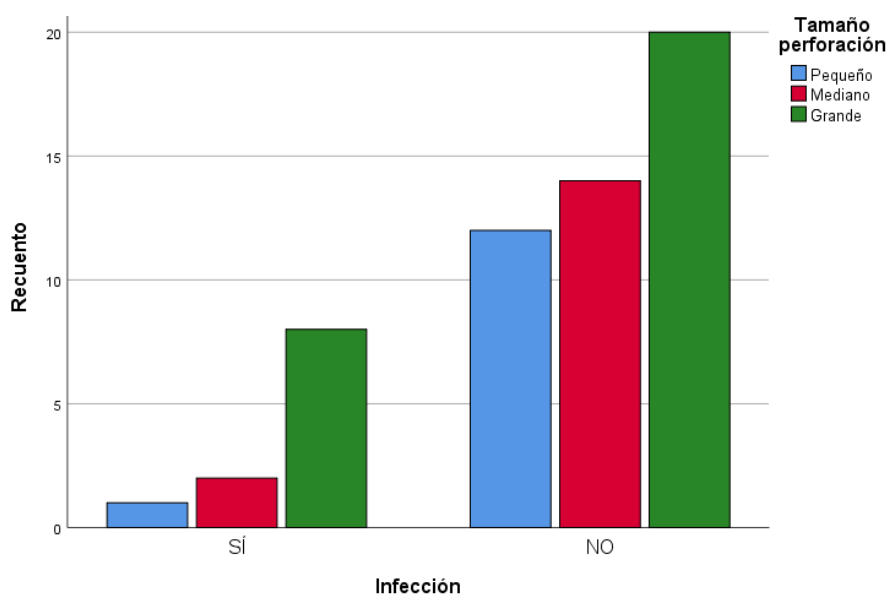


Figura 63: Número de infecciones en función el tamaño de la perforación

Tabla 19: Tabla cruzada: presencia infección – tamaño de la perforación

			Tamaño perforación			Total
			Pequeño	Mediano	Grande	
Infección	SÍ	Recuento	1	2	8	11
		% dentro de Infección	9,1%	18,2%	72,7%	100,0%
		% dentro de Tamaño perforación	7,7%	12,5%	28,6%	19,3%
	NO	Recuento	12	14	20	46
		% dentro de Infección	26,1%	30,4%	43,5%	100,0%
		% dentro de Tamaño perforación	92,3%	87,5%	71,4%	80,7%
	Total	Recuento	13	16	28	57
		% dentro de Infección	22,8%	28,1%	49,1%	100,0%
		% dentro de Tamaño perforación	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

En cuanto al **uso de antibiótico previo al día de la miringoplastia** (justificado por la presencia de infección la semana de antes), también vemos una tendencia a un mayor uso del antibiótico en las perforaciones grandes (Figura 64). Vemos como el antibiótico se aplicó a un total de 17 pacientes de los cuales, 7 eran perforaciones grandes (41,2%), 6 perforaciones medianas (35,3%) y 4 perforaciones pequeñas (23,5%) (Tabla 20). Tras aplicar el test Chi-cuadrado, tampoco se han observado diferencias estadísticamente significativas (p 0,681). El test tampoco es válido.

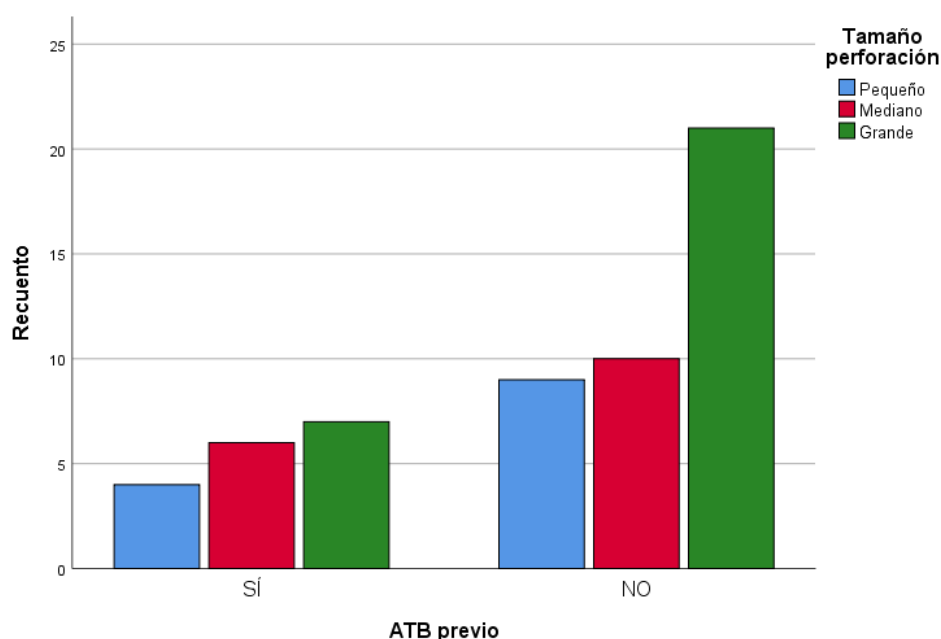


Figura 63: Uso de antibiótico en función del tamaño de la perforación

Tabla 20: Tabla cruzada: Uso de antibiótico previo – Tamaño de la perforación

			Tamaño perforación			Total
			Pequeño	Mediano	Grande	
ATB previo SÍ	Recuento		4	6	7	17
	% dentro de ATB previo		23,5%	35,3%	41,2%	100,0%
	% dentro de Tamaño perforación		30,8%	37,5%	25,0%	29,8%
NO	Recuento		9	10	21	40
	% dentro de ATB previo		22,5%	25,0%	52,5%	100,0%
	% dentro de Tamaño perforación		69,2%	62,5%	75,0%	70,2%
Total	Recuento		13	16	28	57
	% dentro de ATB previo		22,8%	28,1%	49,1%	100,0%
	% dentro de Tamaño perforación		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Si ahora relacionamos el uso de antibiótico con la presencia de infección, podemos ver que, de los 11 pacientes que presentaron infección, 7 de ellos (63,6%) no habían recibido tratamiento antibiótico previo. También podemos ver que de 17 pacientes que recibieron antibiótico, solo presentaron infección 4 de ellos (23,5%) (Figura 64). Por lo tanto, la mayoría de los pacientes que presentaron infección no habían recibido antibiótico previo y solo una minoría de los que llevó antibiótico acabó desarrollando infección. Sin embargo, también podemos decir que, de los 40 pacientes del grupo que no llevó tratamiento antibiótico, la mayoría no presentó infección (82,5%) (Tabla 21).

Por lo tanto y tras aplicar el test estadístico de Chi-cuadrado, se puede decir que no hay una relación entre el uso de antibiótico previo a la miringoplastia y la aparición de infección, ya que no hemos obtenido unos resultados estadísticamente significativos (p 0,598).

RESULTADOS

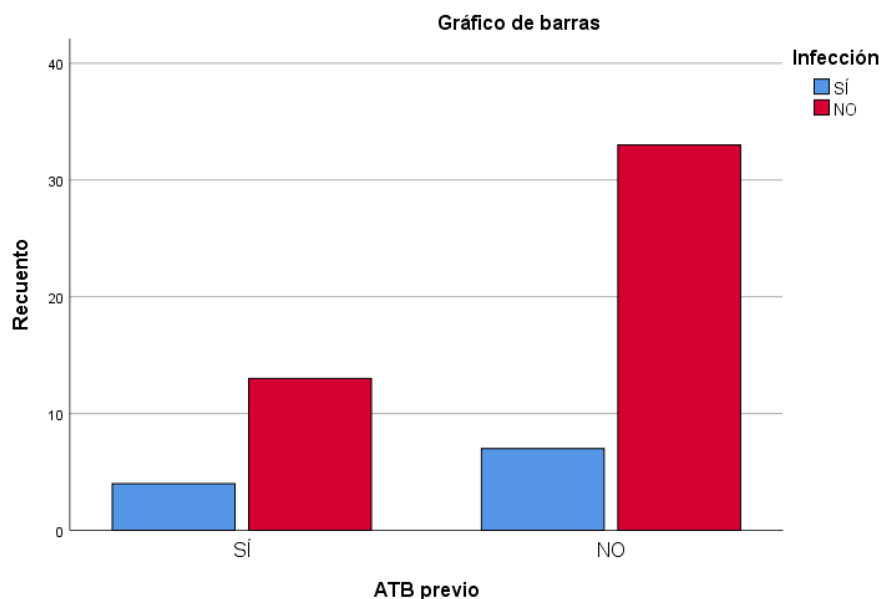


Figura 64: Número de infecciones en función del uso de antibiótico

Tabla 21: Tabla cruzada: Uso de antibiótico previo – Tamaño de la perforación

			Infección		Total
			SÍ	NO	
ATB previo	SÍ	Recuento	4	13	17
		% dentro de ATB previo	23,5%	76,5%	100,0%
		% dentro de Infección	36,4%	28,3%	29,8%
	NO	Recuento	7	33	40
		% dentro de ATB previo	17,5%	82,5%	100,0%
		% dentro de Infección	63,6%	71,7%	70,2%
Total	Recuento		11	46	57
	% dentro de ATB previo		19,3%	80,7%	100,0%
	% dentro de Infección		100,0%	100,0%	100,0%

Si ahora relacionamos el **uso de antibiótico previo con el cierre de las perforaciones timpánicas**, observamos que de 7 perforaciones que se cerraron, tan solo 1 había recibido antibiótico previo (14,3%) (Figura 65), mientras que de las 50 perforaciones que permanecieron abiertas, 16 habían recibido antibiótico previo (32%) (Tabla 22).

No hubo diferencias estadísticamente significativas con el test Chi-cuadrado (p 0,337). Al no ser válido y tratarse de una tabla 2x2, aplicamos el test de Fisher y tampoco hubo

RESULTADOS

diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,662$), por lo que podemos aceptar la hipótesis de independencia entre las variables con un nivel de confianza del 95%.

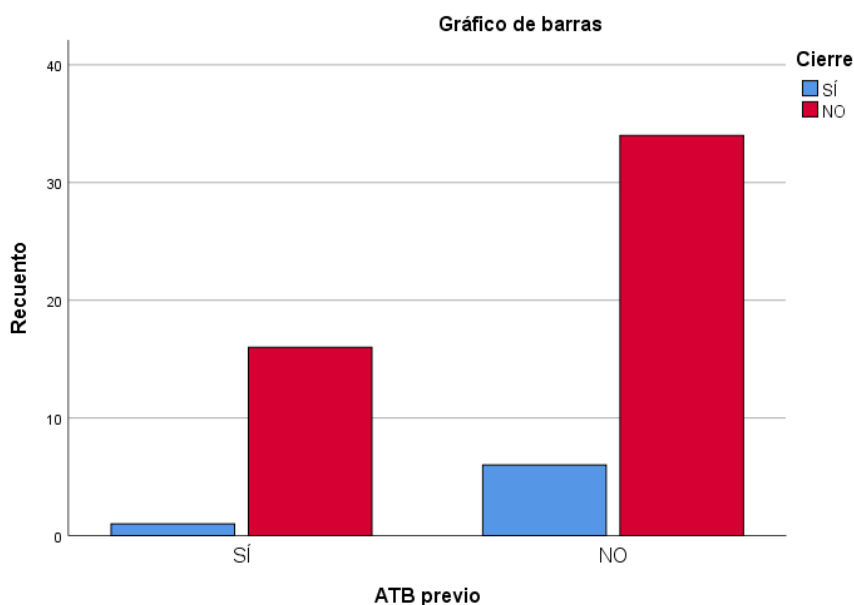


Figura 65: Número de cierres de perforaciones en función del uso de antibiótico

Tabla 22: Tabla cruzada: Uso de antibiótico previo – Cierre de la perforación

			Cierre		Total
			SÍ	NO	
ATB previo	SÍ	Recuento	1	16	17
		% dentro de ATB previo	5,9%	94,1%	100,0%
		% dentro de Cierre	14,3%	32,0%	29,8%
	NO	Recuento	6	34	40
		% dentro de ATB previo	15,0%	85,0%	100,0%
		% dentro de Cierre	85,7%	68,0%	70,2%
Total	Recuento		7	50	57
	% dentro de ATB previo		12,3%	87,7%	100,0%
	% dentro de Cierre		100,0%	100,0%	100,0%

5.5 Resultado del estudio histopatológico

En cuanto al estudio histopatológico, cabe destacar las grandes dificultades que hemos tenido desde el principio para su realización, comenzando con el proceso de extracción de gran complejidad técnica para obtener la totalidad de la membrana timpánica sin fragmentarla accidentalmente, así como para posteriormente lograr una correcta orientación de la pieza, y finalizando con la dificultad para la realización de los cortes con el micrótopo sin dañar el tejido.

Por todo esto, son muy pocos los fragmentos útiles que hemos podido obtener y tan solo vamos a ejemplificar cada uno de los tipos de cierre producido: cierre espontáneo (tras realizar la perforación timpánica, consecuencia del fracaso de la cronificación), cierre en el grupo de membrana amniótica y cierre en el grupo control.

En primer lugar, como ejemplo del cierre espontáneo, exponemos el resultado del estudio del tímpano del paciente número 51, que se corresponde con el oído izquierdo de la rata número 26. El aspecto macroscópico puede observarse en la Figura 66.

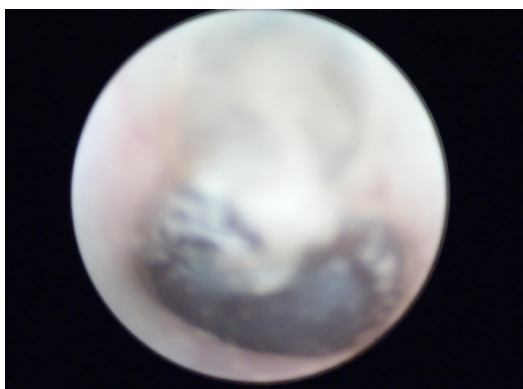


Figura 66: Oído izquierdo de rata nº 26

Por otro lado, en la Figura 67 se muestra un corte microscópico (15x) en el que podemos observar claramente una diferencia entre la zona de tímpano normal (N) y la zona donde se ha reparado la perforación espontáneamente (asterisco), que se caracteriza por la presencia de un tejido conectivo cicatricial bien conformado.

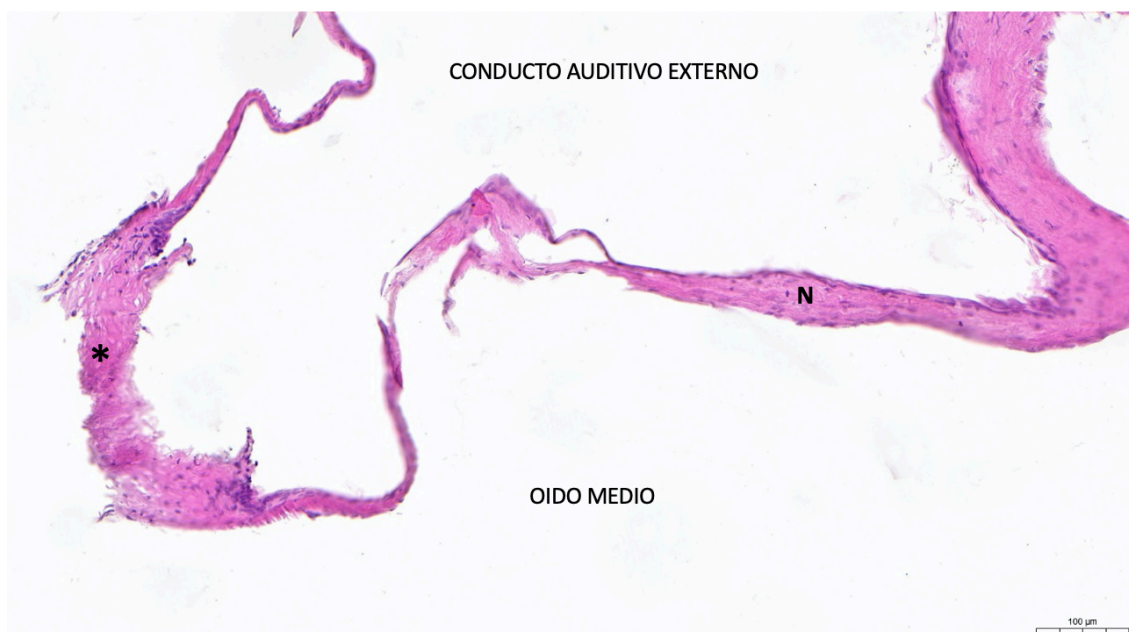


Figura 67: Corte histológico de cierre espontáneo de perforación timpánica (15x)

Si observamos al detalle el mismo corte con un mayor aumento (40x), vemos como la región de la cicatriz (del cierre) está conformada por una zona de tejido conectivo denso modelado (TC) con escasos fibroblastos (Figura 68).



Figura 68: Corte histológico de cierre espontáneo de perforación timpánica (40x)

RESULTADOS

En segundo lugar, como ejemplo del cierre con membrana amniótica, exponemos el resultado del estudio del tímpano del paciente número 54, que se corresponde con el oído derecho de la rata número 27. El aspecto macroscópico puede observarse en la Figura 69.

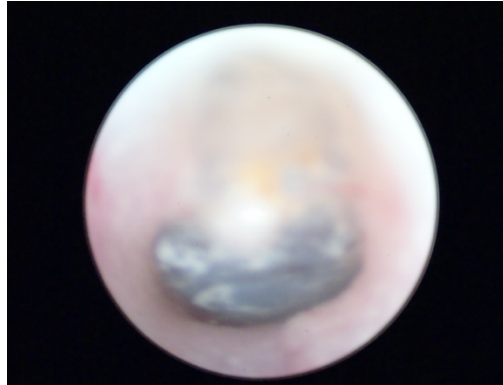


Figura 69: Oído derecho de rata n°27

En la Figura 70 se muestra un corte microscópico (15x) en el que se observa un aumento de grosor de la membrana a la altura del cierre del defecto, conformando un tejido conectivo más celularizado (asterico). Se observa también debris (restos) de un material acidófilo y homogéneo adheridos a la cara externa de la membrana reparada (presumiblemente restos de membrana desvitalizados).

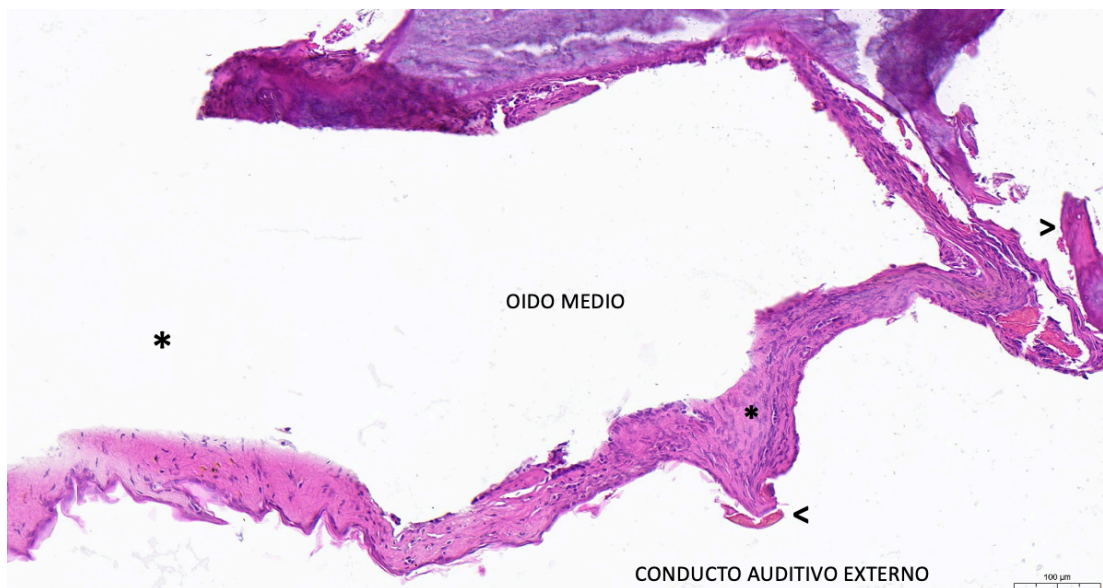


Figura 70: Corte histológico de cierre con membrana amniótica de perforación timpánica (15x)

RESULTADOS

Al observar al detalle la zona reparada en el mismo corte con un mayor aumento (40x), vemos que se trata de un tejido conectivo (TC) bien conformado, con abundantes fibroblastos (cabeza de flecha) en la zona de reparación (Figura 71).

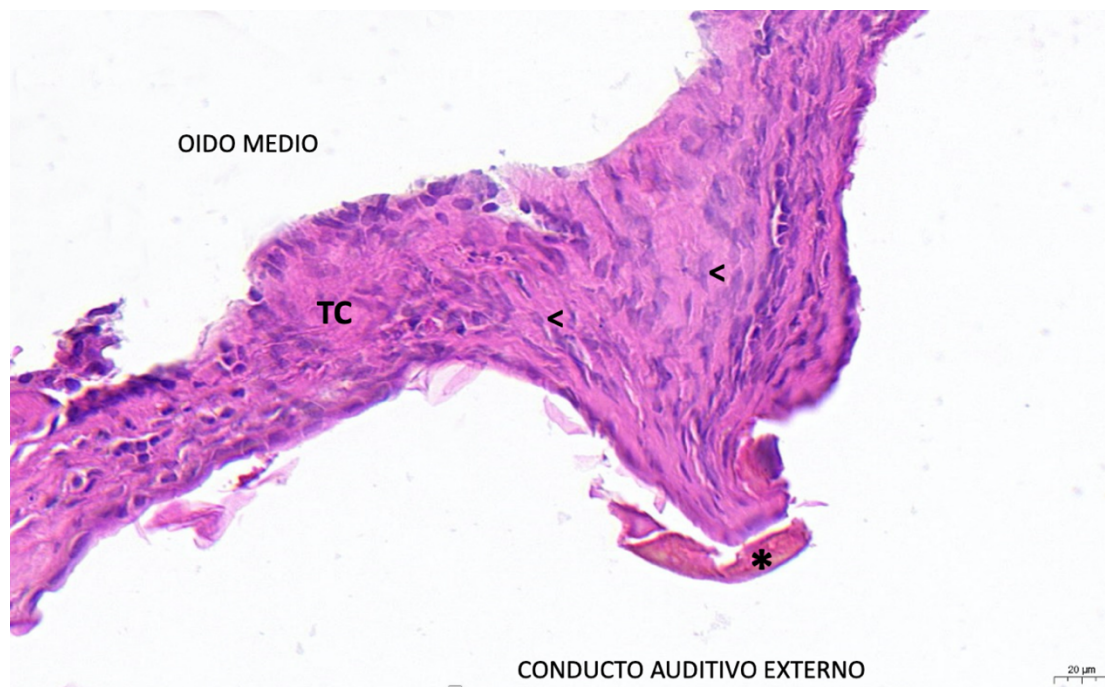


Figura 71: Corte histológico de cierre con membrana amniótica de perforación timpánica (40x)

En tercer lugar, como ejemplo del cierre con cutanplast, exponemos el resultado del estudio del tímpano del paciente número 49, que se corresponde con el oído izquierdo de la rata número 25. El aspecto macroscópico puede observarse en la Figura 72.

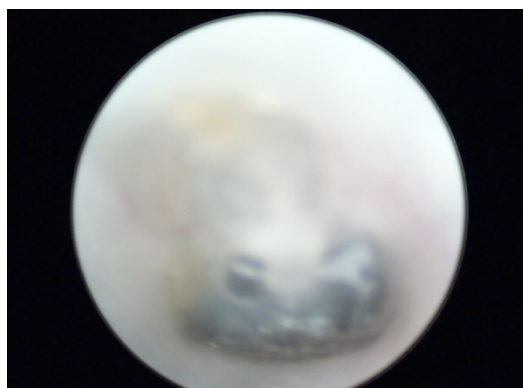


Figura 72: Oído izquierdo de rata nº27

RESULTADOS

En este oído del grupo control cerrado con cutanplast, podemos ver en el corte microscópico (15x) (Figura 73) una membrana reparada de un grosor más evidente en comparación con las anteriores, conformando un tejido conectivo denso modelado muy evidente (asteriscos). Sin embargo, también se evidencian algunas zonas puntuales de calcificación distrófica, que son depósitos inespecíficos de calcio (flecha).

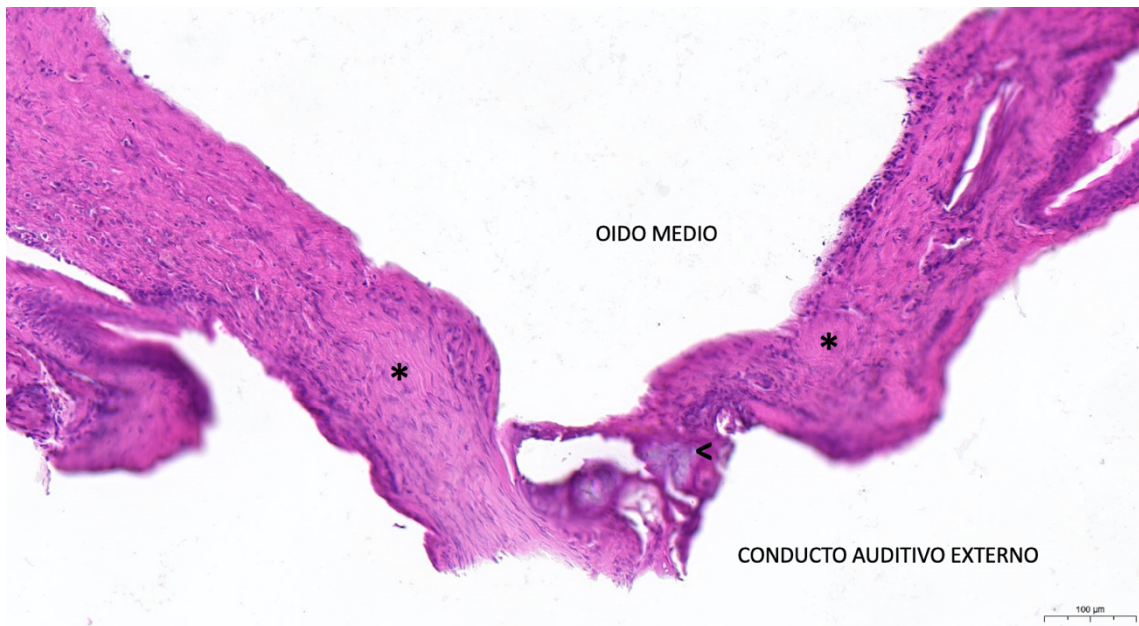


Figura 73: Corte histológico de cierre con membrana amniótica de perforación timpánica (15x)

Si observamos este corte al detalle (40x) (Figura 40), podemos apreciar una pared timpánica con un tejido conectivo bien conformado, con mayor celularidad y que induce a un evidente aumento de su grosor. Se observa además depósitos de calcio inespecíficos (flecha) (Figura 74).

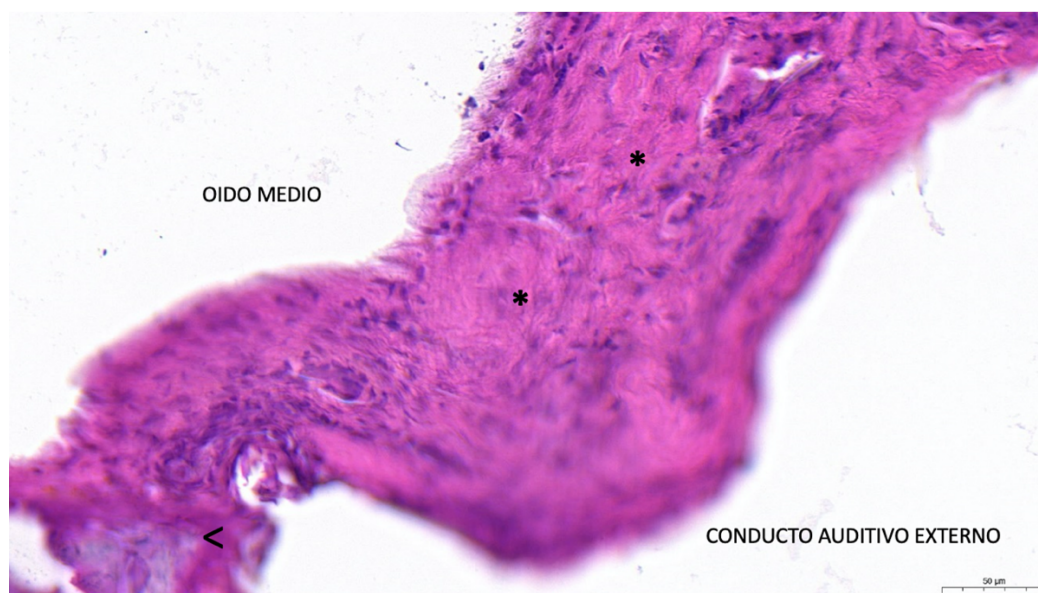


Figura 74: Corte histológico de cierre con membrana amniótica de perforación timpánica (40x)

A continuación, muestro una imagen de un tímpano normal junto con las tres imágenes macroscópicas y microscópicas (40x) para comparar con mayor facilidad (Figura 75 y 76).

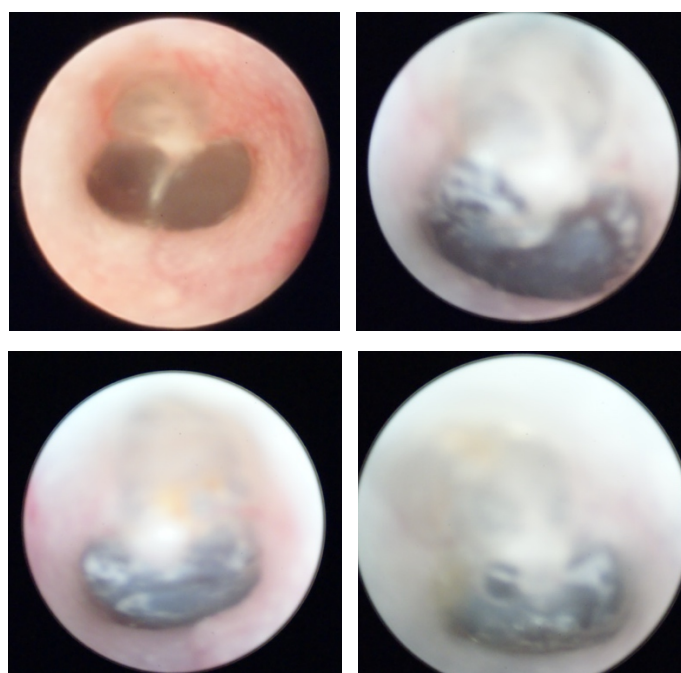


Figura 75: Arriba a izquierda tímpano normal y a la derecha cierre espontáneo. Abajo a la izquierda cierre con membrana amniótica y a la derecha cierre con cutanplast

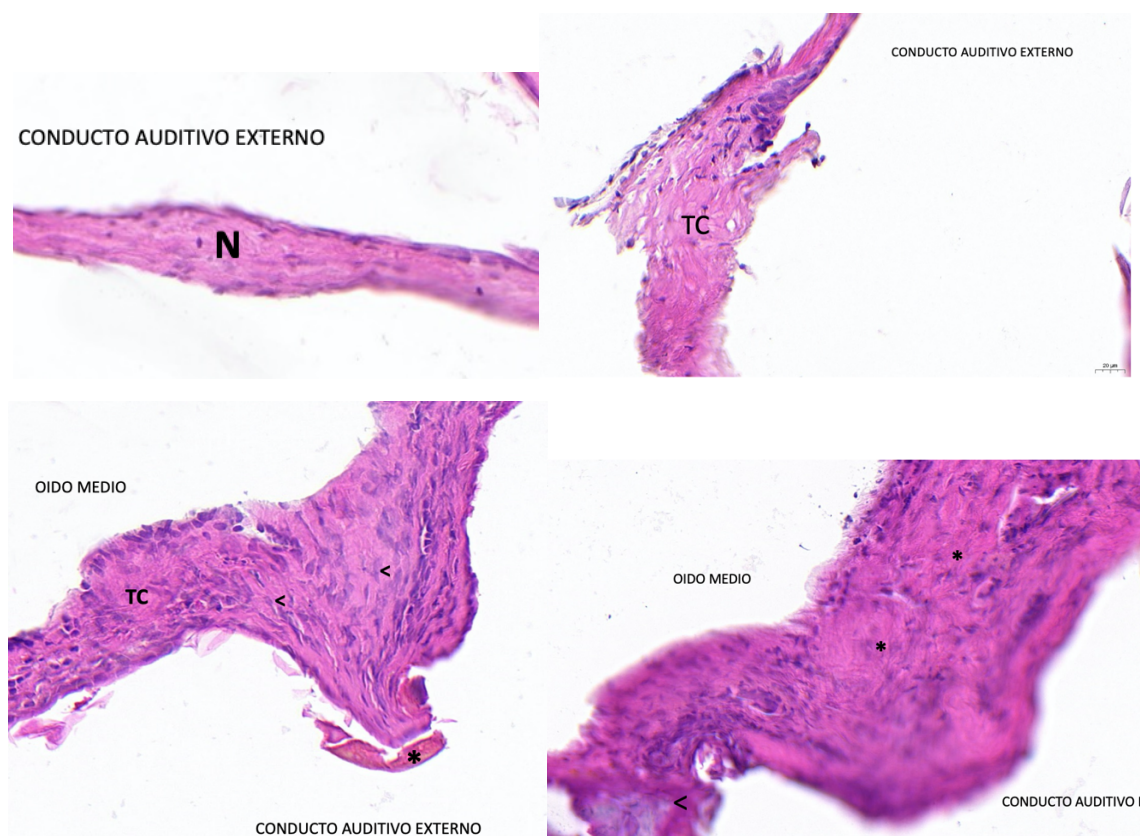


Figura 76: Arriba a la izquierda membrana timpánica normal y a la derecha cierre espontáneo.
Abajo a la izquierda cierre con membrana amniótica y a la derecha cierre con cutanplast

Resumiendo, lo que se evidencia a grandes rasgos es que el cierre espontáneo induce una cicatriz conectiva en la zona del defecto, mientras que con la membrana amniótica y el cutanplast la reparación es más uniforme, si bien aparentemente induce un ligero engrosamiento de la membrana timpánica en ambos casos. Cabe destacar que en el control la calidad de la reparación con cutanplast es bastante peor en comparación con la membrana amniótica, induciendo incluso la aparición de depósitos inespecíficos de calcio, característica frecuente cuando aparecen fenómenos inflamatorios más acusados

6. DISCUSIÓN

6.1 Consideraciones acerca de las características y la conservación de la membrana amniótica

A día de hoy, se puede decir que la membrana amniótica es un material ampliamente aceptado y utilizado en distintos campos de la medicina, destacando por sus numerosas propiedades como son facilitar una adecuada reepitelización tisular, su escasa inmunogenicidad, la presencia de propiedades antiinflamatorias, antifibróticas y antibacterianas entre otras, como se ha comentado con anterioridad (115, 116).

A lo largo de la historia se han descrito muchos métodos para la esterilización y conservación de la membrana amniótica. En los primeros trabajos descritos, únicamente se conservaba el tejido con solución salina (144,159). El problema radicaba en la presencia de contaminación de la membrana por crecimiento bacteriano.

En otras ocasiones se esterilizaba con la autoclave o se hervía (116,121).

También se ha buscado su preservación por medio de la deshidratación, destacando el trabajo de Rao y Chandrasekharan en 1981, en el que deshidrataron la membrana amniótica a temperatura ambiente y completaron el proceso de esterilización con el uso de radiación ultravioleta o gamma (160).

Algunos autores proponen el uso de membrana amniótica en fresco, sin que haya sido sometida a un proceso de conservación (145,146), aunque actualmente se considera que no presenta ventajas clínicas mientras que sí supone un aumento del riesgo de infecciones.

Como ya comentamos, los métodos de conservación llevados a cabo en la actualidad con más frecuencia son la criopreservación y la liofilización de la membrana amniótica.

En un estudio llevado a cabo por Rodríguez-Ares y colaboradores en 2009 se comparó la conservación de membrana amniótica liofilizada y criopreservada.

Observaron que con la liofilización se produce un mayor adelgazamiento de la lámina basal (Figura 77) así como mayor presencia de vacuolas intracitoplasmáticas. También produce una mayor pérdida de proteínas y factores de crecimiento respecto a la criopreservada. Con todo esto, concluyeron que la criopreservación se considera el mejor

método de conservación para la membrana amniótica, aunque con la liofilización se mantiene una adecuada estructura de la membrana y puede ser especialmente útil para las situaciones en las que no se disponga de la infraestructura necesaria para el almacenamiento y transporte de la membrana criopreservada (161).

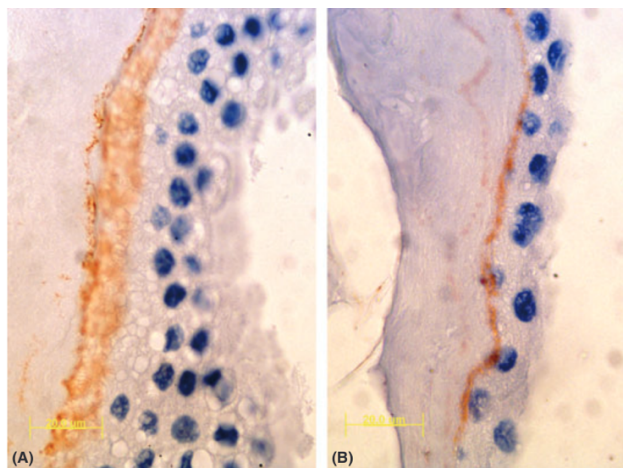


Figura 77 : Se observa un mayor grosor de la membrana basal en la membrana amniótica criopreservada (A) respecto a la liofilizada (B) (161).

Fouad et al (138) utilizaron membrana amniótica criopreservada para la realización de miringoplastias. Para su obtención, la placenta donante se enjuagaba con una solución salina balanceada (BSS) y se trataba con una solución antibiótica que contenía penicilina, estreptomicina, neomicina y amfotericina B durante 24 horas. Después se separaba la membrana amniótica de la coriónica y se almacenaba en glicerol al 50% a -80°C . La membrana se descongelaba inmediatamente antes de su uso, debiendo estar para ello a temperatura ambiente durante 10 minutos y, posteriormente, se enjuagaba con suero salino.

En nuestro estudio, también hemos utilizado membrana amniótica criopreservada a -80°C , aunque con algunas diferencias. En nuestro caso, se congelaba sobre una lámina de nitrocelulosa y se conservaba en una mezcla crioprotectora compuesta por 9 ml de albúmina humana (15%), 9 ml de DMSO (15%) y 42 ml de medio de cultivo TC-199. Previamente había sido tratada con una solución antibiótica compuesta por una

combinación de cotrimoxazol 48 mg (0,3 ml), tobramicina 50 mg (1ml) y vancomicina 50 mg (1 ml).

Por otro lado, vemos como la membrana amniótica liofilizada también ha sido usada para realización de miringoplastias en publicaciones como la de Burgos H (162) y Harvinder at al (136), que utilizaron además radiación Gamma para su esterilización, sin aplicar soluciones antibióticas.

Del resto de estudios publicados en los que se utilizó membrana amniótica para la realización de miringoplastias, la mayoría utilizaron membrana fresca preservada en distintos medios (alcohol 70%, formolaldehído ph 7,4, solución con penicilina, glicerol) (163–166) o bien deshidratada (135,139).

6.2 Resultados acerca del uso de la membrana amniótica en las miringoplastias

En cuanto a su utilidad como material de injerto en la miringoplastia, se dispone de muy pocos estudios en la literatura. La mayoría de ellos son muy antiguos (entre 1954 y 1995) y varios aparecen citados en otros artículos, pero no son accesibles o simplemente disponen de un resumen (135,140,141,162,164,166–170). De los pocos que disponen de acceso al texto completo o bien mediante el resumen, la mayoría posee un tamaño muestral muy pequeño, alguno de hasta solo 7 pacientes (165), no explican el análisis estadístico realizado, ni detallan cómo llevaron a cabo el estudio, qué investigadores participaron, qué cirugía se realizó, ni qué variables determinaron a excepción de valorar si se obtuvo cierre de la perforación (163,165,166).

También llama la atención que, de la globalidad de los estudios, la mayoría fueron realizados fuera de Europa (Malasia, Corea, Egipto, Irán, Rusia, China, Pakistán, Brasil e Israel) (136–138,140,164–168) y cuatro de ellos en Estados Unidos (135,139,141,163).

Por todo esto, consideramos que es de gran interés realizar estudios controlados en nuestro medio para poder obtener una información más precisa y cercana de nuestro entorno.

Además, cabe destacar que tan solo hemos encontrado un estudio en la literatura respecto al uso de membrana amniótica en miringoplastias en modelos animales. Este estudio data de 1978 y fue llevado a cabo por Feenstra et al (171). Tan solo hemos conseguido acceso al resumen, en el cual describen la realización de miringoplastias en ratas tras realizar una perforación total (sin especificar la realización previa de un modelo de cronificación) utilizando distintos materiales (fascia autóloga, injertos alogénicos de membrana timpánica y colágeno, colágeno heterólogo y membrana amniótica heteróloga). Hicieron un estudio macroscópico y microscópico entre las 40 y 64 semanas, obteniendo los mejores resultados con el colágeno heterólogo y la membrana amniótica heteróloga. Sin embargo, no hemos encontrado más datos de los aquí mencionados.

Teniendo en cuenta la cantidad de estudios existentes destinados a conseguir un modelo murino de cronificación de perforaciones timpánicas estable (63,64,65,67–69,71–73,76, 77), llama la atención que no hayamos encontrado ninguna otra publicación con un modelo experimental para el cierre de dichas perforaciones.

Por este motivo y con la finalidad de obtener unos datos preliminares en un modelo animal antes de llevarlo a cabo en un modelo clínico humano, hemos diseñado un estudio de realización de miringoplastias en ratas Sprague Dawley. En nuestro estudio, hemos comenzado aplicando un modelo de cronificación de perforación timpánica con mitomicina C y dexametasona (77), y hemos realizado un ensayo prospectivo con un total de 57 oídos tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión. De estos, 34 fueron tratados con membrana amniótica y 23 pertenecieron al grupo control.

El primer artículo publicado en humanos sobre miringoplastia con membrana amniótica fue llevado a cabo por Schimpf WJ en 1954. Para ello, utilizó membrana amniótica fresca esterilizada con una autoclave y desecada posteriormente durante 48 horas. Incluyó a un total de 53 pacientes, obteniendo el cierre de la perforación en 48 de ellos (90,6%). En primer lugar, reavivó el borde de la perforación rascando con una sonda envuelta en un algodón empapado de ácido tricloroacético. Después, aplicó la membrana amniótica cubriendo la perforación timpánica, procurando que su cara estromal estuviera en contacto con la totalidad de la perforación y parte del tímpano periperforación. Previamente a su aplicación, la empapaba en un aceite mineral estéril para otorgarle mayor capacidad de adherencia. El tiempo transcurrido hasta lograr el cierre varió desde

7 hasta 210 días, con una media de 43 días. Además, obtuvo una mejoría auditiva importante con una ganancia de la vía aérea media de 18 dB, así como un cambio de un Rinne – prequirúrgico a un Rinne + postquirúrgico en el 75,6%.

Lyons et al (163) publicaron en 1977 el uso de membrana amniótica preservada con alcohol al 70% para distintos procedimientos quirúrgicos otológicos. En cuanto a su aplicación en miringoplastias, diferenció dos grupos. Por un lado, la aplicó a 35 pacientes con perforaciones timpánicas traumáticas, obteniendo excelentes resultados según cita, aunque sin especificar qué porcentaje. Por otro lado, la empleó en 20 pacientes con perforaciones secundarias a otitis media crónica, con una tasa de fracaso de más del 80%. De este segundo grupo, el único caso que tuvo éxito fue en un oído seco con una perforación muy pequeña.

En el mismo año, Jalisi M et al (164) describieron el uso de membrana amniótica fresca preservada en formolaldehído con pH 7,4 en un total de 10 pacientes, 2 de los cuales tenían una perforación pequeña y los otros 8 una perforación subtotal. Únicamente hemos encontrado acceso al resumen del artículo, donde narran un éxito en el cierre del 70%, y un cierre del GAP < 20 dB en el 71,42%.

Burgos H (162) describe brevemente en la revista de la Royal Society of Medicine, en 1983, el uso de membrana amniótica humana liofilizada para el tratamiento de perforaciones timpánicas y su uso en cavidades mastoideas. Refiere que han encontrado ventajas respecto al uso de membrana fresca, congelada o cultivada, aunque sin dar detalles. Consiguen su esterilización mediante radiación gamma. No da más datos.

Zohar Y et al (165) publicaron en 1987 el uso de membrana amniótica fresca en 7 pacientes para la realización de miringoplastias en perforaciones timpánicas medianas o subtotales. Para su uso, la membrana se desinfectó y conservó en una solución con penicilina a 4°C, durante un máximo de 12 horas. Tras la realización de un colgajo timpanomeatal, rellenaron la caja timpánica con Gelfoam ® impregnado en metilprednisolona, sobre el cual colocaron la membrana amniótica de modo que su cara estromal estaba en contacto con el colgajo timpanomeatal. Únicamente se cerraron 2 de las 7 perforaciones (29,6%). En los 5 casos en los que fracasó, no se encontraron restos de la membrana amniótica en las revisiones.

Nuestro principal problema, al igual que constataron Zohar et al, es la desaparición de la membrana amniótica en la mayoría de nuestras ratas. Además, en nuestro caso también desapareció en la mayoría de los casos el Cutanplast ® añadido en el grupo experimental o el empleado en el grupo control. Esto nos hace pensar que la desaparición no se debe exclusivamente a las características de la membrana amniótica, sino que factores externos ligados al comportamiento animal podrían influir, como puede ser el frecuente rascado ótico observado en nuestras ratas.

No hemos podido contabilizar el número exacto de casos en los que desaparece la membrana amniótica ya que, en ocasiones, hemos visto costras cubriendo la membrana timpánica o restos de cutanplast que no permitían valorar bien el tímpano, sin saber si permanecía la membrana amniótica. Si solo tenemos en cuenta los 7 pacientes en los que se logró el cierre de la perforación, vemos como en 3 de ellos (42,8%) había desaparecido el material (2 casos de MA y uno de cutanplast) el primer día de la revisión (Día 60), mientras que en 4 de ellos persistió material costroso hasta el día que se constató el cierre.

Por otro lado, Sitnikov VP et al (167) publican en 1992 un nuevo método para el cierre de perforaciones timpánicas amplias, realizando para ello una combinación de tres materiales distintos. Así, colocan una capa muy fina de cartílago autólogo (capa más interna), sobre la cual se aplica una capa de fascia temporal autóloga (capa intermedia), y se termina con una capa de membrana amniótica (capa más externa). Únicamente hemos conseguido acceso al resumen del artículo, en el cual hablan de éxito en una alta proporción de los injertos con importantes mejorías en la audición, sin embargo, no ofrecen más detalles.

Riskalla et al (166) describieron, en 1995, el uso en 43 pacientes de membrana amniótica tratada con hipoclorito de sodio y alcohol etílico conservada en glicerol puro, para el cierre de perforaciones timpánicas en timpanoplastias y timpanoplastias asociadas a mastoidectomía, con una tasa de cierre de 84,8% y 70% respectivamente. Además, describen una mejoría auditiva en el 65,7% de los casos, existiendo también un grupo menor de pacientes que no presentaron mejoría (25,7%) o incluso empeoramiento (8,6%).

En nuestro estudio, al tratarse de ratas, no era posible medir la audición de forma convencional con audiometrías, por lo que no disponemos de datos funcionales auditivos.

Hay dos artículos que hemos encontrado en nuestra búsqueda bibliográfica de los que no tenemos ningún dato, debido a no estar disponible siquiera el resumen. Fueron realizados por Catalano GB y Conticello S, el primero publicado en 1968 en italiano (170) y el segundo en 1969 en rumano (169).

Desde comienzos del siglo XXI, tan solo se han publicado 5 artículos relacionados con el uso de membrana amniótica para el cierre de perforaciones timpánicas.

Harvinder et al (136), en 2005, fueron los primeros en realizar un estudio prospectivo controlado con 50 pacientes para realización de miringoplastia comparando un grupo experimental con membrana amniótica (n20) y otro control con fascia temporal (n30). El porcentaje de cierre en el grupo experimental fue del 65%, mientras que en el grupo control de 56,7%. El motivo del fracaso en el primer grupo fue explicado por la presencia de una perforación residual en 4 casos, infección en 2 casos y lateralización del injerto en 1 caso. Por otro lado, en el grupo de la fascia, hubieron 6 casos de perforación residual, 4 casos de infección, 2 de desprendimiento del injerto y 1 de lateralización del injerto. Hicieron un análisis del éxito de cierre en función del tamaño de la perforación, obteniendo los mejores resultados en las perforaciones más pequeñas, existiendo un 100% de éxito en las perforaciones de pequeño tamaño en ambos grupos. Los grupos fueron desiguales, existiendo un mayor porcentaje de perforaciones medianas y subtotaes en el grupo con fascia respecto al de membrana amniótica, lo cual podría haber influido en el resultado global. En cuanto a la mejoría auditiva, observaron el cierre del GAP por debajo de 20 dB en el 95% de los casos con membrana amniótica y en el 73,33% de los casos con fascia temporal.

En nuestro caso, el grupo experimental estaba compuesto por 34 pacientes tratados con membrana amniótica (59,65%) y el grupo control por 23 pacientes tratados con Cutanplast® (40,35%). Esto supone un total de 57 pacientes en total tras aplicar criterios de exclusión, habiendo comenzado el estudio con 74 pacientes (17 excluidos).

El otro estudio en el que se compara un grupo experimental con membrana amniótica y otro control con fascia temporal, es el publicado en 2010 por Fouad et al (138). En este caso, los grupos fueron más equitativos, estando compuestos por 32 pacientes cada uno (64 en total). Observaron un porcentaje de cierre del 84,4% en el grupo de MA y del 87,5% en el de fascia temporal, sin diferencias estadísticamente significativas.

Comprobaron una relación con el tamaño de la perforación, obteniendo ambos grupos un éxito del 100% en las perforaciones pequeñas y de tan solo un 50% en las subtotaes. Por otro lado, encontraron diferencias significativas en el tiempo quirúrgico, siendo de 54,3 +/- 8,3 minutos en el grupo de MA y de 75,3 +/- 9,4 minutos en el de fascia temporal. Por último, la mejoría auditiva media en el GAP aéreo-óseo fue de 14,1 +/- 2,3 dB en el grupo de MA y de 13,7 +/- 4,6 en el de fascia temporal, sin diferencias estadísticamente significativas.

Nuestros resultados distan mucho de los anteriores, en el grupo de membrana amniótica se cerraron 5 perforaciones (14,7%), mientras que en el grupo control solo se cerraron 2 perforaciones (8,7%). Además, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (p 0,689).

Por otro lado, sí coincidimos con la presencia de un porcentaje de cierre mayor en las perforaciones pequeñas. En nuestro caso, podemos ver que de los 7 cierres que tuvieron lugar, 6 se correspondían con perforaciones pequeñas (85,7%) y 1 con una perforación mediana (14,3%), siendo estos datos estadísticamente significativos (p 0,000). Sin embargo, debido al pequeño tamaño muestral, no puede considerarse válida esta p.

Además, en nuestro estudio disponíamos de una mayoría de perforaciones grandes, con un total de 28 (49,1%), y una minoría de perforaciones pequeñas, con un total de 13 (22,8%). En cuanto a las perforaciones medianas, teníamos un total de 16 (28,1%). Consideramos que esto puede haber tenido repercusión en el pequeño porcentaje de cierre de perforaciones

Volviendo a los estudios sin grupo control, Mun SK et al (137) publican en 2008, en coreano, un artículo en el que mencionan la realización de miringoplastia con membrana amniótica a 14 pacientes. De estos, el origen de la perforación era debido a otitis media crónica en 4 casos, traumática en 6 casos y residual tras fracaso de miringoplastia previa con grasa en otros 4 casos. Se trataba de perforaciones centrales en todos los pacientes, descartando las marginales. Realizaron una técnica underlay para su colocación, rellenando la caja timpánica con Gelfoam® impregnado en antibiótico. Obtuvieron una tasa de éxito del 93% (13/14 pacientes), con una mejoría auditiva pasando de 13,3dB a 7,1 dB de media del GAP aéreo-óseo. La principal limitación de este estudio ha sido el idioma de la publicación.

En 2012, el grupo de Liu et al (168) publicó un estudio retrospectivo de 43 pacientes a los que se les realizó una miringoplastia endoscópica con membrana amniótica. El cierre de la perforación se consiguió en 41 pacientes (95,3%) y hubo una media de mejoría auditiva de la vía aérea de 10 dB. La utilizaron tanto en perforaciones centrales como en marginales. Por desgracia, no hemos obtenido acceso al texto completo y no disponemos de más detalles.

Griffith S (139) publicó en 2014 otro estudio sin grupo control, con un tamaño muestral de tan solo 14 pacientes. A diferencia de los estudios anteriores, en este caso se utilizó un aloinjerto compuesto por una membrana amniótica-coriónica deshidratada (hasta ahora, en el resto de estudios se utilizaba membrana amniótica que había sido previamente separada de la coriónica). Tan solo obtuvo éxito en el cierre de la perforación en 6 pacientes (42,9%). Creemos que esto está relacionado con la ausencia de criterios de exclusión, ya que, de los 8 casos de fracaso, 4 presentaban timpanoesclerosis y 2 eran niños. Además, se operaron dos pacientes que ya habían sido sometidos a una intervención otológica previa, obteniendo un cierre en el 50%. Otro de los pacientes presentaba un colesteatoma asociado. El tiempo medio quirúrgico fue de 13,3 +/- 0,10 minutos, que se aleja mucho de los 54,3 +/- 8,3 min descritos de Fouad et al (138).

Para finalizar, queremos mencionar dos nuevos estudios que hemos encontrado en la base de datos Cochrane y cuyos resultados aun no se han publicado. Uno de ellos se propuso en Estados Unidos en 2017 por Arnaldo L. Rivera (141) para comparar los resultados de la realización de timpanoplastia con membrana amniótica vs fascia de temporal. El otro fue propuesto por Mohammad Sadeh Bagheri (140) en 2018, Irán, con el mismo propósito de comparar la realización de timpanoplastias con membrana amniótica vs fascia de temporal. Como hemos dicho, aun no se han publicado los resultados.

6.3 Distinción de la cara estromal o epitelial de la membrana amniótica

En tan solo dos estudios se detalla el lado de la membrana amniótica que se ha aplicado sobre el tímpano. Además, llama la atención que sean de los más antiguos, el de Schrimpf de 1954 (135) y el de Zohar de 1987 (165). Ambos coincidieron con colocar la cara mesenquimal (estromal) de la membrana amniótica en contacto directo con el tímpano.

En todos los estudios publicados posteriormente no se menciona qué lado fue el tenido en cuenta para su colocación.

En nuestro estudio, la cara que pusimos en contacto con el tímpano fue la ectodérmica (epitelial). Nos decantamos por esta colocación basándonos en la literatura oftalmológica, en la cual describen el uso de la cara mesenquimal cuando la membrana amniótica sirve como injerto en casos de lesiones profundas con un defecto tisular importante, de modo que el borde estromal contacta o sustituye la matriz estromal del tejido ausente.

Por otro lado, describen su uso aplicando su borde epitelial como recubrimiento cuando el defecto es más superficial, ya que esta cara posee más factores de crecimiento y citoquinas que favorecen que las células epiteliales proliferen por debajo de ella, promoviendo así la regeneración epitelial (111)(154).

Dado el escaso espesor del tímpano, decidimos aplicar el borde epitelial de la membrana amniótica en contacto directo con el defecto timpánico con la intención de promover la regeneración timpánica.

6.4 Infecciones producidas en las miringoplastias realizadas con membrana amniótica

Son pocos los estudios en los que se describe el motivo de fracaso de la miringoplastia con membrana amniótica. Dentro de estos motivos, el principal suele ser la infección del oído tras la cirugía.

Schrimpf (135) describió la aparición de infecciones de repetición en 3 de los 53 pacientes que trató con membrana amniótica (5,6%).

Harvinder et al (136) hablan de 4 casos de infección en el grupo de fascia temporal (13,3%) y de 2 en el grupo de membrana amniótica (10%).

Fouad et al (138) diferencian, por un lado, las infecciones de herida y, por otro, los casos de otorrea. En el grupo de fascia temporal hablan de la infección de herida en el 12,5% de los pacientes y de otorrea en el 6,3%. En el grupo de membrana amniótica, describe un porcentaje de 9,4% tanto en la infección de herida como en la presencia de otorrea.

Por último, Griffith (139) documentó la presencia de otorrea en 2 de sus 14 pacientes (14,3%).

En nuestro caso tuvimos un porcentaje mayor de infecciones, habiendo 6 infecciones dentro del grupo experimental de membrana amniótica (17,6%) y 5 dentro del grupo control (21,7%), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,701$). Además encontramos una mayor presencia de infección en las perforaciones de mayor tamaño (72,7%), seguido de las de mediano tamaño (18,2%) y en menor cantidad en las de pequeño tamaño, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,208$).

A continuación, mostramos unas tablas resumen comparativas entre los distintos estudios (Tablas 23, 24 y 25).

ARTÍCULOS	1	2	3	4	5	6	7
Año	1954	1968	1969	1977	1977	1983	1987
Autores	Schrimpf W J	Catalano	Catalano	Lyons GD et al	Jalisi M et al.	Burgos H	Zohar Y et al
País	Estados Unidos	-	-	Estados Unidos	Pakistan	Reino Unido	Israel
Tamaño muestral	53	-	-	55	10	-	7
Casos / Controles	53/0	-	-	55/0	10/0	-	7/0
Tipo de membrana	Fresca secada 48 horas	-	-	Fresca preservada en alcohol 70%	Fresca preservada en formolaldehido ph 7,4	Liofilizada	Fresca preservada en solución con penicilina
Cara mesenquimal /ectodérmica de la membrana	Cara mesenquimal (estromal)	-	-	-	-	-	Cara mesenquimal (estromal)
Material grupo control	-	-	-	-	-	-	-
Material de soporte complementario	-	-	-	-	-	-	Gelfoam® impregnado en Depot-Medrol (metilprednisolona)
Vía de abordaje	Directo sobre tímpano: transcanalar						Underlay
Cirujano	-	-	-	-	-	-	-
Criterios inclusión/exclusión	1. Perforaciones centrales / No si marginales 2. Oídos secos al menos las últimas 2 semanas/ No si infección	-	-	1. Perforaciones timpánicas traumáticas: 35 2. Perforaciones secundarias a OMC: 20	-	-	1. Oídos sin otorrea activa
Mediciones	1. Control visual perforación 2. Audiometría 3. Acumetría	-	-	-	1. Control visual 2. GAP (¿audiometría?)	-	1. Control visual

Tamaño perforación	-	-	-	-	-	1. Peq.: 2 2. Subtotal: 8	-	-
Resultados	1. Cierre en 48/ 53 (90,6%) 2. Ganancia media VA: 18 dB 3. Rinne + 75,6%	-	-	-	1. Cierre en traumáticas: “excelente” 2. Cierre en OMC: 20%	-	-	1. Cierre en el 29,6%
Resultados en función de tamaño perforación	-	-	-	-	-	-	-	-

ARTÍCULOS		8	9	10	11	12
Año		1992	1995	2005	2008	2010
Autores		Sitnikov VP et al	Riskalla PE et al	Harvinder et al	Mun SK et al	Fouad T et al
País		Rusia	Brasil	Malasia	Corea	Egipto
Tamaño muestral		-	43	50	14	64
Casos / Controles		-	43/0	20/30	14/0	32/32
Tipo de membrana		-	Fresca conservada en glicerol	Liofilizada	¿?	Criopreservada
Cara mesenquimal /ectodérmica de la membrana		-	-	-	-	-
Material grupo control		-	-	Fascia temporal	-	Fascia temporal
Material de soporte complementario		-	-	-	¿Gelfoam® impregnado en antibiótico?	Gelfoam®
Vía de abordaje		-	-	Técnica underlay (transcanalar, endoaural o retroauricular)	¿Técnica underlay?	Técnica underlay retroauricular
Cirujano		-	-	Varios (¿nº?)	-	-
Criterios inclusión/exclusión		-	-	1. Perforaciones timpánicas por OMC secas >3 meses y con GAP auditivo. 2. Exclusión si otorrea, cirugía ótica previa, afectación oscilar o mastoidea.	1. ¿Perforaciones centrales? 2. ¿GAP < 20dB? 3. Ausencia de otorrea o problema oscilar	1. Perforaciones por OMC secas 2. Exclusión si otorrea, cirugía ótica previa, colesteatoma
Mediciones		-	1. Control visual 2. Audiometría	1. Control visual 2. Audiometría - UAM aéreo - UAM óseo - GAP aéreo-óseo medio	1. Control visual 2. Audiometría - GAP aéreo-óseo medio	1. Control visual 2. Audiometría - GAP aéreo-óseo medio 3. Tiempo quirúrgico (min)

Tamaño perforación	-	-	1. Pequeñas: < 2 cuadrantes (<50%): 8 MA / 5 FT 2. Medianas: 3 cuadrantes (50%-75%): 11 MA / 16 FT 3. Subtotales: 4 cuadrantes (>75% <100%): 1 MA / 9 FT 4. Totales: (100%): 0	-	1. Pequeñas: 5 MA / 6 FT 2. Medianas: 17 MA / 16 FT 3. Grandes: 8 MA / 8 FT 4. Subtotales: 2 MA / 2 FT
Resultados	-	1. Cierre en 35 (81,4%) 2. Mejoría auditiva: 65,7%	<u>Casos con MA</u> 1. Cierre perf.: 13 (65%) 2. Cierre GAP: 95% (19/20) <u>Casos con fascia</u> 1. Cierre perf.: 17 (56,7%) 2. Cierre GAP: 73,33% (22/30)	1. Cierre en 13 pacientes (93%) 2. Mejoría auditiva GAP medio de 13,3 a 7,1 dB.	<u>Casos con MA</u> 1. Cierre perf.: 27 (84,4%) 2. Mejoría media GAP: 14,1 +/- 2,3 dB 3. Tiempo quirúrgico medio: 54,3 +/- 8,3 min <u>Casos con fascia</u> 1. Cierre perf.: 28 (87,5%) 2. Mejoría media GAP: 13,7 +/- 4,6 dB 3. Tiempo quirúrgico medio: 75,3 +/- 9,4 min
Resultados en función de tamaño perforación	-	1. Cierre en timpanoplastia 84,8% 2. Cierre en timpanoplastia + mastoidectomía 70%	<u>Cierre con MA</u> 1. Peq.:100% 2. Med.:45,5% 3. Subtotal: 0% <u>Cierre con fascia</u> 1. Peq.:100% 2. Med.:62,5% 3. Subtotal: 22,2%	-	<u>Cierre con MA</u> 1. Peq.:100% 2. Med.:88,2,5% 3. Grand: 75% 4.Subtotal: 50% <u>Cierre con fascia</u> 1. Peq.:100% 2. Med.:93,8% 3. Grand:75% 4. Subtotal: 50%

ARTÍCULOS			13	14
Año			2012	2014
Autores			Liu Z et al	Griffith S
País			China	Estados Unidos
Tamaño muestral			43	14
Casos / Controles			43/0	14/0
Tipo de membrana			¿?	Amniótica-coriónica deshidratada (EpiFix®)
Cara mesenquimal /ectodérmica de la membrana			-	-
Material grupo control			-	-
Material de soporte complementario			-	Gelfoam® impregnado en suero fisiológico
Vía de abordaje			-	Transcanalar
Cirujano			-	Único
Criterios inclusión/exclusión			-	-
Mediciones			1. Control visual perforación 2. Audiometría	1. Control visual perforación 2. Audiometría 3. Tiempo quirúrgico (min)
Tamaño perforación			-	1. Peq (<25%): 9 2. Med (25-50%): 3 3. Grandes (>50%): 2
Resultados			1. Cierre en 41/ 43 (95,3%) 2. Ganancia media VA: 10 dB	1. Cierre en 6/ 14 (42,9%) 2. GAP auditivo medio: - Preqx: 23+/-10,1 dB - Postqx: 16,8+/-7,4 dB 3. Tiempo quirúrgico medio: 13,3 +/- 0,10 min
Resultados en función de tamaño perforación			-	-

Tablas 23, 24 y 25: Resumen de los artículos publicados sobre miringoplastia con membrana amniótica entre 1954 y 2014.

7. CONCLUSIONES

En base a los datos obtenidos en este trabajo podemos concluir:

1. La membrana amniótica no ha resultado eficaz para el cierre de perforaciones timpánicas cronificadas previamente en el modelo murino con mitomicina C y dexametasona.
2. No se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de cierre con membrana amniótica frente al grupo control con cutanplast®.
3. No se han observado diferencias significativas de cierre entre los distintos subgrupos realizados, lo que sugiere que la técnica quirúrgica no tiene impacto en el resultado.
4. El tamaño de la perforación tiene una relación inversamente proporcional al éxito de su cierre, obteniendo mejores resultados en las perforaciones pequeñas y siendo de pequeño tamaño el 85,7% de las perforaciones que se cerraron.
5. Hemos observado una mayor disminución del tamaño de la perforación al final del tratamiento en el grupo D (reavivar + membrana amniótica overlay + cutanplast externo y control con reavivar + cutanplast externo). Por el contrario, el grupo A fue el de mayor tamaño de la perforación al final del tratamiento (reavivar + membrana amniótica en diábolo y control con reavivar solo).
6. El uso de antibiótico previo al tratamiento no ha influido en el porcentaje de cierre ni en la presencia de infecciones.
7. Las perforaciones cerradas con membrana amniótica tienen mejor calidad histológica, con reparación más uniforme, mientras que las reparadas con cutanplast tienen mayor tejido conectivo y depósitos de calcio.

8. REFERENCIAS

1. Houari S, Aderdour L, Raji A. Anatomie tridimensionnelle de l'oreille. 2013;1-4.
2. Delas B, Dehesdin D. Anatomie de l'oreille externe. In: EMC - Oto-rhino-laryngologie. Elsevier Masson; 2008. p. 1-9.
3. Tran Ba Huy P. Otitis media crónica. Historia natural y formas clínicas. EMC - Otorrinolaringol. 2005;34(2):1-27.
4. de Juan Beltrán J, Virós Porcuna B, Orús Dotú C. Bases anatómicas del oído y el hueso temporal. In: SEORL-PCF, editor. Libro virtual de formación en ORL. 2009.
5. Lim DJ. Human tympanic membrane: An ultrastructural observation. Acta Otolaryngol. 1970 Sep 18;70(3):176-86.
6. Cordero Devesa A. Exploración otoendoscópica con luz de banda estrecha para el estudio de la vascularización de la membrana timpánica normal y con perforación. Universidad Alcalá de Henares; 2016.
7. Castagno LA, Lavinsky L. Cicatrizaçao da membrana timpânica na timpanocentese com laser de argônio comparado à técnica com microlanceta: estudo experimental em ratos. Rev Bras Otorrinolanringol. 2006;72(6):794-9.
8. Ruah CB, Schachern PA, Zeltermann D, Paparella MM, Yoon TH. Age-Related Morphologic Changes in the Human Tympanic Membrane: A Light and Electron Microscopic Study. Arch Otolaryngol Neck Surg. 1991;117(6):627-34.
9. Stenfors LE, Bloom GD, Hellström S. The tympanic membrane. Acta Otolaryngol. 1984;98(S418):28-30.
10. Berger G, Sachs Z, Sadé J. Histopathologic changes of the tympanic membrane in acute and secretory otitis media. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1996;105(6):458-62.
11. Hentzer E. Ultrastructure of the human tympanic membrane. Acta Otolaryngol. 1969;68(1-6):376-90.
12. Alberti PWRM. The blood supply of the incudostapedial joint and the lenticular process. Laryngoscope. 1963;73(5):605-28.
13. Naiberg JB, Proops DW, Hawke M. Thickness of the Migratory Epithelium of the External Auditory Canal. Arch Otolaryngol. 1984 Apr 1;110(4):253-7.
14. Litton WB. Epithelial migration over tympanic membrane and external canal. Arch Otolaryngol. 1963;77:254-7.
15. Robert W, Funnell J, Laszlo CA. A Critical Review of Experimental Observations on Ear-Drum Structure and Function. ORL. 1982;44(4):181-205.

16. Knutsson J, Von Unge M, Rask-Andersen H. Localization of progenitor/stem cells in the human tympanic membrane. *Audiol Neurotol*. 2011 May;16(4):263–9.
17. Lim D. Structure and function of the tympanic membrane: a review. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 1995;49:101–15.
18. Schmidt SH, Hellstrom S. Tympanic-membrane structure - New Views. A comparative study. *ORL*. 1991;53(1):32–6.
19. Hamberger CA, Wersall J. Vascular supply of the tympanic membrane and the ossicular chain. *Acta Otolaryngol*. 1964;57(S188):308–18.
20. Applebaum EL, Deutsch EC. An endoscopic method of tympanic membrane fluorescein angiography. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1986;95(5):439–43.
21. Netter FH, Götzens García V. Atlas de anatomía humana. 2ª ed. Barcelona: Masson; 1999.
22. Dauber W, Feneis H, Spitzer G. Nomenclatura anatómica ilustrada. 5ª ed. Barcelona: Masson; 2006.
23. Maria PLS, Redmond SL, Atlas MD, Ghassemifar R. Histology of the healing tympanic membrane following perforation in rats. *Laryngoscope*. 2010 Oct;120(10):2061–70.
24. Schmidt SH, Hellstrom S. Tympanic-membrane structure - New Views. A comparative study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 1991;53(1):32–6.
25. Stenfors LE, Carlsööuml; B, Salén B, Winblad B. Repair of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol*. 1980;90(1–6):332–41.
26. Hellström S, Spratley J, Eriksson PO, Pais-Clemente M. Tympanic membrane vessel revisited: A study in an animal model. *Otol Neurotol*. 2003 May;24(3):494–9.
27. Dolhi N, Weimer AD. Tympanic Membrane Perforations [Internet]. StatPearls Publishing. Treasure island; 2020 [cited 2021 Feb 8]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557887/?report=classic>
28. Pérez Delgado Silvia, José HTJ, Fraile Rodrigo L. Traumatismos del oído. Heridas. Conmoción laberíntica. Fracturas del hueso temporal. Secuelas. In: Libro virtual de formación en ORL. 2009th ed. 2009.
29. Selaimen FA, Rosito LPS, Silva MNL, Silva AL, Stanham V de S, Costa SS. Central versus marginal tympanic membrane perforations: does it matter? An analysis of 792 patients. *Acta Otolaryngol* [Internet]. 2020 Oct 29 [cited 2021 Feb

- 9];1–7. Available from:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00016489.2020.1831698>
30. Basterra ZM, Zubizarreta B, Algaba J, Hospital G, San Sebastián D. Otitis media crónica. Aspectos generales. Otitis media crónica simple. In: Libro virtual de formación en ORL. 2009.
31. Labatut Pesce T, Grañon CS, Rivas EM, Marco IC. Miringoplastias primarias. Resultados a los 2 años de seguimiento. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2009 Jan;60(2):79–83.
32. Gates GA, Klein JO, Lim DJ, Mogi G, Ogra PL, Pararella MM, et al. Recent advances in otitis media. Definitions, terminology, and classification of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl*. 2002 Mar 4;188(3_suppl):8–18.
33. Taboada Saavedra CS, López Ugalde AC, Jiménez Ponce F, Raya Santoyo SB, Ortiz Morales LA, Basurto Madero P. Eficacia de la fenitoína en el cierre de las perforaciones timpánicas experimentales en ratas Wistar. *An ORL Mex*. 2011;56(3):119–24.
34. Orji FT, Agu CC. Determinants of spontaneous healing in traumatic perforations of the tympanic membrane. *Clin Otolaryngol*. 2008 Oct;33(5):420–6.
35. Camnitz PS, Bost WS. Traumatic perforations of the tympanic membrane: Early closure with paper tape patching. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 1985;93(2):220–3.
36. Al-Obiedi SH. Spontaneous healing of traumatic perforations of the tympanic membrane. *Ann Coll Med*. 2009;35(1):26–32.
37. Lindeman P, Edström S, Granström G, Jacobsson S, von Sydow C, Westin T, et al. Acute Traumatic Tympanic Membrane Perforations: Cover or Observe? *Arch Otolaryngol Neck Surg*. 1987 Dec 1;113(12):1285–7.
38. Kronenberg J, Ben-Shoshan J, Wolf M. Perforated tympanic membrane after blast injury. *Am J Otol*. 1993 Jan;14(1):92–4.
39. Orji FT, Agu CC. Determinants of spontaneous healing in traumatic perforations of the tympanic membrane. *Clin Otolaryngol Off J ENT-UK ; Off J Netherlands Soc Oto-Rhino-Laryngology Cerv-fac Surg*. 2008 Oct;33(5):420–6.
40. Lou ZC, Tang YM, Yang J. A prospective study evaluating spontaneous healing of aetiology, size and type-different groups of traumatic tympanic membrane perforation. *Clin Otolaryngol [Internet]*. 2011 Oct [cited 2021 Feb 9];36(5):450–

60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-4486.2011.02387.x>
41. Gladstone H, Jackler R, Varav K. Tympanic membrane wound healing. An overview . *Otolaryngol Clin North Am*. 1995;28(5):913–32.
42. Kristensen S. Spontaneous Healing Of Traumatic Tympanic Membrane Perforations In Man: A Century Of Experience. *J Laryngol Otol*. 1992;106(12):1037–50.
43. Lou ZC, Lou ZH, Zhang QP. Traumatic tympanic membrane perforations: A study of etiology and factors affecting outcome. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg*. 2012;33(5):549–55.
44. Reijnen C, Kuijpers W. The healing pattern of the drum membrane . *Acta Otolaryngol Suppl*. 1971;278:1–74.
45. Leal-fernández ZS, Sainz-fuentes N, Ornelas-Aguirre JM, Lugo-machado JA. Factores Pronósticos Asociados al Éxito de Timpanoplastía en Niños Menores de 15 Años. *Rev Med Clin*. 2019;3:142–52.
46. Juhn SK, Paparella MM, Goycoolea M V., Kim CS, Giebink S. Pathogenesis of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* [Internet]. 1977 Jul 29 [cited 2021 Feb 10];86(4):481–92. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/000348947708600407>
47. Chong L-Y, Head K, Richmond P, Snelling T, Schilder AG, Burton MJ, et al. Topical versus systemic antibiotics for chronic suppurative otitis media. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2018 Jun 18 [cited 2021 Feb 10];2018(6). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD013053>
48. Verhoeff M, Van Der Veen EL, Rovers MM, Sanders EAM, Schilder AGM. Chronic suppurative otitis media: A review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2006 Jan;70(1):1–12.
49. World Health Organization. Chronic suppurative otitis media. Burden of Illness and Management Options. In Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
50. Fliss DM, Dagan R, Houry Z, Leiberman A. Medical management of chronic suppurative otitis media without cholesteatoma in children. *J Pediatr* [Internet]. 1990 Jun [cited 2021 Feb 10];116(6):991–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347605806663>
51. Arguedas A, Loaiza C, Herrera JF, Mohs E. Antimicrobial therapy for children

- with chronic suppurative otitis media without cholesteatoma. *Pediatr Infect Dis J*. 1994 Oct;13(10):878–82.
52. Tran Ba Huy P. Otitis media crónica. Historia natural y formas clínicas. *EMC - Otorrinolaringol*. 2005;34(2):1–27.
53. Vartiainen E. Results of surgical treatment for chronic noncholesteatomatous otitis media in the pediatric population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1992 Nov;24(3):209–16.
54. Ortiz Laredo N. Estudio comparativo del tratamiento quirúrgico de las perforaciones timpánicas con cartílago y con fascia en población pediátrica. *Universitat Autònoma de Barcelona - Facultat de Medicina*; 2015.
55. WULLSTEIN H. Theory and practice of tympanoplasty. *Laryngoscope*. 1956 Aug;66(8):1076–93.
56. Al-Ani RM, Al-Zubaidi MI, Lafi SA. Profile of aerobic bacteria and their antibiotic sensitivity in chronic suppurative otitis media in Al-Ramadi Teaching Hospital, Ramadi City, Iraq. *Qatar Med J*. 2021 Apr 29;2021(1):3–3.
57. De Miguel Martínez I, Del Rosario Quintana C, Bolaños Rivero M, Ramos Macías A. Etiología y consideraciones terapéuticas en otitis media crónica. Análisis de un período de 5 años. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2005 Dec 1;56(10):459–62.
58. Yamashita T. Histology of the tympanic perforation and the replacement membrane. *Acta Otolaryngol*. 1985;100(1–2):66–71.
59. Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol*. 1990;109(5–6):406–15.
60. Masutani H, Nakai Y, Sugita M, Ohashi K, Moriguchi M, Matsunaga K. Microvasculature of the tympanic membrane. *Acta Otolaryngol*. 1991;111(S486):99–104.
61. Spandow O, Hellström S, Dahlström M. Structural characterization of persistent tympanic membrane perforations in man. *Laryngoscope*. 1996;106(3):346–52.
62. Santa Maria PL, Atlas MD, Ghassemifar R. Chronic tympanic membrane perforation: A better animal model is needed. *Wound Repair Regen*. 2007 Jul;15(4):450–8.
63. Yucel OT. Topical use of mitomycin C in laser myringotomy: An experimental study in rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2000 Aug 31;54(2–3):93–6.
64. Poyrazoglu E, Cincik H, Gungor A, Gurpinar B, Yildirim S, Candan H. The effects

- of incisional myringotomy and CO2 laser myringotomy on rat tympanic membranes. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2004 Jun;68(6):811–5.
65. Castagno LA, Lavinsky L. Tympanic membrane healing in myringotomies performed with argon laser or microknife: an experimental study in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006;72(6):794–9.
66. NaderPour M, moghaddam YJ, peirovifar A, Mollajavadi R, Abbasi MM, Mohajeri D. Microscopic comparison of topical use of Mitomycin C and Fluorouracil on cold knife myringotomy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012 Jan 1;76(1):9–13.
67. Cincik H, Ozdemir T, Ekin EC, Dogru S, Gungor A, Poyrazoglu E. The effects of topical halofuginon on myringotomy in rats. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2008;139(2_suppl):147–147.
68. Haim G, Ephraim E, Ronen P, Haim S. Colchicine prolongs patency of myringotomy in an animal model. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2011 Apr;75(4):554–7.
69. Langston M, Grobman A, Goncalves S, Angeli SI. Animal model of chronic tympanic membrane perforation. *Anat Rec (Hoboken)*. 2020 Mar 1;303(3):619–25.
70. Truy E, Disant F, Morgon A. Chronic tympanic membrane perforation: an animal model. *Am J Otol*. 1995;16(2):222–5.
71. Kaftan H, Hosemann W. Topical application of mitomycin C before versus after myringotomy: An experimental study. *ORL*. 2006 Mar;68(2):73–6.
72. Estrem SA, Batra PS. Preventing myringotomy closure with topical mitomycin C in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;120(6):794–8.
73. Estrem SA, Baker TJ. Preapplication of Mitomycin C for Enhanced Patency of Myringotomy. *Otolaryngol Neck Surg*. 2000 Mar;122(3):346–8.
74. Jassir D, Odabasi O, Gomez-Marin O, Buchman CA. Dose-response relationship of topically applied mitomycin C for the prevention of laser myringotomy closure. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2003;129(5):471–4.
75. Jassir D, Buchman CA, Gomez-Marin O. Safety and efficacy of topical mitomycin c in myringotomy patency. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2001;124(4):368–73.
76. Kaftan H, Hosemann W. Topical application of mitomycin C in combination with dexamethasone: Effective delay of myringotomy closure. *ORL*. 2006

- Jun;68(4):185–8.
77. Esteban T, Atucha NM, Moraleda JM, García-Estañ J, Insausti CL, Moraleda-Deleyto J. Chronic model of tympanic perforation in rats with mitomycin C and dexamethasone. *J Otol*. 2019 Mar 1;14(1):12–6.
78. Banzer M. Disputo de auditione laesa. Rohrieri. 1640;104.
79. Itard J. Traité des maladies de l’oreille et de l’audition. Paris : Méquignon- Marvis; 1821. 542 p.
80. Deleau N. Extrait d’un ouvrage inédit intitulé Traitement des maladies de l’oreille moyenne qui engendrent la Surdit . Delaunay; 1830. 156 p.
81. Yearsley J. Mr. Yearsley’s New Mode of Treating Deafness. *Bost Med Surg J*. 1848 Sep 6;39(6):109–13.
82. Simpson JF. Joseph Toynbee - His contributions to otology. *Proc R Soc Med*. 1963;56:97–105.
83. Chu E, Jackier R. The Artificial Tympanic Membrane (1840–1910): From Brilliant... : Otology & Neurotology. *Otol Neurotol*. 2003 May;24(3):507–18.
84. Berthold E. Ueber myringoplastik. *Wien Med Bl*. 1878;26:627–39.
85. Wullstein H. Theory and practice of tympanoplasty. *Laryngoscope*. 1956;66(8):1076–93.
86. Bori Aiguabella M, Estrop  Torres M, T sner Nieto J, Escol n Gonz lvo N, Estrop  Navarro M. Actualizaci n en otitis media cr nica simple. *ORL-Arag n*. 2006;9(2):12–41.
87. House WF, Sheehy JL. Myringoplasty: Use of Ear Canal Skin Compared with Other Techniques. *Arch Otolaryngol*. 1961 Apr 1;73(4):407–15.
88. Rizer FM. Overlay versus underlay tympanoplasty. Part I: Historical review of the literature. *Laryngoscope* [Internet]. 1997 Dec [cited 2021 Mar 1];107(12 SUPPL. II):1–25. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1097/00005537-199712001-00001>
89. Tabb HG. Closure of perforations of the tympanic membrane by vein grafts. *Laryngoscope* [Internet]. 1960 Mar [cited 2021 Feb 24];70(3):271–286. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1288/00005537-196003000-00004>
90. Shea JJ. Vein Graft Closure of Eardrum Perforations. *Arch Otolaryngol*. 1960 Oct 1;72(4):445–7.
91. Olarieta Soto FJ, Antol -Candela Cano F, Harguindey Antol -Candela A.

- Miringoplastia con injerto doble medial y lateral. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2019 May 1;70(3):123–30.
92. Atkins J. Temporalis fascia used for closure of attic cavities and perforations of the tympanic membrane. *J Laryngol Otol.* 1964 Feb 29;78(2):124–7.
93. Quraishi MS, Jones NS. Day case myringoplasty using tragal perichondrium. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1995 Feb;20(1):12–4.
94. Rana AK, Sharma R, Sharma VK, Mehrotra A, Upadhyay D. Intraoperative tragal and conchal cartilage thickness: Comparative study for cartilage tympanoplasty. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg.* 2020 Nov 1;41(6):102690.
95. Khan MM, Parab SR. Average thickness of tragal cartilage for slicing techniques in tympanoplasty. *J Laryngol Otol.* 2015 May 21;129(5):435–9.
96. Zahnert T, Hüttenbrink KB, Mürbe D, Bornitz M. Experimental investigations of the use of cartilage in tympanic membrane reconstruction. *Am J Otol.* 2000 May;21(3):322–8.
97. Xing C, Liu H, Li G, Li J, Li X. Type 1 tympanoplasty in patients with large perforations: Comparison of temporalis fascia, partial-thickness cartilage, and full-thickness cartilage. *J Int Med Res.* 2020 Aug 1;48(8):030006052094514.
98. Moraleda Jiménez JM. La terapia celular en enfermedades no hematológicas: ¿sueño o realidad? *Rev Hematol Mex.* 2011;12(4):239–41.
99. Blanquer M, Pérez-Espejo MA, Martínez-Lage JF, Iniesta F, Martinez S, Moraleda JM. A surgical technique of spinal cord cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Methods.* 2010 Aug;191(2):255–7.
100. Insausti CL, Alcaraz A, García-Vizcaíno EM, Mrowiec A, López-Martínez MC, Blanquer M, et al. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound Repair Regen.* 2010 Jul;18(4):368–77.
101. Rahman A, Olivius P, Dirckx J, Von Unge M, Hulcrantz M. Stem cells and enhanced healing of chronic tympanic membrane perforation. *Acta Otolaryngol.* 2008;128(4):352–9.
102. Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Majado MJ, Castellanos G, et al. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol.* 2010 Jan;25(1):91–8.
103. Insausti CL, Blanquer M, Majado M, Insausti A, Moraleda Jiménez JM. Utilidad terapéutica potencial de las células madre de la membrana amniótica. *Rev Hematol*

- Mex. 2011;12 (4):276–86.
104. Ghanad I, Polanik MD, Trakimas DR, Knoll RM, Castillo-Bustamante M, Black NL, et al. A Systematic Review of Nonautologous Graft Materials Used in Human Tympanoplasty. *Laryngoscope*. 2021;131(2):392–400.
 105. Farrior JB. Incisions in tympanoplasty: anatomic considerations and indications. *Laryngoscope*. 1983 Jan;93(1):75–85.
 106. Lempert J. Improvement of hearing in cases of otosclerosis: a new, one stage surgical technic. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 1938 Jul 1;28(1):42–97.
 107. Gurr A, Sudhoff H, Hildmann H. Approaches to the Middle Ear. In: *Middle Ear Surgery*. Springer; 2006. p. 19–23.
 108. García De Pedro DF, Ruiz OM, Scola Pliego E. Técnicas quirúrgicas en otología. Conceptos generales. Vías de abordaje. Cirugía del oído medio: mastoidectomía y timpanoplastias. In: *Libro virtual de formación en ORL [Internet]*. Available from: <http://seorl.net/PDF/Otologia/020 - TÉCNICAS QUIRÚRGICAS EN OTOLOGÍA. CONCEPTOS GENERALES. VÍAS DE ABORDAJE. CIRUGÍA DEL OÍDO MEDIO MASTOIDECTOMÍA Y TIMPANOP.pdf?boxtype=pdf&g=false&>
 109. Nardone M, Sommerville R, Bowman J, Danesi G. Myringoplasty in simple chronic otitis media: Critical analysis of long-term results in a 1,000-adult patient series. *Otol Neurotol*. 2012 Jan;33(1):48–53.
 110. Olarieta Soto FJ, Antolí-Candela Cano F, Harguindey Antolí-Candela A. Double medial and lateral graft in myringoplasty. *Acta Otorrinolaringológica Española*. 2019;70(3):123–30.
 111. Gris Castellón Ó. Trasplante de membrana amniótica en patología de la superficie ocular. [Barcelona]: Universidad autónoma de Barcelona; 2004.
 112. Lecarpentier E, Fournier T, Guibourdenche J, Gil S, Tsatsaris V. La placenta humana. *EMC - Ginecol*. 2015 Sep;51(3):1–19.
 113. Moore KL, Torchia MG, Persaud T. *Desarrollo embrionario*. 10ª edició. Elsevier, editor. 2021.
 114. Bartels H, Wang T. Intercellular junctions in the human fetal membranes. A freeze-fracture study. *Anat Embryol (Berl)*. 1983 Jan;166(1):103–20.
 115. Fernández García K, Bonet Hernández LY, Rodríguez de Paz U, Gómez Castillo Z, Jareño Ochoa M, Andújkar Coba P. Amniotic membrane as a therapeutic option

- for the ocular surface. *Rev Cuba Oftalmol* [Internet]. 2012 [cited 2022 Feb 15];25(2):312–23. Available from: <http://scielo.sld.cu>
116. Elkhenany H, El-Derby A, Abd Elkodous M, Salah RA, Lotfy A, El-Badri N. Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge. Vol. 13, *Stem Cell Research and Therapy*. 2022.
117. García-López G, García-Castro IL, Avila-González D, Molina-Hernández A, Flores-Herrera H, Merchant-Larios H, et al. Las células del epitelio amniótico humano (CEAh) como posible fuente de células troncales (CT)osible fuente de células troncales (CT) GACETA MÉDICA DE MÉXICO ARTÍCULO DE REVISIÓN. *Gac Med Mex* [Internet]. 2015 [cited 2022 Feb 15];151:66–74. Available from: www.anmm.org.mx
118. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(7):1539–46.
119. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J*. 1910;15:307–96.
120. Stern M. The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated surfaces, substituing skin grafts: a preliminary report. *J Am Med Assoc*. 1913 Mar 29;60(13):973–4.
121. Rötth A de. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthalmol*. 1940 Mar 1;23(3):522–5.
122. Libera RD, Melo GB de, Lima A de S, Haapalainen EF, Cristovam P, Gomes JÁP. Assessment of the use of cryopreserved x freeze-dried amniotic membrane (AM) for reconstruction of ocular surface in rabbit model. *Arq Bras Oftalmol*. 2008;71(5):669–73.
123. Sapin V, Souteyrand G, Bonnin N, Gallot D, Blanchon L, Chiambaretta F. Utilisations thérapeutiques des membranes fœtales et de leurs cellules dérivées. *Gynecol Obstet Fertil*. 2011;39(6):388–90.
124. Jirsova K, Jones GLA. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting—a review. *Cell Tissue Bank*. 2017;18(2):193–204.
125. Shusko A, Hovanesian JA. Pterygium excision with conjunctival autograft and subconjunctival amniotic membrane as antirecurrence agents. *Can J Ophthalmol*.

- 2016;51(6):412–6.
126. Kersey JP, Vivian AJ. Mitomycin and amniotic membrane: A new method of reducing adhesions and fibrosis in strabismus surgery. *Strabismus*. 2008;16(3):116–8.
127. Talmi YP, Finkelstein Y, Zohar Y. Use of human amniotic membrane as a biologic dressing. *Eur J Plast Surg*. 1990 Jul;13(4):160–2.
128. Khademi B, Bahranifard H, Azarpira N, Behdoowi E. Clinical application of amniotic membrane as a biologic-dressing in oral cavity and pharyngeal defects after tumor resection. *Arch Iran Med*. 2013;16(9):2011–4.
129. Laurian N, Kalmanovitch M, Shimberg R. Amniotic graft in the management of severe epistaxis due to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Laryngol Otol*. 1979;93(6):589–95.
130. Gupta A, Kedige SD, Jain K. Amnion and chorion membranes: Potential stem cell reservoir with wide applications in periodontics. *Int J Biomater*. 2015;2015.
131. Nisolle M, Donnez J. Vaginoplasty using amniotic membranes in cases of vaginal agenesis or after vaginectomy. *J Gynecol Surg*. 1992;8(1):25–30.
132. Sugar M. The use of amnioplastin in the surgery of the ear. *J Laryngol Otol*. 1944;59(3):96–100.
133. Turan E, Onerci M, Hosal S. Use of lyophilized human amniotic membrane as lining the tympanic cavities. *J Islam Acad Sci*. 1990;3:1:66–9.
134. Shojaku H, Takakura H, Okabe M, Fujisaka M, Watanabe Y, Nikaido T. Effect of hyperdry amniotic membrane patches attached over the bony surface of mastoid cavities in canal wall down tympanoplasty. *Laryngoscope*. 2011;121(9):1953–7.
135. Schrimpf WJ. Repair of tympanic membrane perforations with human amniotic membrane: Report of fifty-three cases. *Ann Otol Rhinol ... Laryngol*. 1954;63(1):101–15.
136. Harvinder S, Hassan S, Sidek DS, Hamzah M, Samsudin A, Philip R. Underlay myringoplasty: Comparison of human amniotic membrane to temporalis fascia graft. *Med J Malaysia*. 2005 Jan 1;60:585–9.
137. Mun SK, Cho HS, Lee GH, Lee KH, Do YK, Hong YH. The Effect of the Amniotic Membrane on Treatment of Tympanic Membrane Perforation. *Korean J Otorhinolaryngol Neck Surg*. 2008;51(7):597–601.
138. Fouad T, Rifaat M, Buhaibeh Q. Utilization Of Amniotic Membrane Graft For

- Repair The Tympanic Membrane. Vol. 11, EJENTAS Egyptian Journal of ear, nose, throat and Allied Sciences. 2010. 31–34 p.
139. Griffith SH. Utilizing Dehydrated Human Amnion/Chorion Membrane Allograft in Transcanal Tympanoplasty. *Otolaryngology*. 2014 Mar 2;04(02):1–3.
140. Bagheri Baghdasht MS. Comparison Tympanoplasty With Membrane Amniotic and Autologous Fascia [Internet]. *ClinicalTrials.gov* U.S. National Library of Medicine. Baqiyatallah, Iran; 2018 [cited 2022 May 10]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03569969>
141. Rivera AL. Hearing Results and Post Surgical Outcomes Using Amniotic Membrane Allograft vs. Fascia for Tympanoplasty - [Internet]. *ClinicalTrials.gov*. U.S. National Library of Medicine. Missouri - Columbia; 2017 [cited 2022 May 10]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03028272>
142. Dekaris I, Gabrić N. Preparation and preservation of amniotic membrane. *Dev Ophthalmol*. 2009;43:97–104.
143. Hossain L, Diba F, Siddika A, Adnan MH. Human Amniotic Membrane Preparation , Preservation and Clinical Application Using Various Techniques for the Treatment of Ophthalmic Dysfunctions. *Preprints*. 2018;(October):1–26.
144. López Valladares M. Estudio de tres diferentes métodos de preparación y conservación de la membrana amniótica para usos oftalmológicos. *Facultad de Medicina Santiago de Compostela*; 2008.
145. Mejía LF, Acosta C, Santamaría JP. Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea*. 2000 May;19(3):288–91.
146. Uçakhan ÖÖ, Köklü G, Firat E. Nonpreserved human amniotic membrane transplantation in acute and chronic chemical eye injuries. *Cornea*. 2002;21(2):169–72.
147. Adds PJ, Hunt CJ, Dart JKG. Amniotic membrane grafts, “fresh” or frozen? A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(8):905.
148. Lee SH, Tseng SCG. Amniotic Membrane Transplantation for Persistent Epithelial Defects With Ulceration. *Am J Ophthalmol*. 1997 Mar 1;123(3):303–12.
149. Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol*. 1998 Mar 1;82(3):235–40.

150. Rodríguez-Ares MT, Touriño R, López-Valladares MJ, Gude F. Multilayer amniotic membrane transplantation in the treatment of corneal perforations. *Cornea*. 2004 Aug;23(6):577–83.
151. Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology*. 1999 Aug 1;106(8):1504–11.
152. Pegg DE. Long term preservation of cells and tissues: a review. *J Clin Pathol*. 1976;29(4):271–85.
153. Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med*. 2002;20(1):5–13.
154. Lacorzana-Rodríguez J, García-Serrano JL, Gálvez Prieto-Moreno C, Castillo-Rodríguez S, Lucena-Martín JA, Pozo-Jiménez I. Amniotic membrane, review of its ophthalmic use and results in the last five years (2013-2017) in Granada. Preliminary study. *Actual Medica*. 2018;103(804):82–6.
155. BOE (2005) Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE 252. 2005 Oct 21;34367–91.
156. BOE (2007) Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. BOE 268. 2007 Nov 8;45914–20.
157. Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de Septiembre, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. . 2010 Oct 20;
158. ULAM. Guidelines on Anesthesia and Analgesia in Rats. Unit for Laboratory Animal Medicine. University of Michigan; 2022.
159. Trelford JD, Trelford-Sauder M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol*. 1979 Aug 1;134(7):833–45.
160. Rao TV, Chandrasekharam V. Use of dry human and bovine amnion as a biological dressing. *Arch Surg*. 1981;116(7):891–6.
161. Rodríguez-Ares MT, López-Valladares MJ, Touriño R, Vieites B, Gude F, Silva MT, et al. Effects of lyophilization on human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol*. 2009 Jun;87(4):396–403.
162. Burgos H, Sergeant RJ. Lyophilized human amniotic membranes used in

- reconstruction of the ear. J R Soc Med. 1983 May;76(5):433.
163. Lyons GD, Dyer RF, Ruby JR. Morphologic analysis of tympanic membrane grafts. Laryngoscope. 1977 Oct 1;87(10):1705–9.
164. Jalisi M, Iqbal K, Ashrafi Ashmed K. The human amniotic membrane as a graft material in tympanoplasty. Pakistan J Otolaryngol. 1997;13:11–2.
165. Zohar Y, Talmi YP, Finkelstein Y, Shvili Y, Sadov R, Laurian N. Use of human amniotic membrane in otolaryngologic practice. Laryngoscope. 1987 Aug;97(8 Pt 1):978–80.
166. Riskalla P, Testa J, Suzuki F, Aguiar J, Mangabeira Albernaz P. The use of homogeneous human amniotic tissue to repair tympanic membrane perforations. Rev Hosp São Paulo Esc Paul Med. 1995;6(3/4):91–5.
167. Sitnikov VP, Kin TI, Aleksandrovskii IK. A method of myringoplasty used in patients with extensive defects of the tympanic membrane. Vestn Otorinolaringol. 1992;3:31–3.
168. Liu Z, Wang R, Gao P, Sun Y, Wu W, Zhong L. Observation of the efficacy of endoscopic myringoplasty with homoplastic amniotic membrane. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2012 Oct;19:882–3.
169. Catalano G, Conticello S. The long-term results of myringoplasty with amnion graft. Otorinolaryngologie. 1969;14(2):97–102.
170. Catalano G, Conticello S. Repair of loss of substance of the tympanic membrane with fragments of amnion. Clin Otorinolaringoiatr. 1968;20(1):53–62.
171. Feenstra L, Baarsma R, Feijen J, Houthoff H. Experimental myringoplasty. J Bioeng. 1978 Jun;2((3-4)):251–7.

9. ANEXOS

ANEXO 1

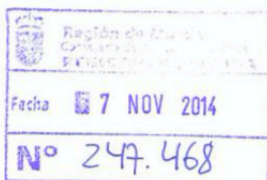


Región de Murcia
Consejería de Agricultura y Agua
Dirección General de Ganadería y Pesca

Servicio de Sanidad Animal

Plaza Juan XXIII s/n
30008 Murcia

T. 012
T.968.368913
F. 968 362863
F.968.394378
www.carm.es/cagric



JOSE MARIA MORALEDA JIMÉNEZ
SERVICIO DE HEMATOLOGÍA
HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO
VIRGEN DE LA ARRIXACA

RESOLUCION

Vista la solicitud presentada con fecha 28/09/2014 y nº de registro de entrada 3000Nº201400493930, para la autorización de la realización de un proyecto de investigación con animales presentada por D. Jose Maria Moraleda Jiménez, como responsable del mismo.

Vista la propuesta del proyecto denominado: "Modelo de cronicidad de perforaciones timpánicas en ratas".

Visto el informe favorable del comité ético del establecimiento usuario con código REGA ES300305440012.

Visto el resumen no técnico del proyecto.

Visto el resultado favorable de la evaluación del proyecto por el órgano habilitado "Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Murcia".

Visto que en dicha evaluación se clasifica el proyecto como Tipo II y se indica que no es necesario llevar a cabo la evolución retrospectiva del mismo.

Visto que en la evaluación del proyecto se indica que hay personal participante en las tareas de investigación, que no dispone de la capacitación previa adecuada, pero que será supervisada por Jose Maria Moraleda Jiménez, que sí dispone de la capacitación.

Visto el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Visto el Informe emitido por el Jefe del Servicio de Sanidad Animal el 3 de noviembre de 2014.

Considerando la competencia que tiene atribuida esta Dirección General sobre la base de lo dispuesto en el Decreto 26/2011, de 25 de febrero, por el que se establece la estructura orgánica de la Consejería de Agricultura, y Agua y lo dispuesto en el Decreto de Gobierno nº 42/2014, de 14 de abril, por el que se establecen los Órganos Directivos de la Consejería de Agricultura y Agua, y con independencia de otras actuaciones que esta u otra Administración puedan emprender, esta Dirección General

Proyecto de investigación A1320141101



Región de Murcia
Consejería de Agricultura y Agua

Dirección General de Ganadería y Pesca

Servicio de Sanidad Animal

Plaza Juan XXIII s/n
30008 Murcia

T. 012
T.968.368913
F. 968 362863
F.968.394378
www.carm.es/cagric

RESUELVE

Conceder autorización a D. Jose Maria Moraleda Jiménez, para la realización del proyecto solicitado, como responsable y usuario del mismo, asignándole el código de identificación **Nº A1320141101**, teniendo esta autorización una validez que se corresponderá con la duración prevista en su memoria, con un máximo de cinco años, siempre y cuando no se produzca una modificación relevante en dicho procedimiento, en cuyo caso sería necesario efectuar una nueva solicitud de autorización a la autoridad competente.

El proyecto se llevará a cabo en el establecimiento usuario con código REGA ES300305440012.

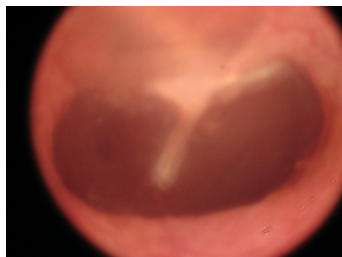
Se autoriza al personal mencionado en la evaluación del proyecto, sin capacitación suficiente, a participar en los procedimientos dentro del marco del proyecto citado siempre que se trabaje bajo la supervisión del investigador D. Jose Maria Moraleda Jiménez, que si dispone de la capacitación.

Lo que en cumplimiento del Art. 58 de la Ley de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Común (Ley 30/1992, de 26 de noviembre) se le NOTIFICA, significándole que contra dicha RESOLUCIÓN cabe Recurso de Alzada ante el Excmo. Sr. Consejero de Agricultura y Agua en el plazo de UN MES desde la recepción de la presente notificación, sin perjuicio de poder ejercitar, en su caso, cualquier otro que se estime pertinente.

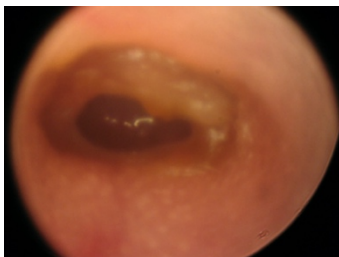
Murcia, a 3 de noviembre de 2014
La Directora General de Ganadería y Pesca



Carmen T. Morales Cuenca

ANEXO 2**FOTOGRAFÍAS****Paciente 1: Rata 1 – OI (Grupo A: Control)**

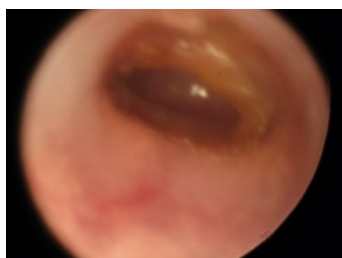
Día 0 (Íntegro)



Día 56



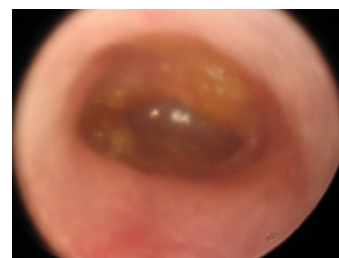
Día 60



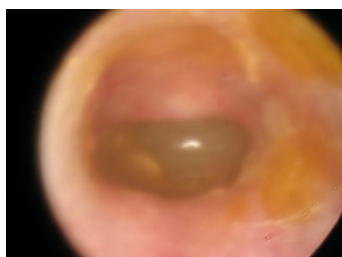
Día 64



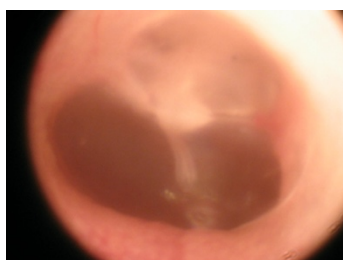
Día 68



Día 72



Día 76 (Infección)

Paciente 2: Rata 1 – OD (Excluido)

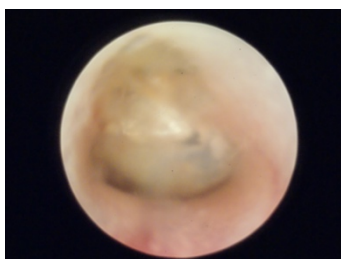
Día 0 (Íntegro)



Día 56 (Cerrado espontáneamente)

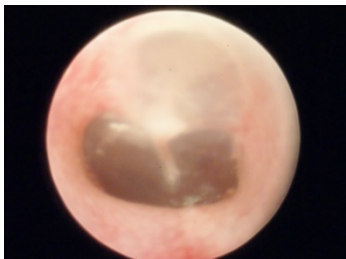
Paciente 3: Rata 2 – OI (Excluido)

Día 0 (Íntegro)



Día 56 (Cerrado espontáneamente)

Paciente 4: Rata 2 – OD (Grupo A: Membrana amniótica)



Día 0 (Íntegro)



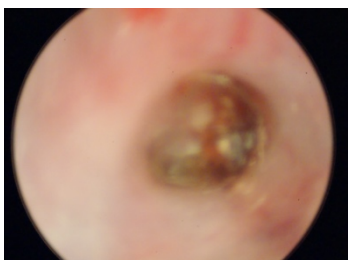
Día 56



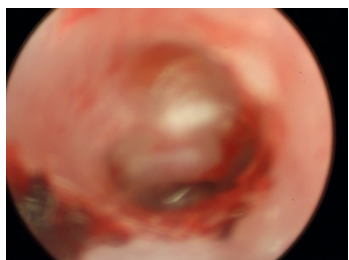
Día 56 tras reavivar



Día 56 tras MA



Día 60



Día 64



Día 68



Día 72

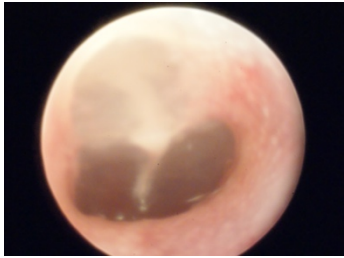


Día 76

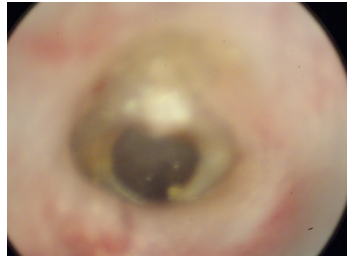


Día 76 tras retirar costra

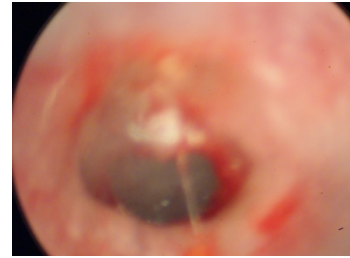
Paciente 5: Rata 3 – OI (Grupo A: Membrana amniótica)



Día 0 (Íntegro)



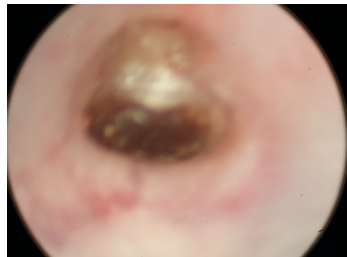
Día 56



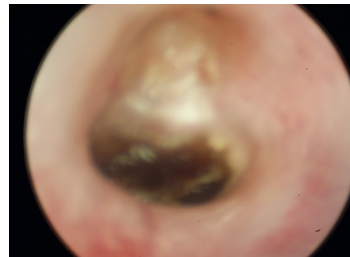
Día 56 tras reavivar



Día 56 tras MA



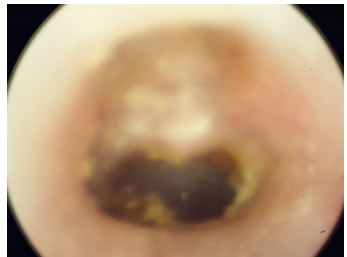
Día 60



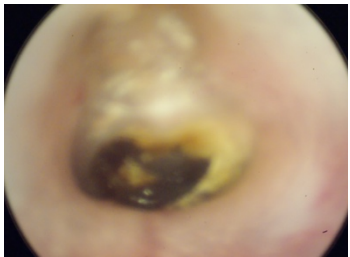
Día 64



Día 68



Día 72

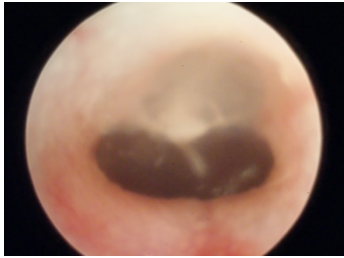


Día 76



Día 76 tras retirar costra

Paciente 6: Rata 3 – OD (Grupo A: Membrana amniótica)



Día 0 (Íntegro)



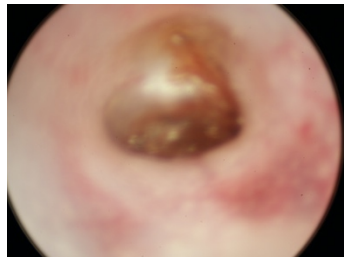
Día 56



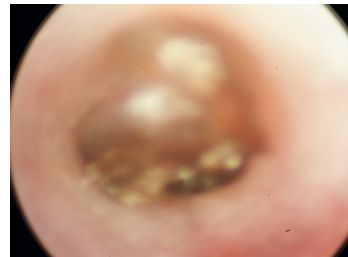
Día 56 tras reavivar



Día 56 tras MA



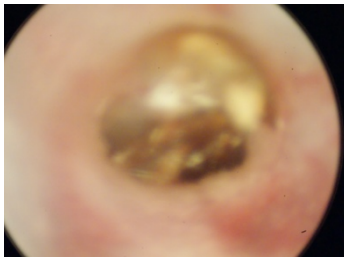
Día 60



Día 64



Día 68



Día 72

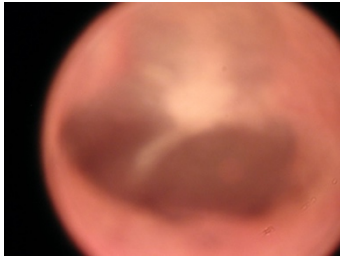


Día 76

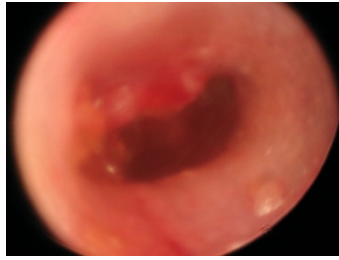


Día 76 tras retirar costra

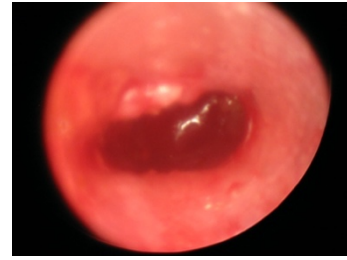
Paciente 7: Rata 4 – OI (Grupo A: Control)



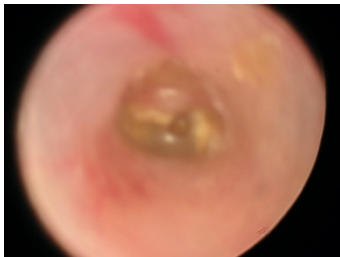
Día 0 (Íntegro)



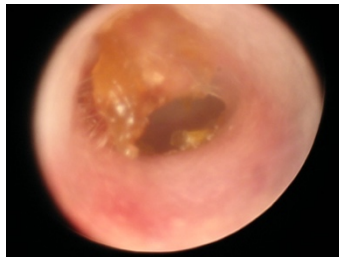
Día 56



Día 56 tras reavivar



Día 60 (Infección)



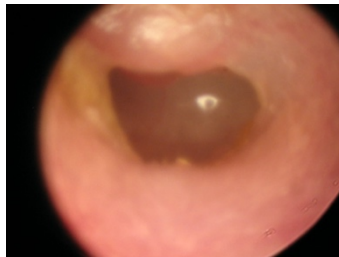
Día 64



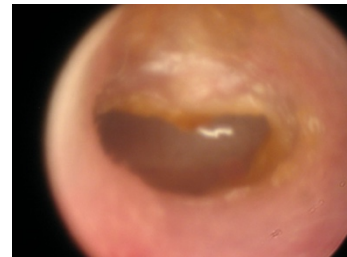
Día 68



Día 72

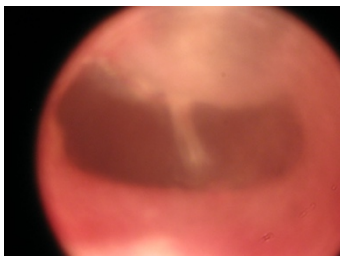


Día 76

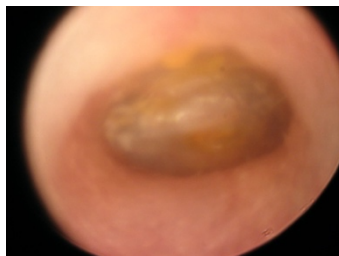


Día 76 tras retirar costra

Paciente 8: Rata 4 – OD (Excluido)

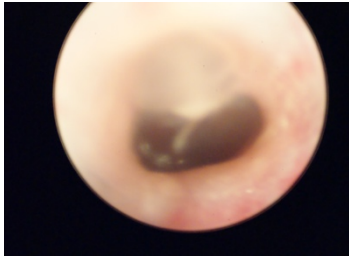


Día 0 (Íntegro)



Día 56 (Cerrado espontáneamente)

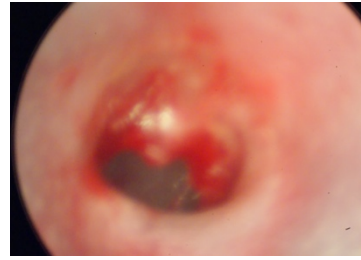
Paciente 9: Rata 5 – OI (Grupo A: Membrana amniótica)



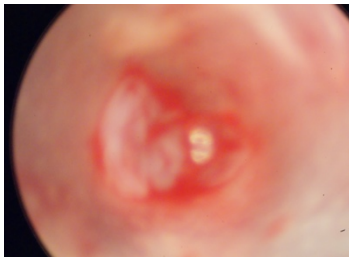
Día 0 (Íntegro)



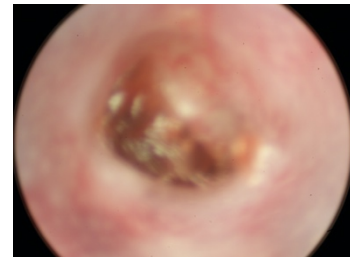
Día 56



Día 56 tras reavivar



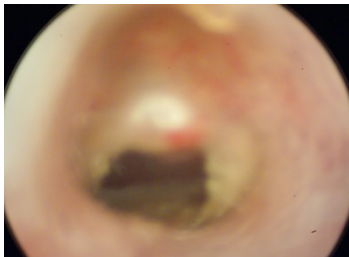
Día 56 tras MA



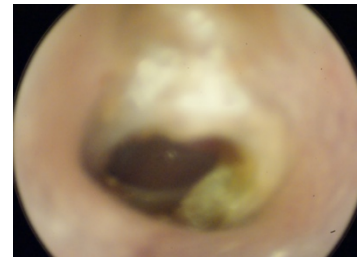
Día 60



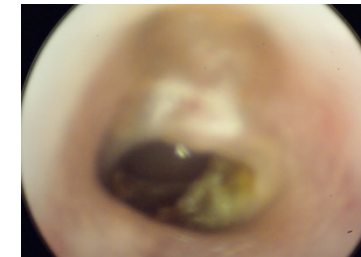
Día 64



Día 68



Día 72



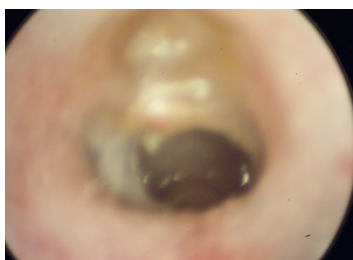
Día 76



Día 76 tras retirar costra

Paciente 10: Rata 5 – OD (Grupo A: Membrana amniótica)

Día 0 (Íntegro)



Día 56



Día 56 tras reavivar



Día 56 tras MA



Día 60



Día 64



Día 68



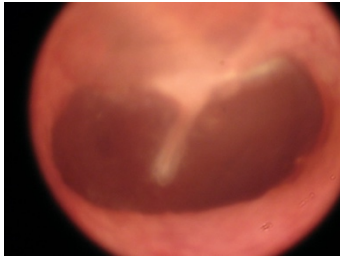
Día 72



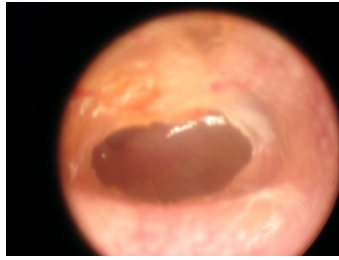
Día 76



Día 76 tras retirar costra

Paciente 11: Rata 6 – OI (Grupo A: Control)

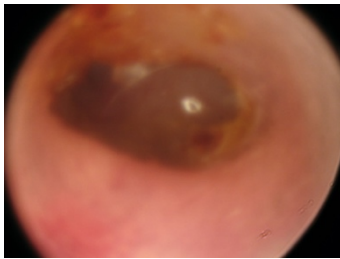
Día 0 (Íntegro)



Día 56



Día 56 tras reavivar



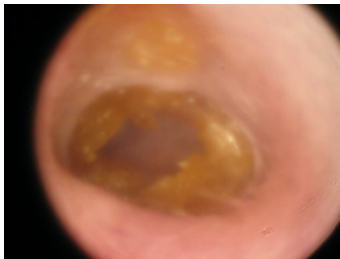
Día 60



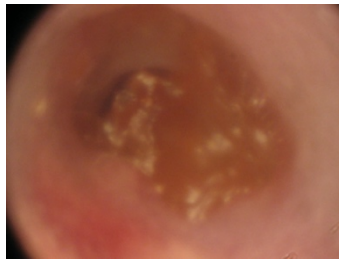
Día 64



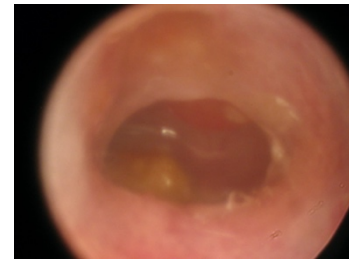
Día 68



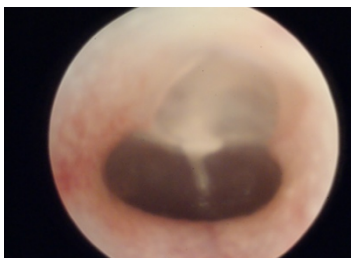
Día 72



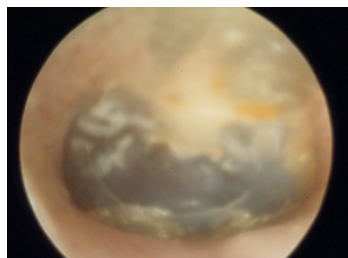
Día 76



Día 76 tras retirar costra

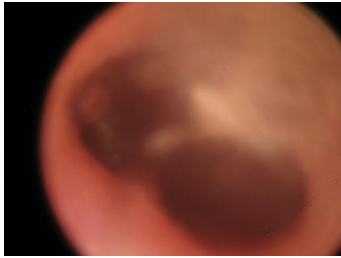
Paciente 12: Rata 6 – OD (Excluido)

Día 0 (Íntegro)

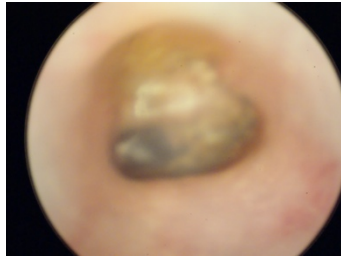


Día 56 (Cerrado)

Paciente 13: Rata 7 – OI (Excluido)

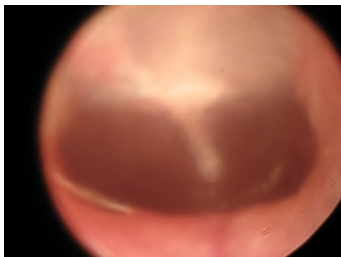


Día 0 (Íntegro)

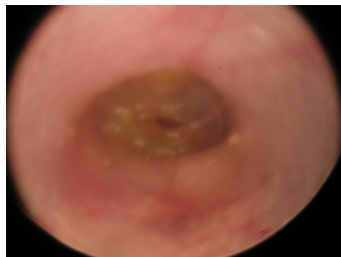


Día 56 (Cerrado)

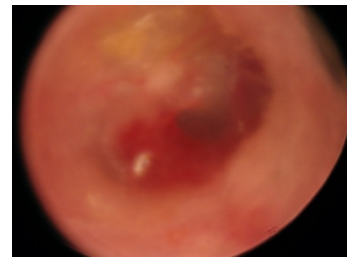
Paciente 14: Rata 7 – OD (Grupo A: Control)



Día 0 (Íntegro)



Día 56



Día 56 tras reavivar



Día 60



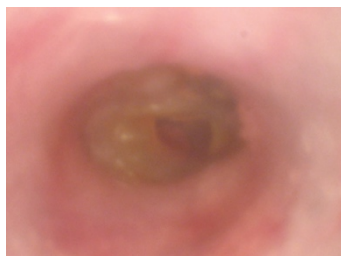
Día 64



Día 68

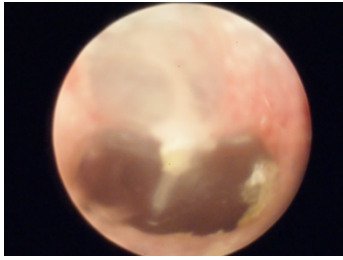


Día 72

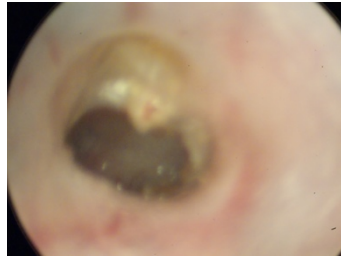


Día 76

Paciente 15: Rata 8 – OI (Grupo A: Membrana amniótica)



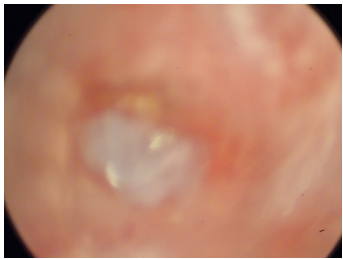
Día 0 (Íntegro)



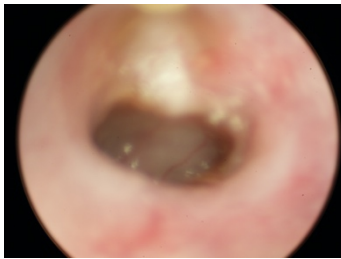
Día 56



Día 56 tras reavivar



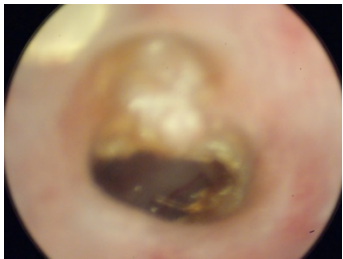
Día 56 tras MA



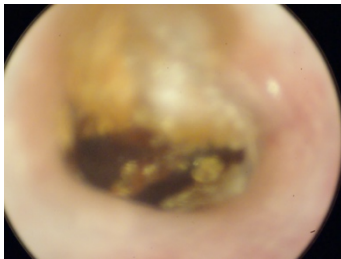
Día 60



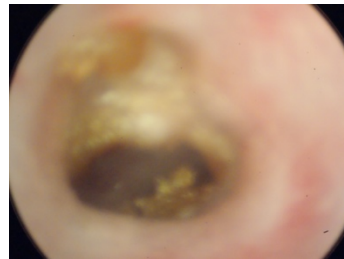
Día 64



Día 68



Día 72

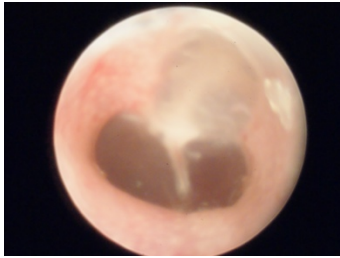


Día 76

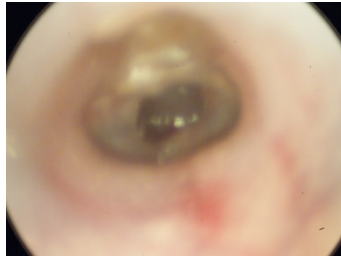


Día 76 tras retirar costra

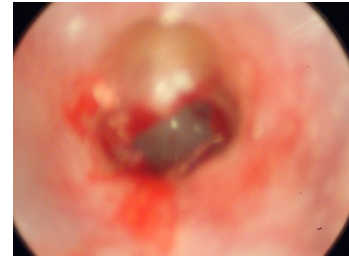
Paciente 16: Rata 8 – OD (Grupo A: Membrana amniótica)



Día 0 (Íntegro)



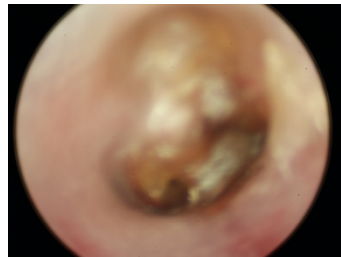
Día 56



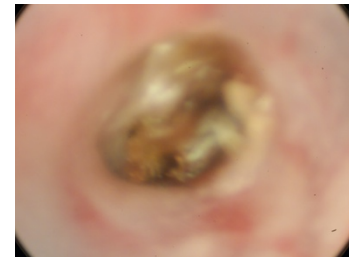
Día 56 tras reavivar



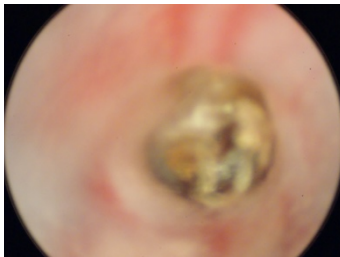
Día 56 tras MA



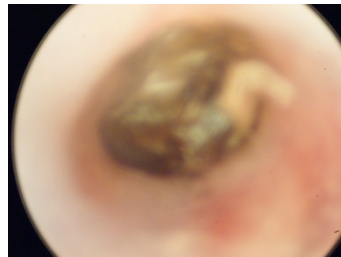
Día 60



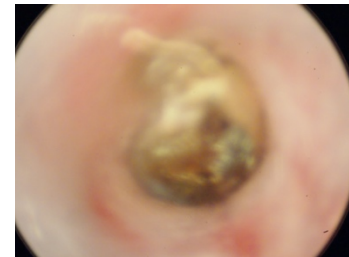
Día 64



Día 68



Día 72

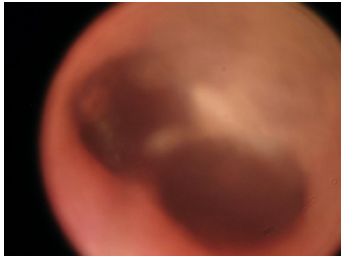


Día 76

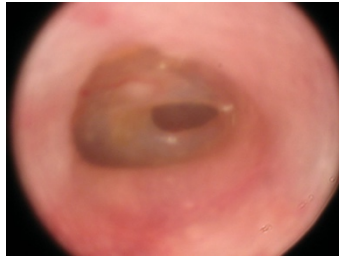


Día 76 tras retirar costra

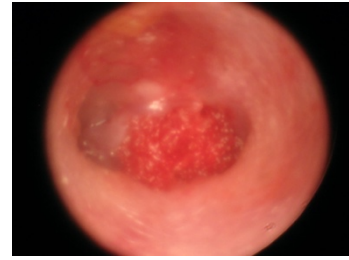
Paciente 17: Rata 9 – OI (Grupo B: Membrana amniótica) → *CERRADO*



Día 0 (Íntegro)



Día 56



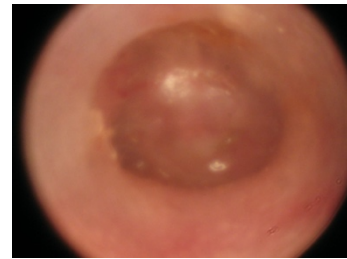
Día 56 tras MA + cutanplast



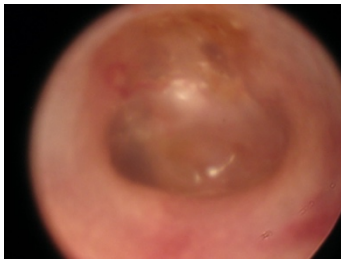
Día 60



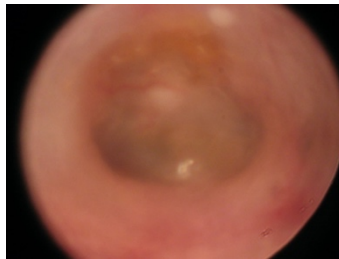
Día 64



Día 68 (Cerrado)

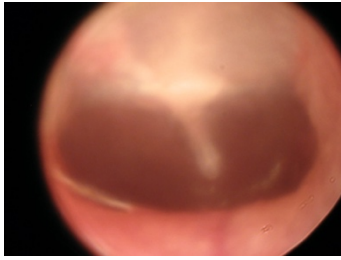


Día 72

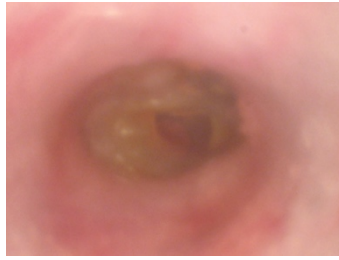


Día 76

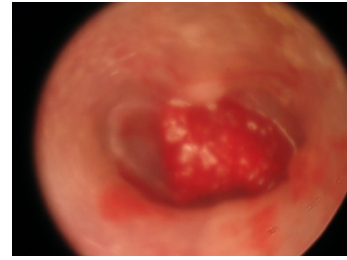
Paciente 18: Rata 9 – OD (Grupo B: Control)



Día 0 (Íntegro)



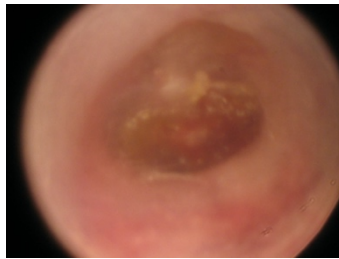
Día 56



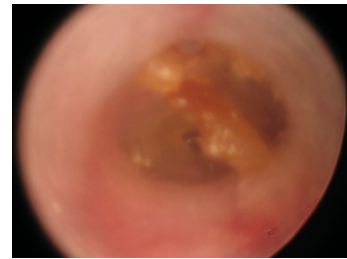
Día 56 tras cutanplast



Día 60



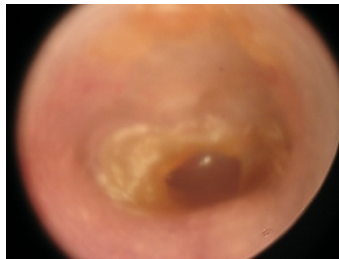
Día 64



Día 68



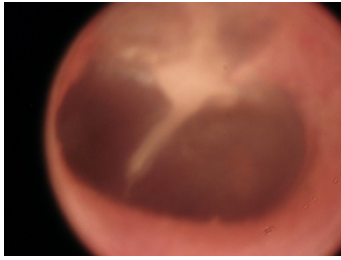
Día 72



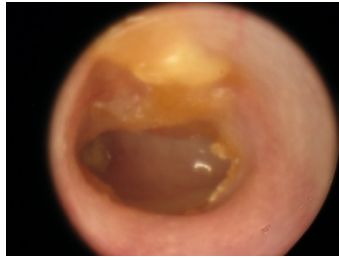
Día 76



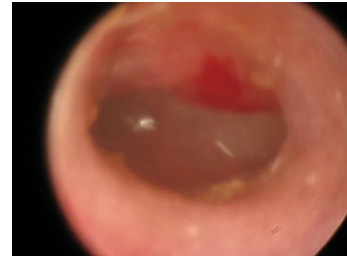
Día 76 tras retirar costra

Paciente 19: Rata 10 – OI (Grupo B: Membrana amniótica)

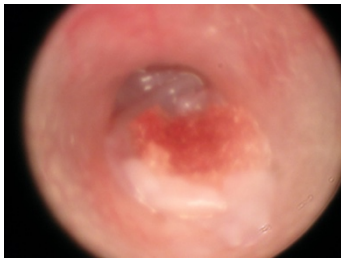
Día 0 (Íntegro)



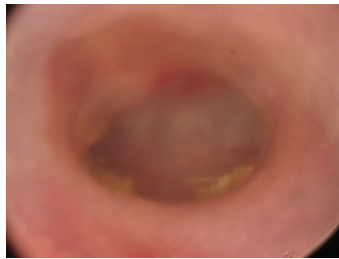
Día 56



Día 56 tras reavivar



Día 56 tras MA + cutanplast



Día 60



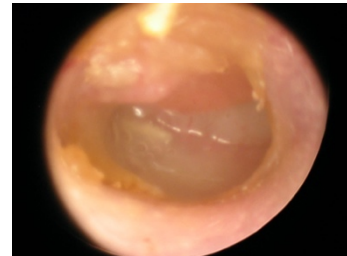
Día 64



Día 68

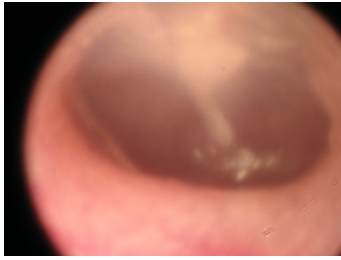


Día 72

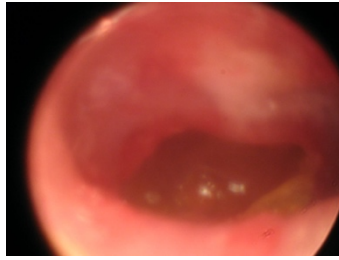


Día 76 (Infección)

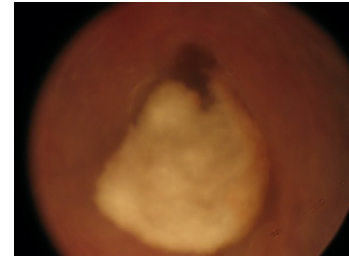
Paciente 20: Rata 10 – OD (Grupo B: Membrana amniótica)



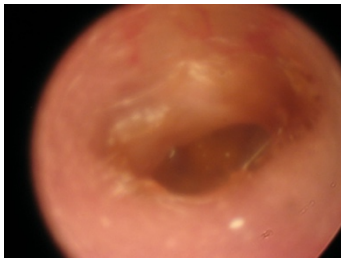
Día 0 (Íntegro)



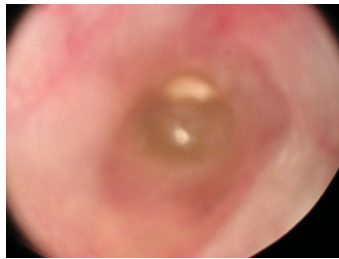
Día 56



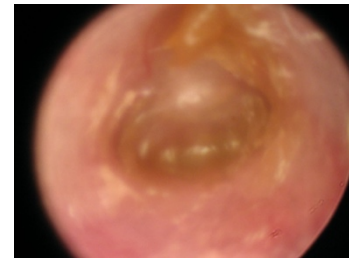
Día 56 tras MA + cutanplast



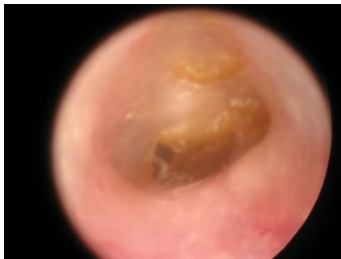
Día 60



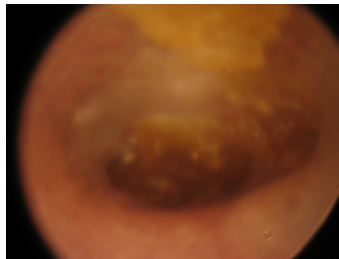
Día 64 (Infección)



Día 68



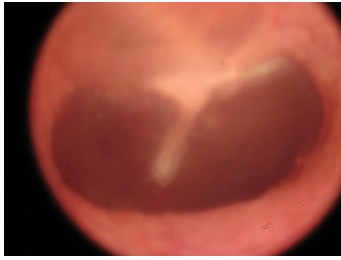
Día 72



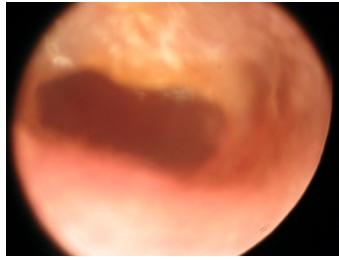
Día 76



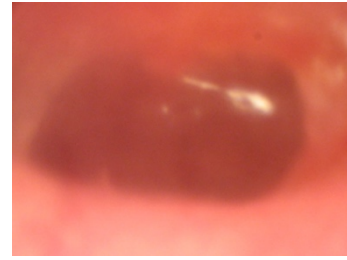
Día 76 tras retirar costra

Paciente 21: Rata 11 – OI (Grupo B: Control)

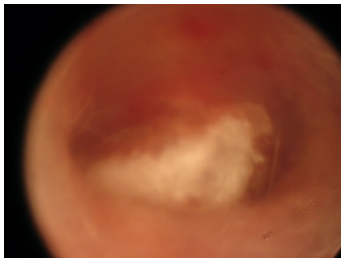
Día 0 (Íntegro)



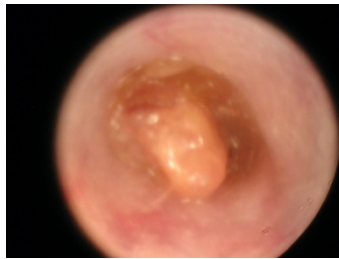
Día 56



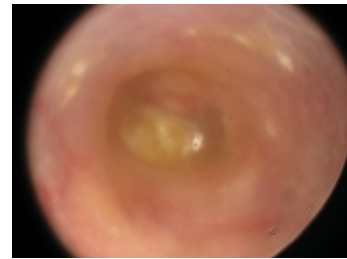
Día 56 tras reavivar



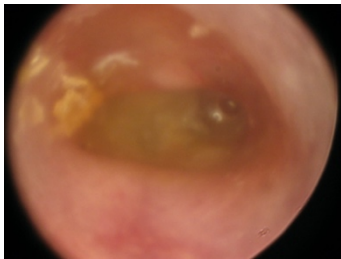
Día 56 tras cutanoplast



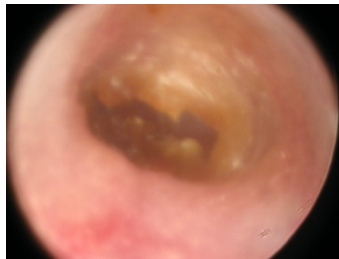
Día 60



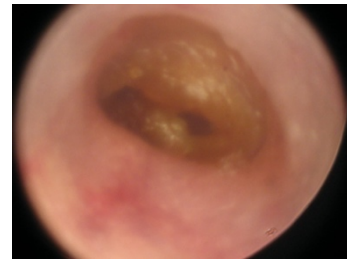
Día 64 (Infección)



Día 68



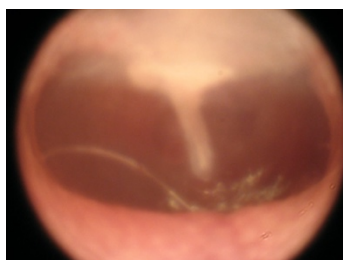
Día 72



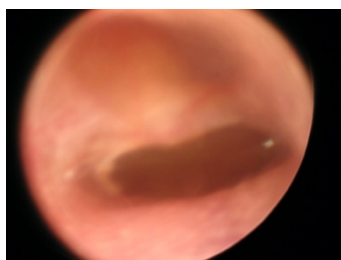
Día 76



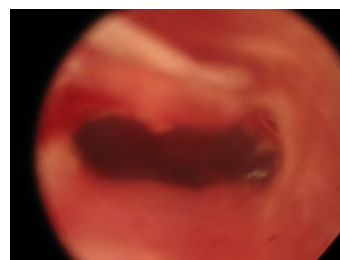
Día 76 tras retirar costras

Paciente 22: Rata 11 – OD (Grupo B: Control)

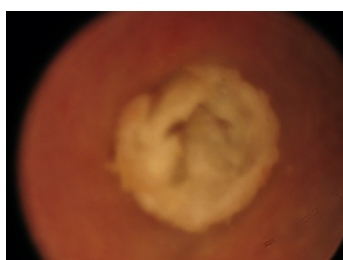
Día 0 (Íntegro)



Día 56



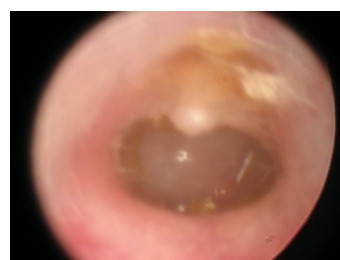
Día 56 tras reavivar



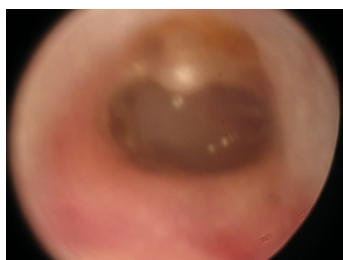
Día 56 tras cutanplast



Día 60



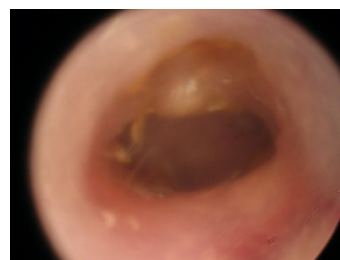
Día 64



Día 68

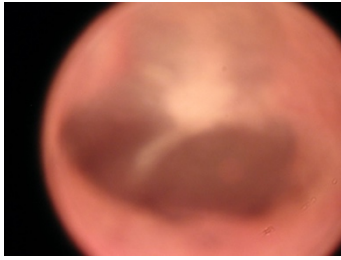


Día 72

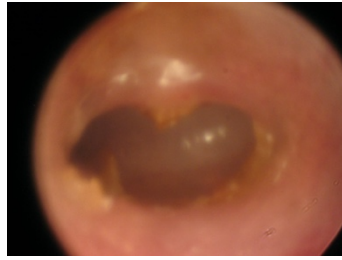


Día 76

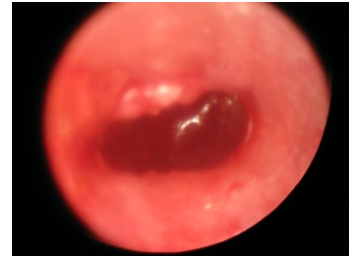
Paciente 23: Rata 12 – OI (Grupo B: Membrana amniótica)



Día 0 (Íntegro)



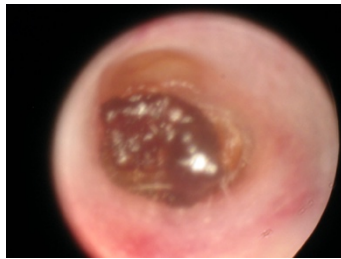
Día 56



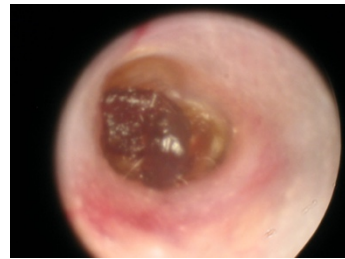
Día 56 tras reavivar



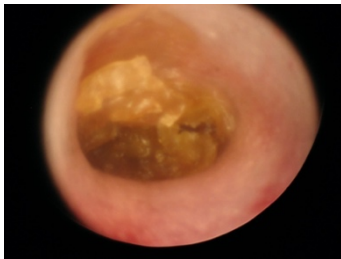
Día 56 tras MA + cutanplast



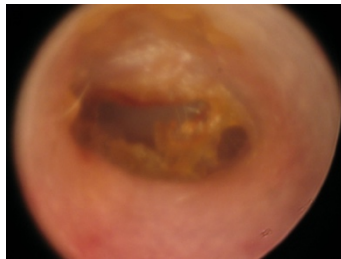
Día 60



Día 64



Día 68

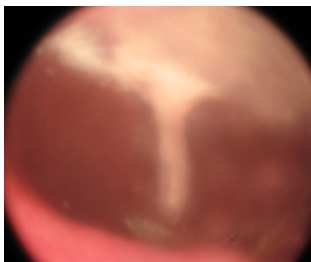


Día 72

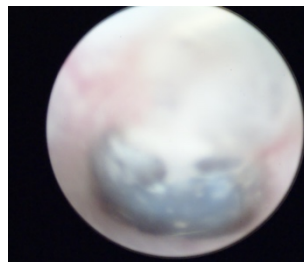


Día 76

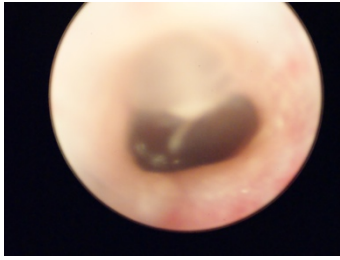
Paciente 24: Rata 12 – OD (Excluido)



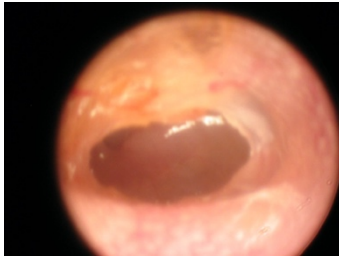
Día 0 (Íntegro)



Día 56 (Cerrado)

Paciente 25: Rata 13 – OI (Grupo B: Membrana amniótica)

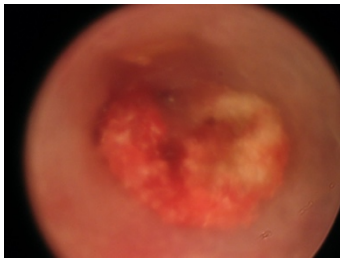
Día 0 (Íntegro)



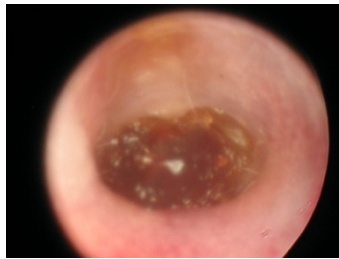
Día 56



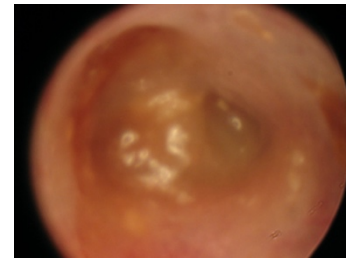
Día 56 tras reavivar



Día 56 tras MA + cutanplast



Día 60



Día 64 (Infección)



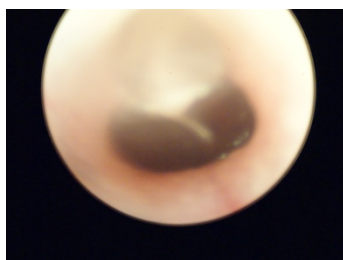
Día 68



Día 72



Día 76

Paciente 26: Rata 13 – OD (Grupo B: Membrana amniótica)

Día 0 (Íntegro)



Día 56



Día 56 tras MA



Día 56 + cutanplast



Día 60 (Infección)



Día 64



Día 68

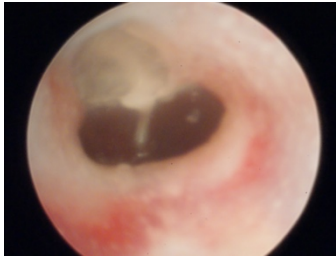


Día 72

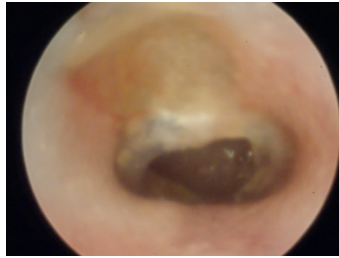


Día 76

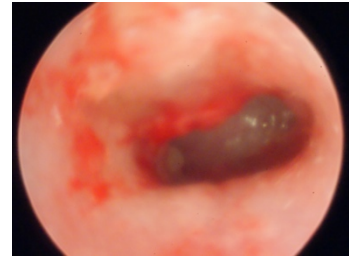
Paciente 27: Rata 14 – OI (Grupo C: Membrana amniótica)



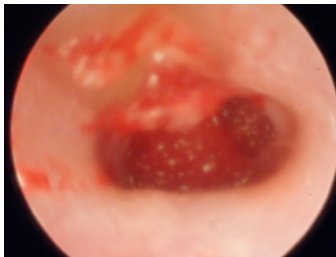
Día 0 (Íntegro)



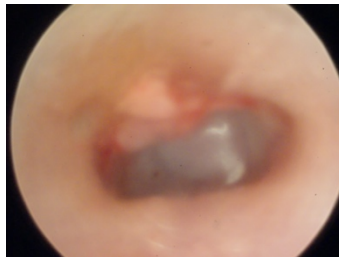
Día 56



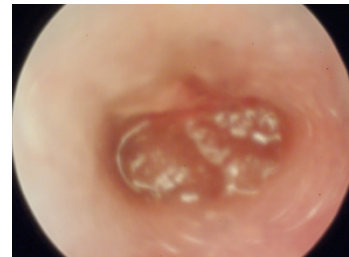
Día 56 tras reavivar



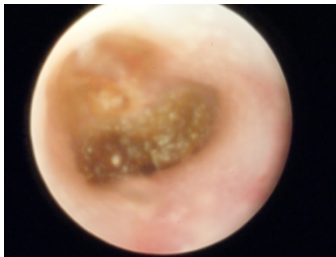
Día 56 cutanplast interno



Día 56 tras MA underlay



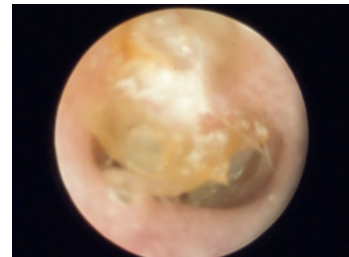
Día 56 cutanplast externo



Día 60



Día 64



Día 68



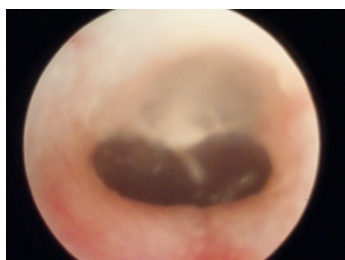
Día 72



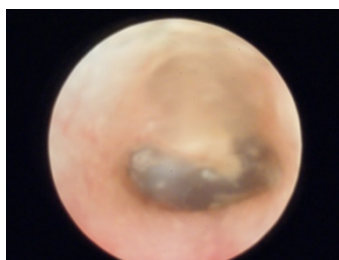
Día 76



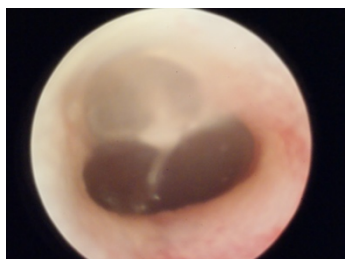
Día 76 tras costra

Paciente 28: Rata 14 – OD (Excluido)

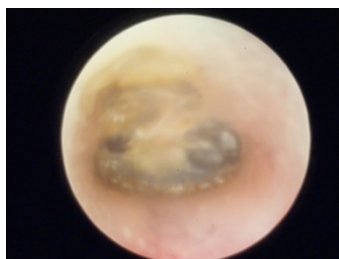
Día 0 (Íntegro)



Día 56 (Cerrado)

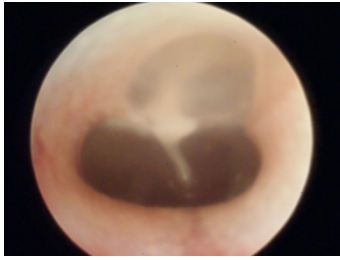
Paciente 29: Rata 15 – OI (Excluido)

Día 0 (Íntegro)

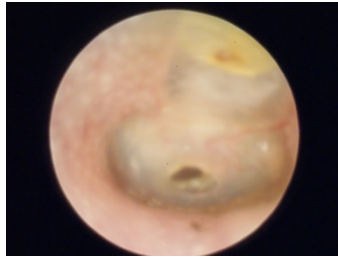


Día 56 (Cerrado)

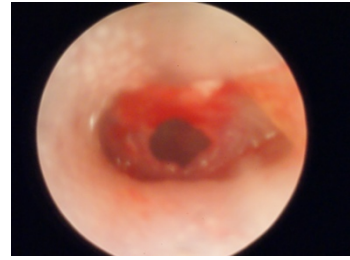
Paciente 30: Rata 15 – OD (Grupo C: Control) → CERRADO



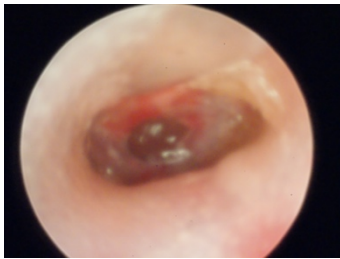
Día 0 (Íntegro)



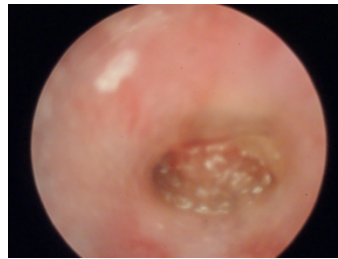
Día 56



Día 56 tras reavivar



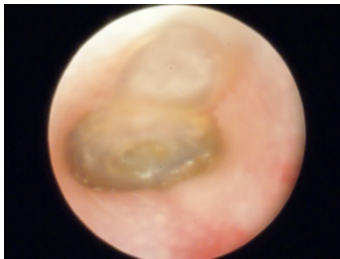
Día 56 cutanplast interno



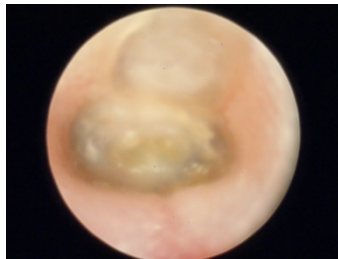
Día 56 cutanplast externo



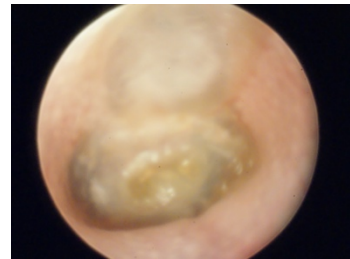
Día 60



Día 64



Día 68



Día 72

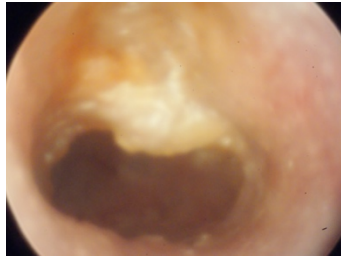


Día 76 (Cerrado)

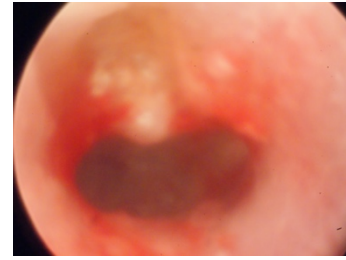
Paciente 31: Rata 16 – OI (Grupo C: Membrana amniótica)



Día 0 (Íntegro)



Día 56



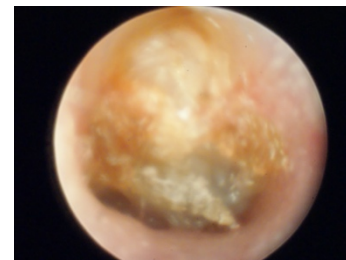
Día 56 tras reavivar



Día 56 MA underlay



Día 56 cutanplast externo



Día 60



Día 64



Día 68

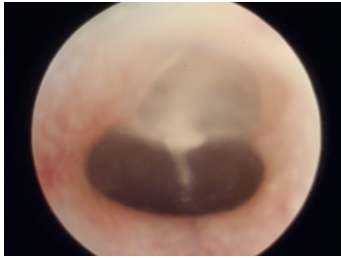


Día 72

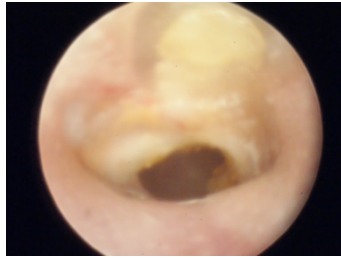


Día 76

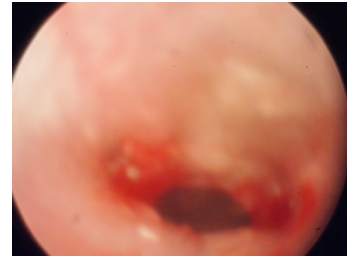
Paciente 32: Rata 16 – OD (Grupo C: Membrana amniótica)



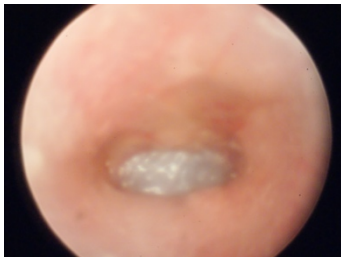
Día 0 (Íntegro)



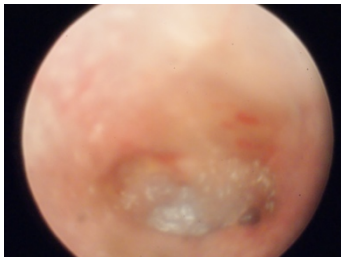
Día 56



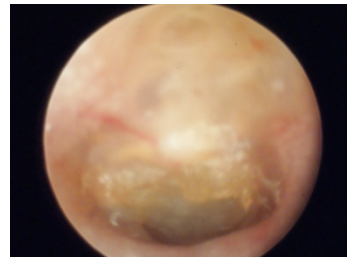
Día 56 tras reavivar



Día 56 MA underlay



Día 56 cutanplast externo



Día 60



Día 64



Día 68

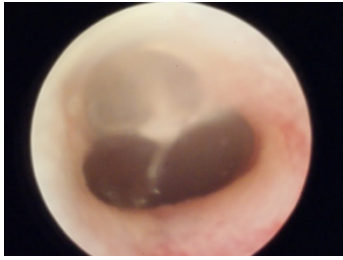


Día 72



Día 76

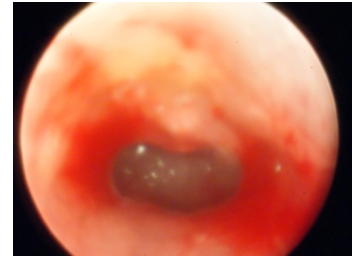
Paciente 33: Rata 17 – OI (Grupo C: Control)



Día 0 (Íntegro)



Día 56



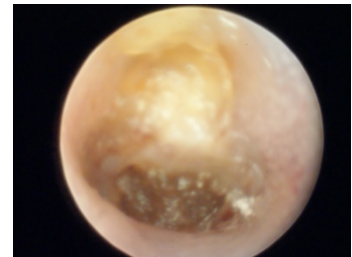
Día 56 tras reavivar



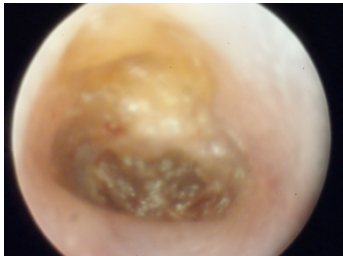
Día 56 cutanplast interno
y externo



Día 60



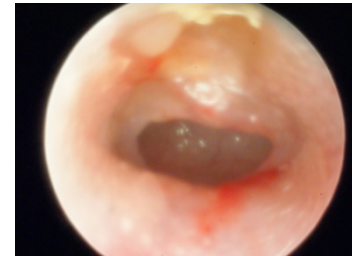
Día 64



Día 68

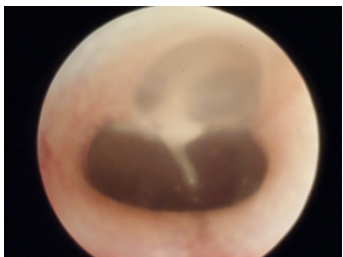


Día 72

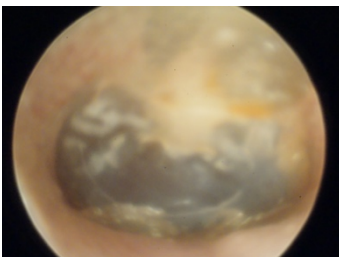


Día 76 tras retirar costra

Paciente 34: Rata 17 – OD (Excluido)

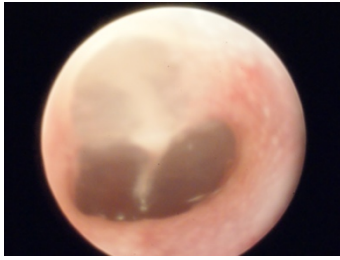


Día 0 (Íntegro)

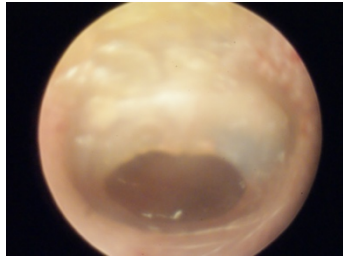


Día 56 (Cerrado)

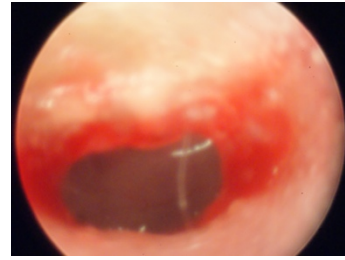
Paciente 35: Rata 18 – OI (Grupo C: Control)



Día 0 (Íntegro)



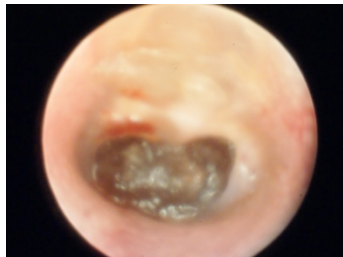
Día 56



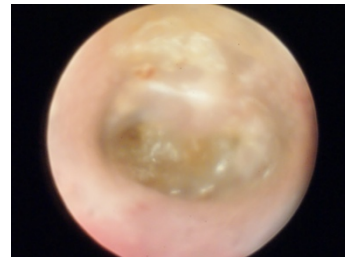
Día 56 tras reavivar



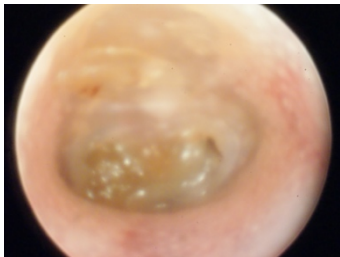
Día 56 cutanplast interno



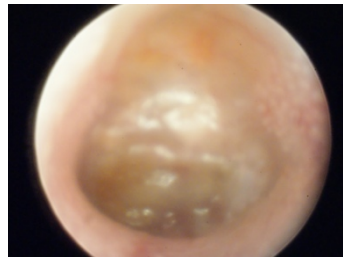
Día 60



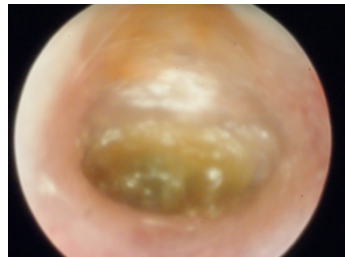
Día 64



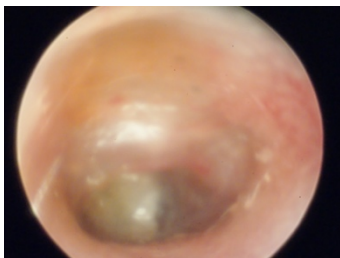
Día 68



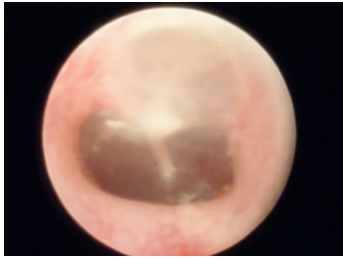
Día 72



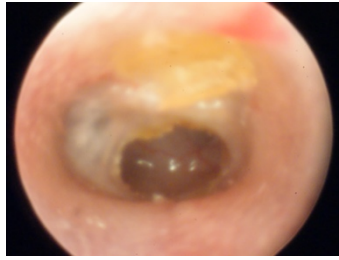
Día 76



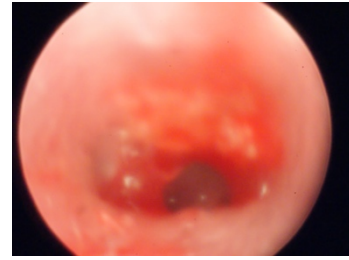
Día 76 tras retirar costra (Infección)

Paciente 36: Rata 18 – OD (Grupo C: Membrana amniótica)

Día 0 (Íntegro)



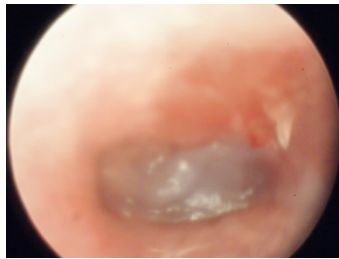
Día 56



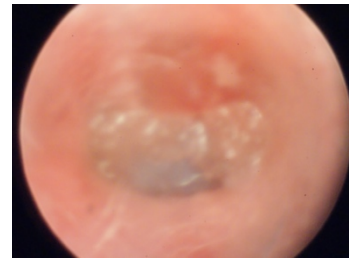
Día 56 tras reavivar



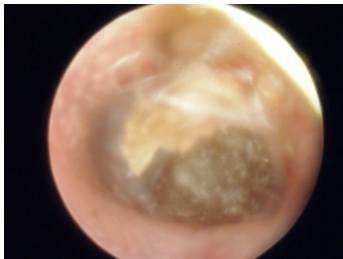
Día 56 cutanplast interno



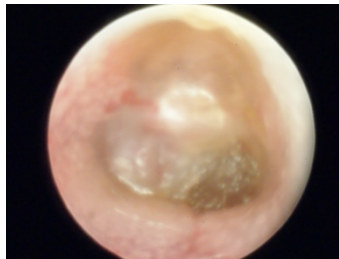
Día 56 MA underlay



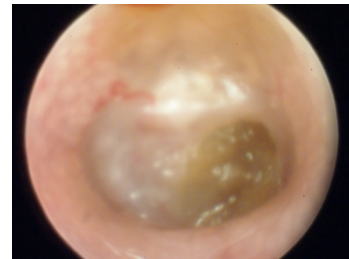
Día 56 cutanplast externo



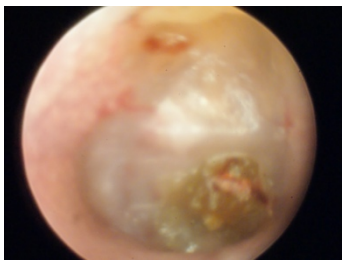
Día 60



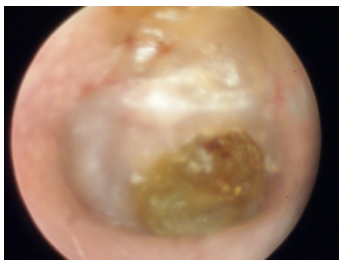
Día 64



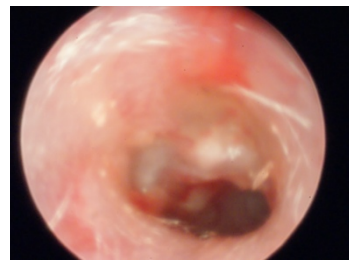
Día 68



Día 72

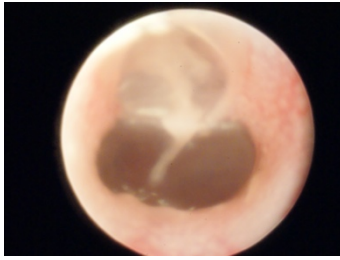


Día 76

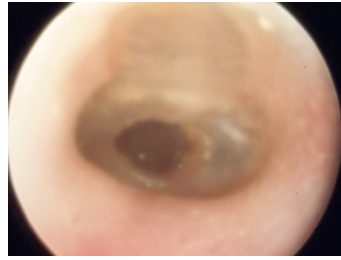


Día 76 tras retirar costra

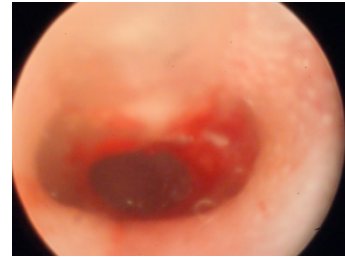
Paciente 37: Rata 19 – OI (Grupo C: Membrana amniótica)



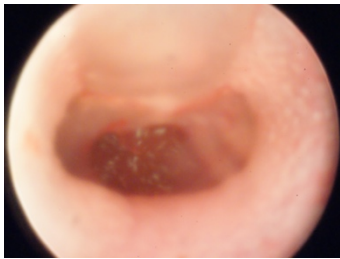
Día 0 (Íntegro)



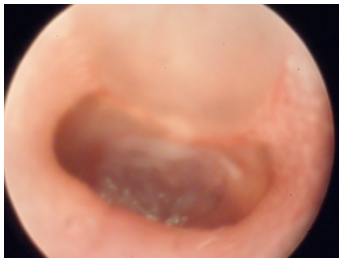
Día 56



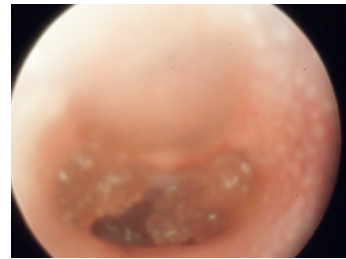
Día 56 tras reavivar



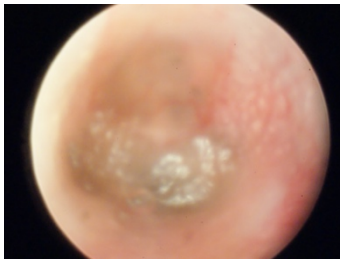
Día 56 cutanplast interno



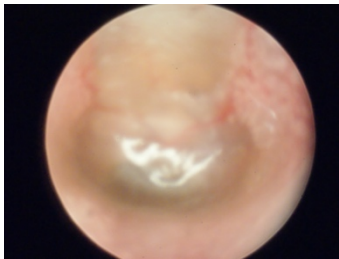
Día 56 MA underlay



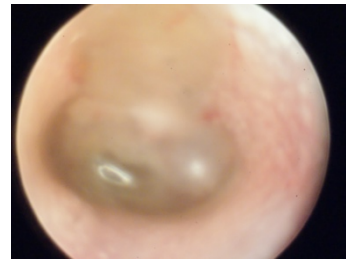
Día 56 cutanplast externo



Día 60



Día 64 (Infección)



Día 68



Día 72

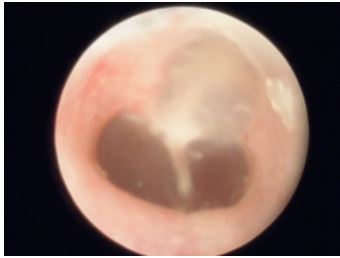


Día 76

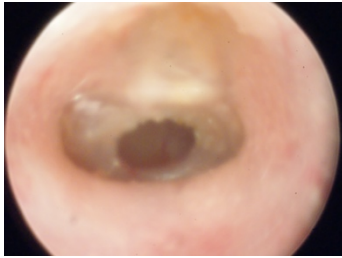


Día 76 tras retirar costra

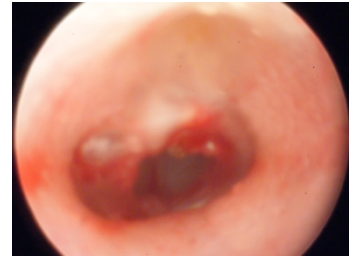
Paciente 38: Rata 19 – OD (Grupo C: Control)



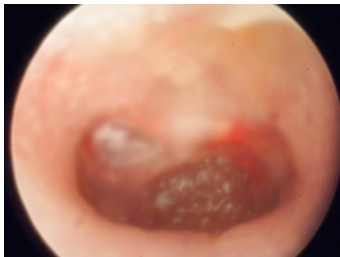
Día 0 (Íntegro)



Día 56



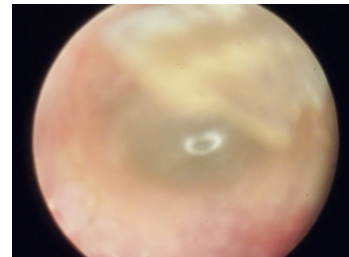
Día 56 tras reavivar



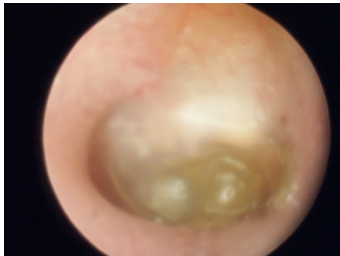
Día 56 cutanplast interno
y externo



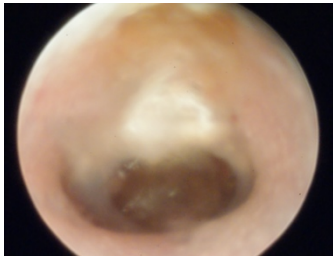
Día 60 (Infección)



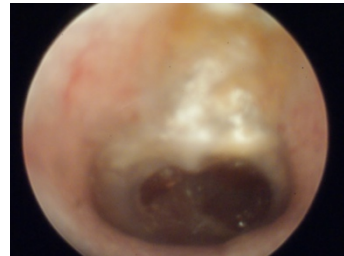
Día 64



Día 68



Día 72

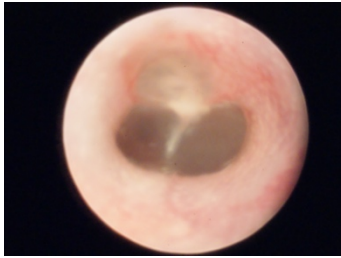


Día 76

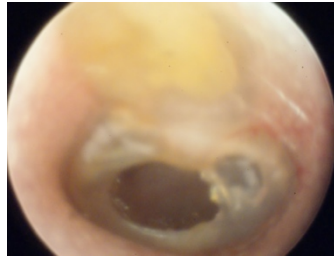


Día 76 tras retirar costra

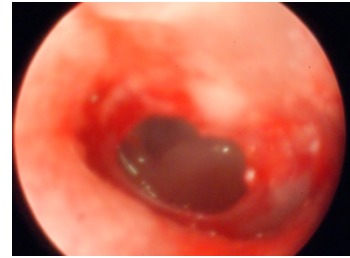
Paciente 39: Rata 20 – OI (Grupo C: Membrana amniótica) → *CERRADO*



Día 0 (Íntegro)



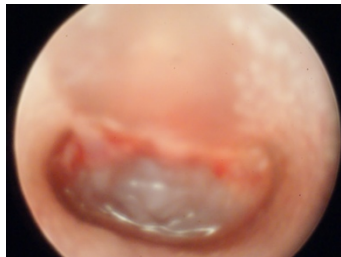
Día 56



Día 56 tras reavivar



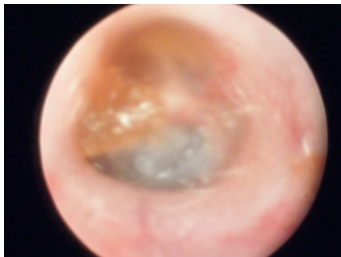
Día 56 cutanplast interno



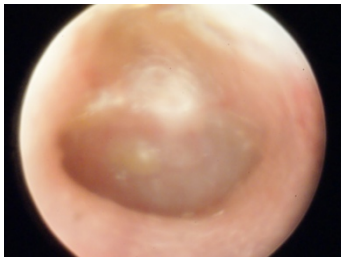
Día 56 MA underlay



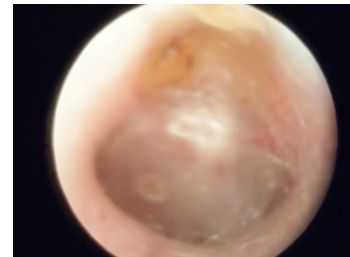
Día 56 cutanplast externo



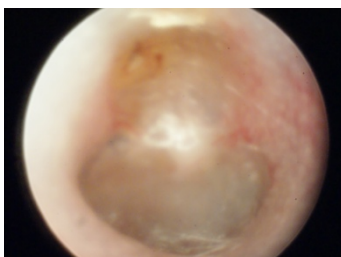
Día 60



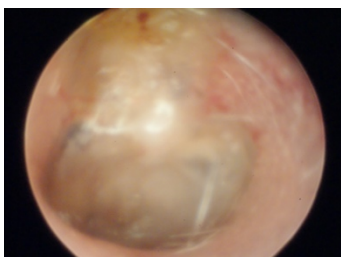
Día 64



Día 68

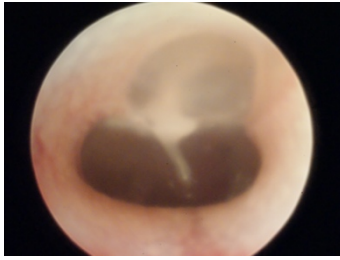


Día 72 (Cerrado)

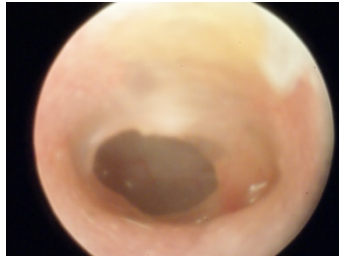


Día 76

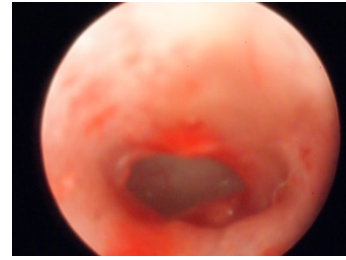
Paciente 40: Rata 20 – OD (Grupo C: Membrana amniótica)



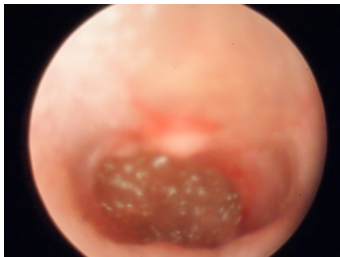
Día 0 (Íntegro)



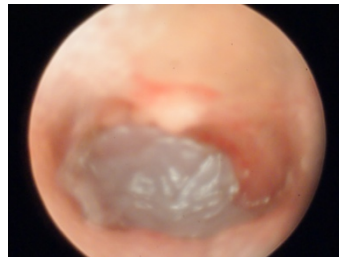
Día 56



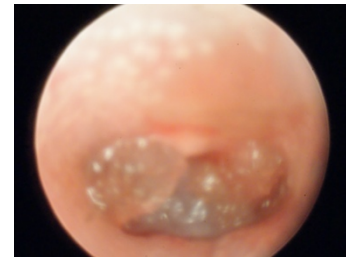
Día 56 tras reavivar



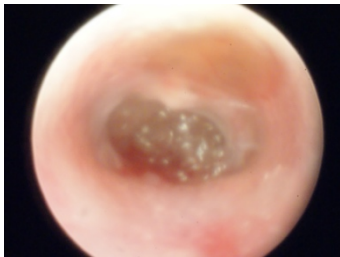
Día 56 cutanplast interno



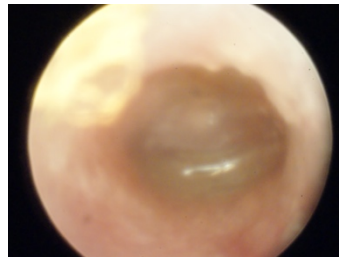
Día 56 MA underlay



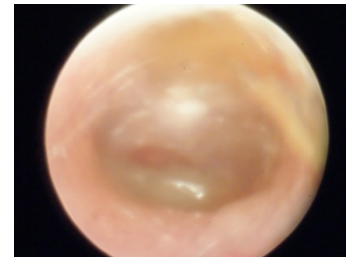
Día 56 cutanplast externo



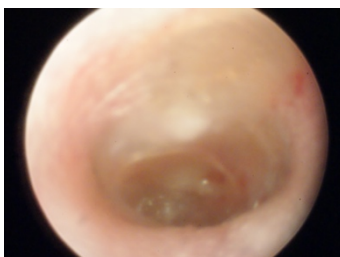
Día 60



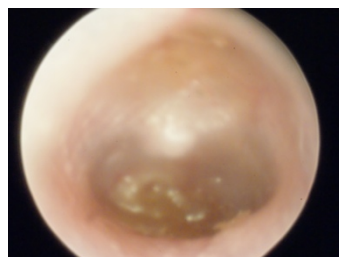
Día 64 (Infección)



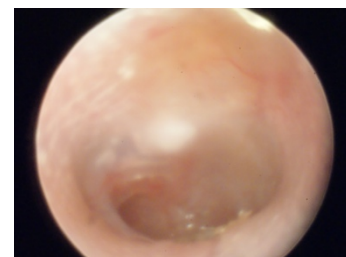
Día 68



Día 72

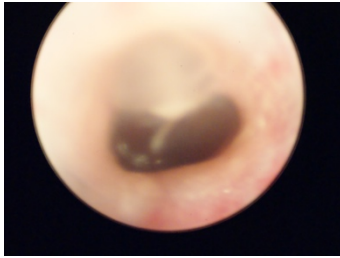


Día 76

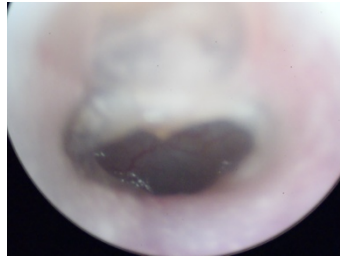


Día 76 tras retirar costra

Paciente 41: Rata 21 – OI (Grupo D: Membrana amniótica)



Día 0 (Íntegro)



Día 56



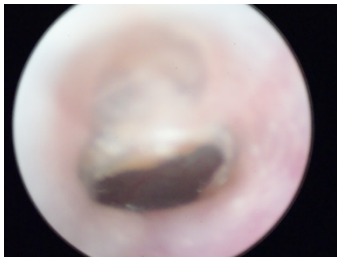
Día 56 tras reavivar



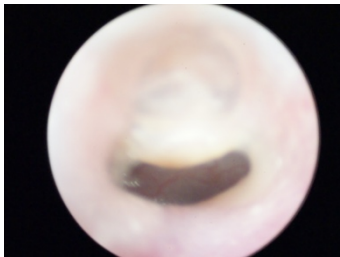
Día 56 tras MA



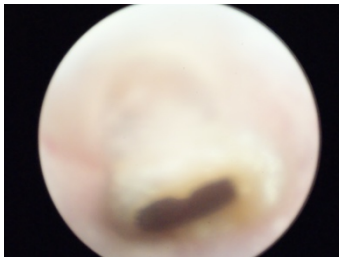
Día 56 cutanplast externo



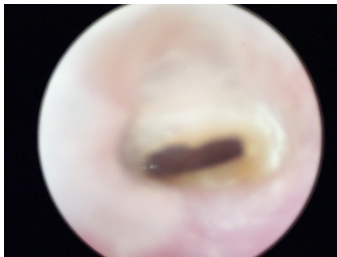
Día 60



Día 64



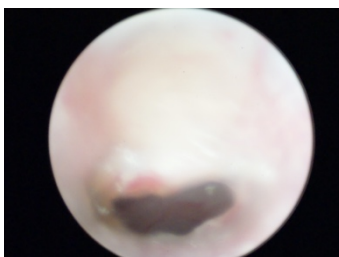
Día 68



Día 72

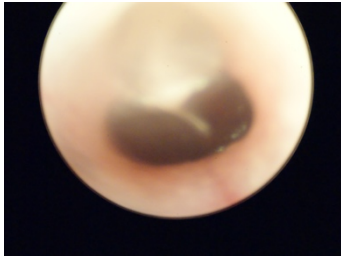


Día 76

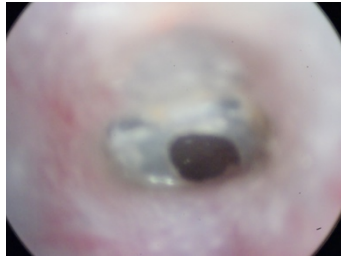


Día 76 tras retirar costra

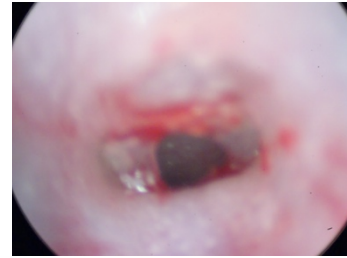
Paciente 42: Rata 21 – OD (Grupo D: Membrana amniótica)



Día 0 (Íntegro)



Día 56



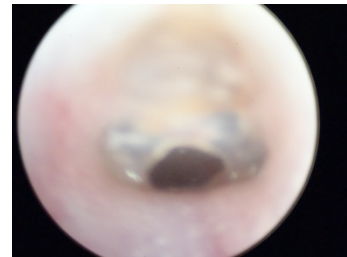
Día 56 tras reavivar



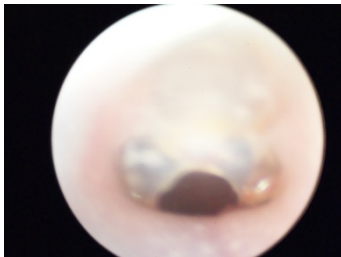
Día 56 tras MA



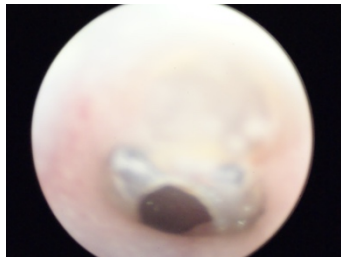
Día 56 cutanplast externo



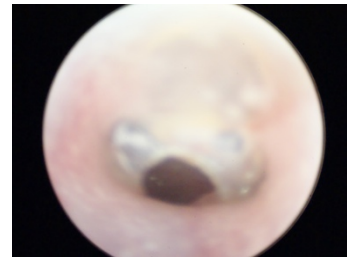
Día 60



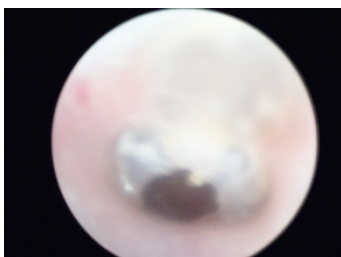
Día 64



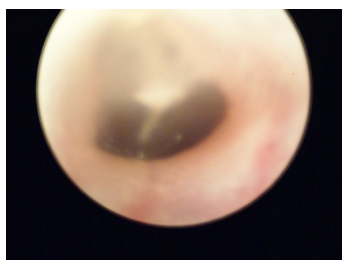
Día 68



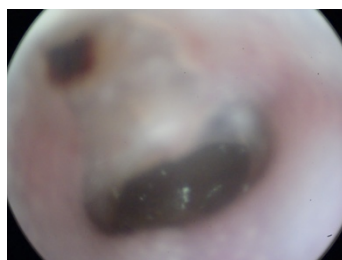
Día 72



Día 76

Paciente 43: Rata 22 – OI (Grupo D: Control)

Día 0 (Íntegro)



Día 56



Día 56 tras reavivar



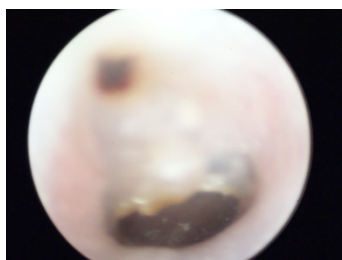
Día 56 cutanplast externo



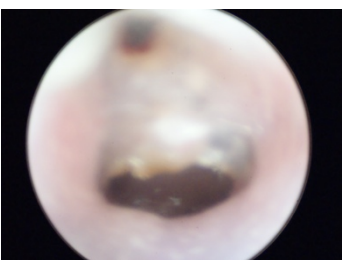
Día 60



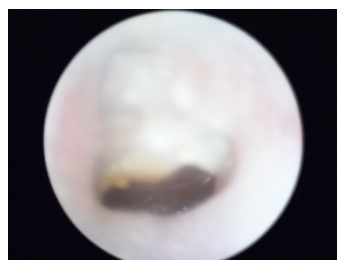
Día 64



Día 68

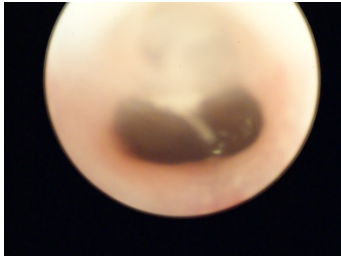


Día 72



Día 76

Paciente 44: Rata 22 – OD (Grupo D: Membrana amniótica)



Día 0 (Íntegro)



Día 56



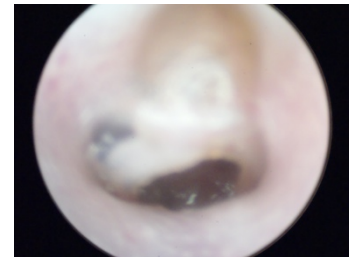
Día 56 tras reavivar



Día 56 tras MA



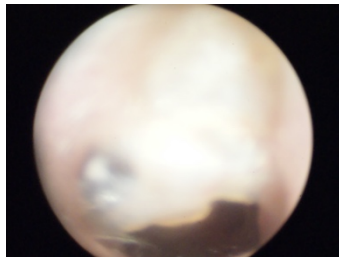
Día 56 cutanplast externo



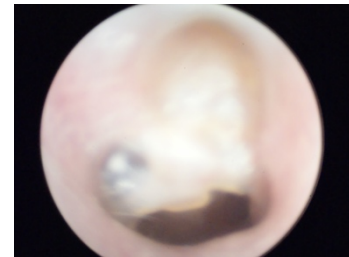
Día 60



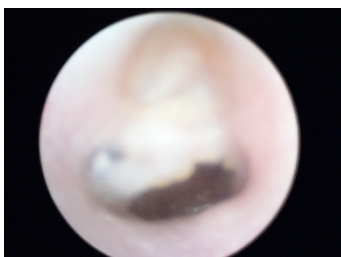
Día 64



Día 68

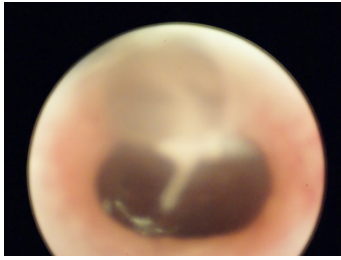


Día 72

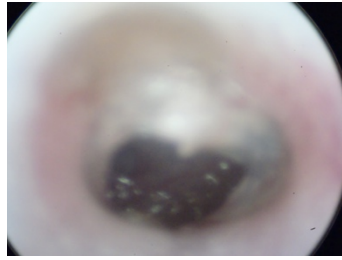


Día 76

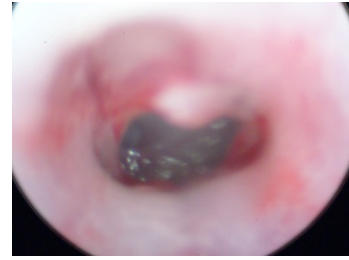
Paciente 45: Rata 23 – OI (Grupo D: Membrana amniótica)



Día 0 (Íntegro)



Día 56



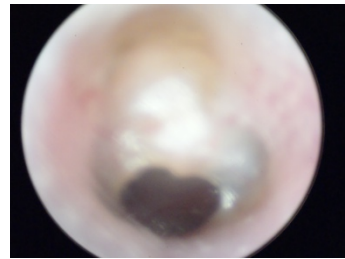
Día 56 tras reavivar



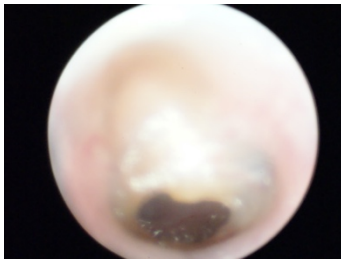
Día 56 tras MA



Día 56 cutanplast externo



Día 60



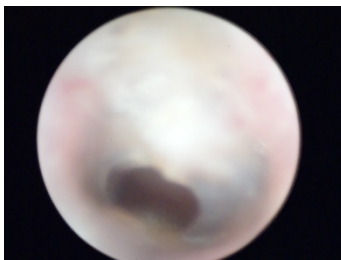
Día 64



Día 68

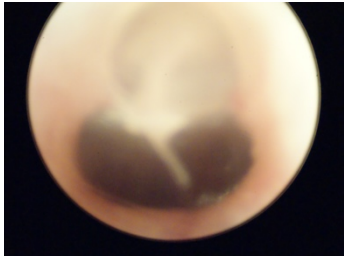


Día 72

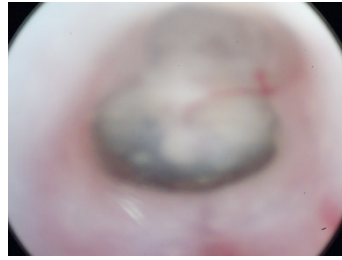


Día 76

Paciente 46: Rata 23 – OD (Excluido)

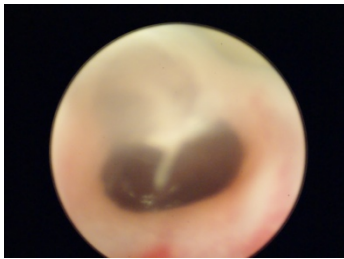


Día 0 (Íntegro)



Día 56 (Cerrado)

Paciente 47: Rata 24 – OI (Grupo D: Membrana amniótica) → *CERRADO*



Día 0 (Íntegro)



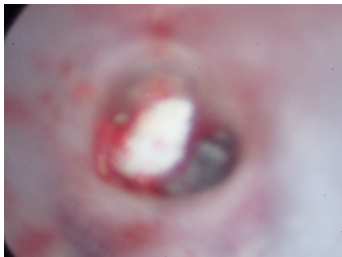
Día 56



Día 56 tras reavivar



Día 56 tras MA



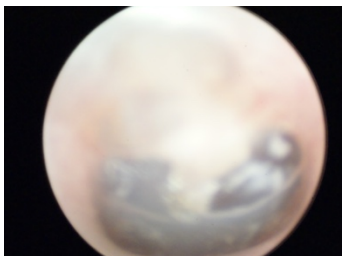
Día 56 cutanplast externo



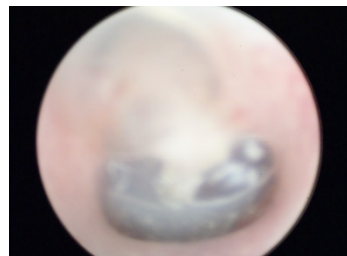
Día 60



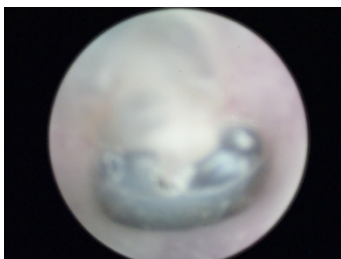
Día 64



Día 68 (Cerrado)

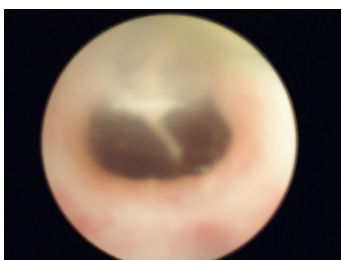


Día 72



Día 76

Paciente 48: Rata 24 – OD (Excluido)

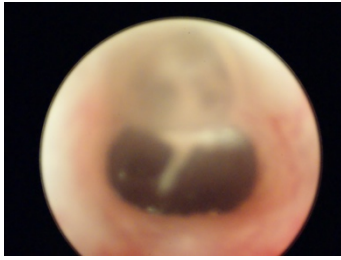


Día 0 (Íntegro)



Día 56 (Cerrado)

Paciente 49: Rata 25 – OI (Grupo D: Control) → CERRADO



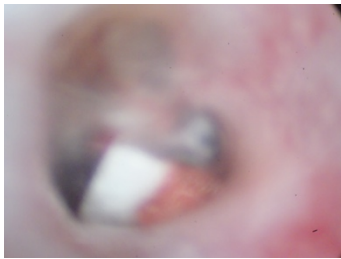
Día 0 (Íntegro)



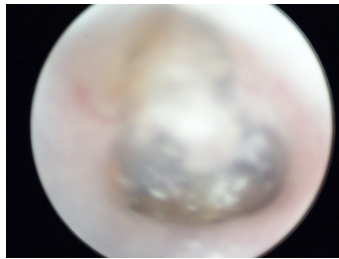
Día 56



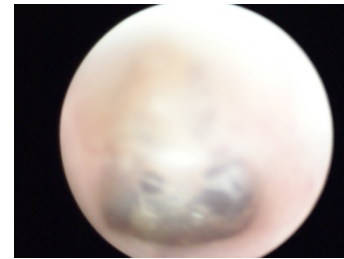
Día 56 tras reavivar



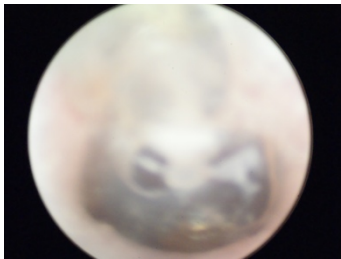
Día 56 cutanplast externo



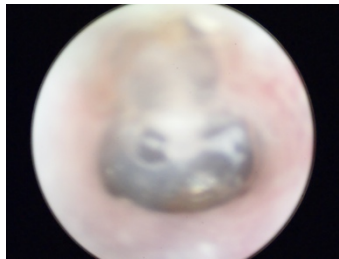
Día 60



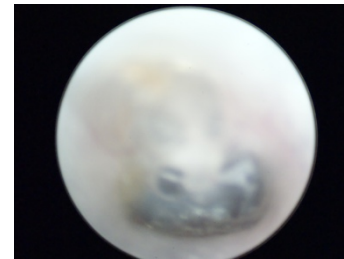
Día 64 (Cerrado)



Día 68

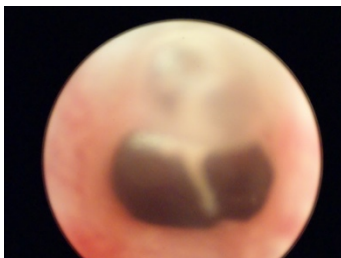


Día 72



Día 76

Paciente 50: Rata 25 – OD (Excluido)

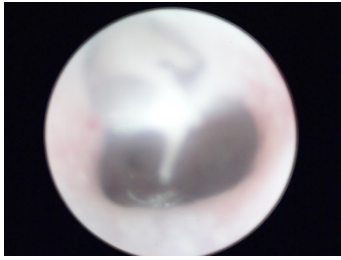


Día 0 (Íntegro)

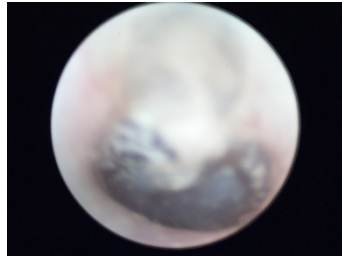


Día 56 (Cerrado)

Paciente 51: Rata 26 – OI (Excluido)

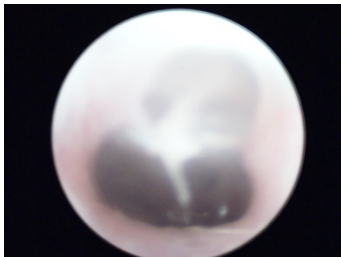


Día 0 (Íntegro)

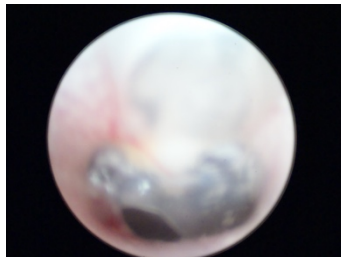


Día 56 (Cerrado)

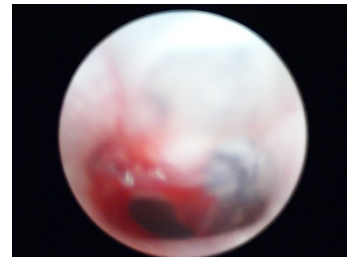
Paciente 52: Rata 26 – OD (Grupo D: Membrana amniótica) → *CERRADO*



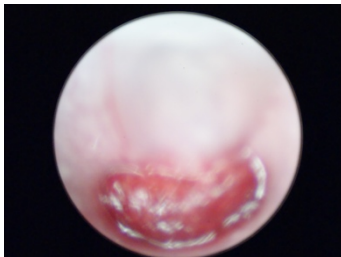
Día 0 (Íntegro)



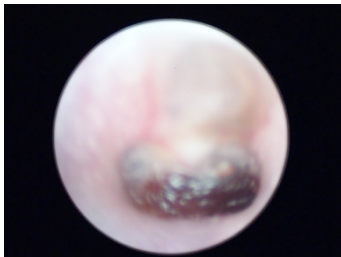
Día 56



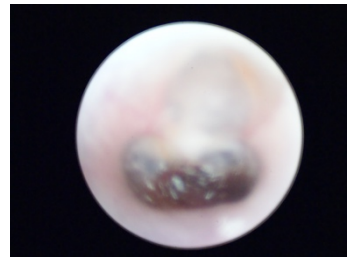
Día 56 tras reavivar



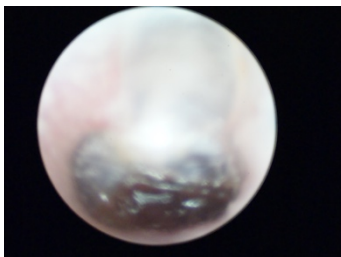
Día 56 MA + cutanplast
externo



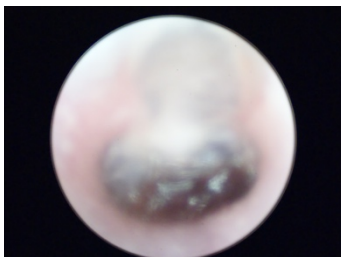
Día 60



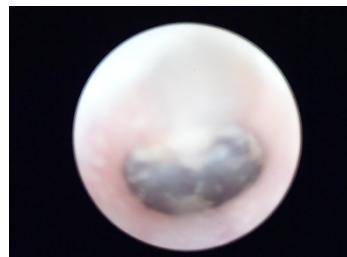
Día 64



Día 68

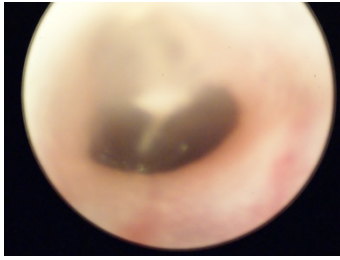


Día 72

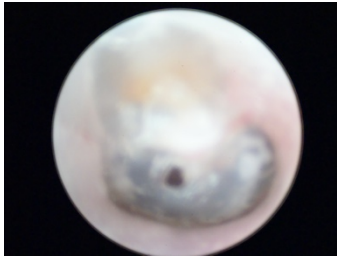


Día 76 tras retirar costra
(Cerrado)

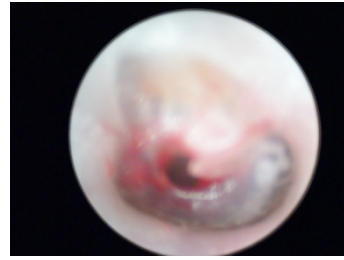
Paciente 53: Rata 27 – OI (Grupo D: Membrana amniótica)



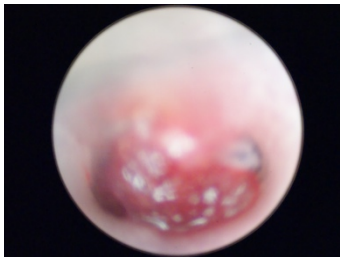
Día 0 (Íntegro)



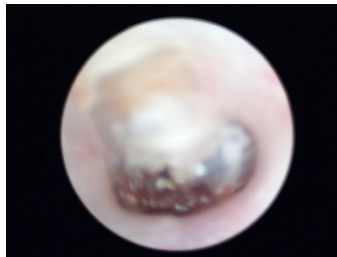
Día 56



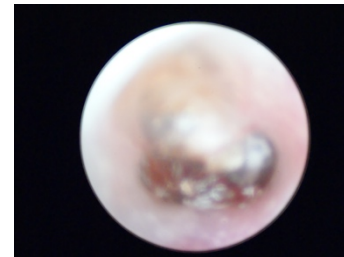
Día 56 tras reavivar



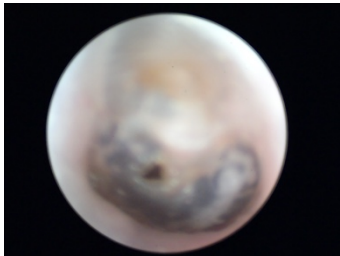
Día 56 MA + cutanplast
externo



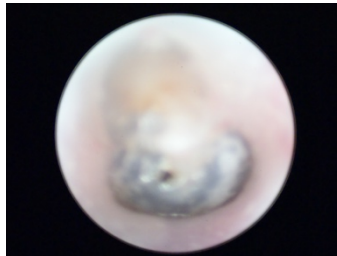
Día 60



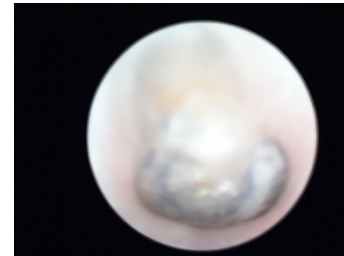
Día 64



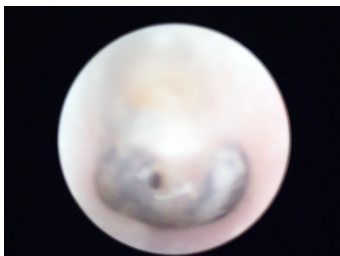
Día 68



Día 72

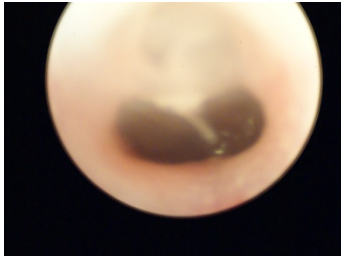


Día 76

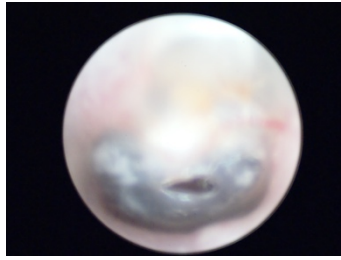


Día 76 tras retirar costra

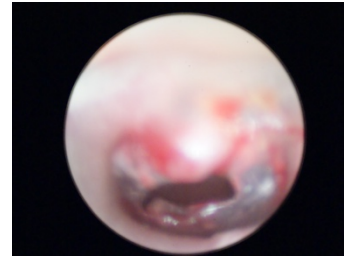
Paciente 54: Rata 27 – OD (Grupo D: Membrana amniótica) → *CERRADO*



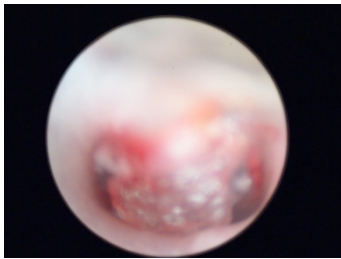
Día 0 (Íntegro)



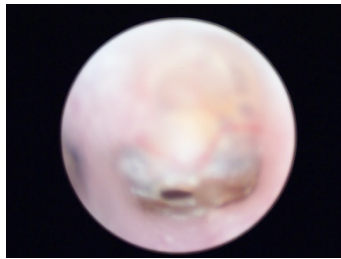
Día 56



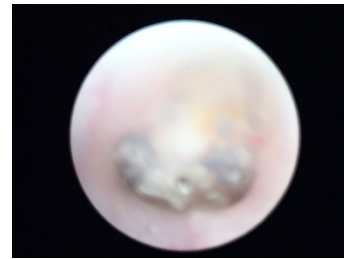
Día 56 tras reavivar



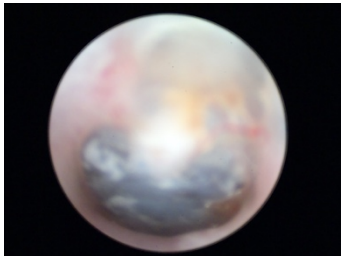
Día 56 MA + cutanplast
externo



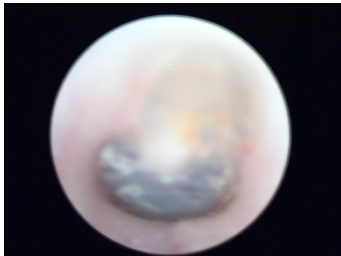
Día 60



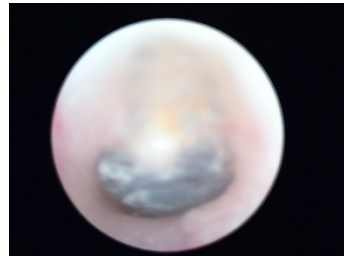
Día 64



Día 68 (Cerrado)

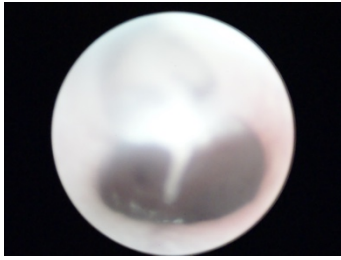


Día 72

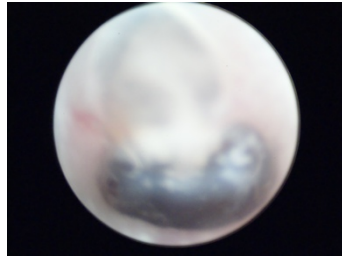


Día 76

Paciente 55: Rata 28 – OI (Excluido)

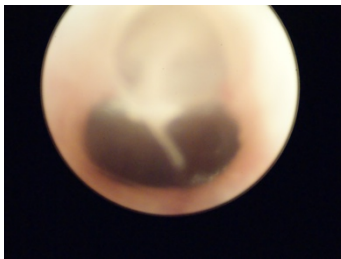


Día 0 (Íntegro)

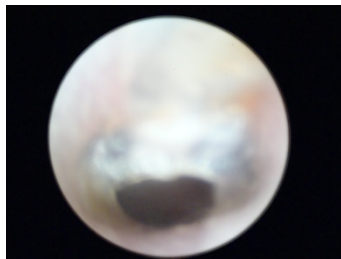


Día 56 (Cerrado)

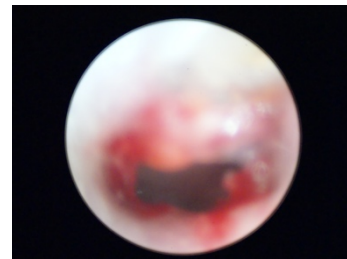
Paciente 56: Rata 28 – OD (Grupo D: Membrana amniótica)



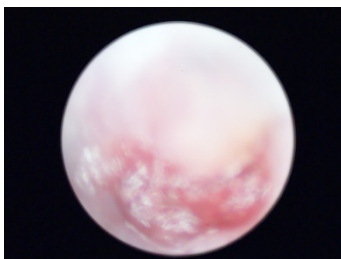
Día 0 (Íntegro)



Día 56



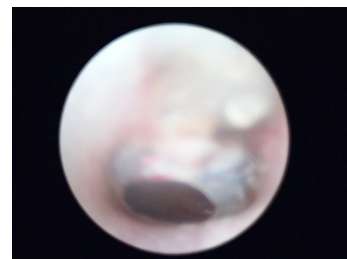
Día 56 tras reavivar



Día 56 MA + cutanplast
externo



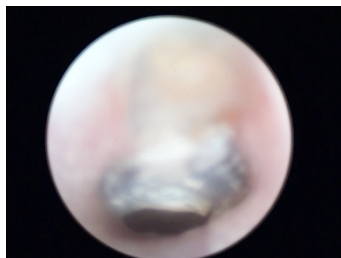
Día 60



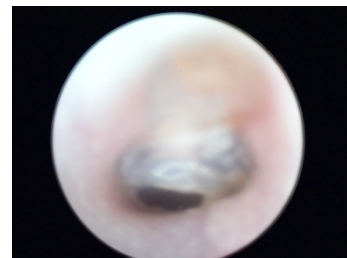
Día 64



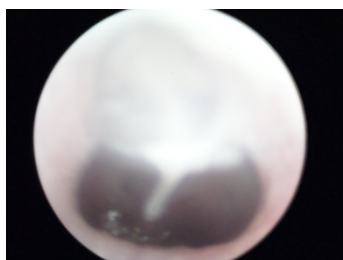
Día 68



Día 72



Día 76

Paciente 57: Rata 29 – OI (Grupo D: Control)

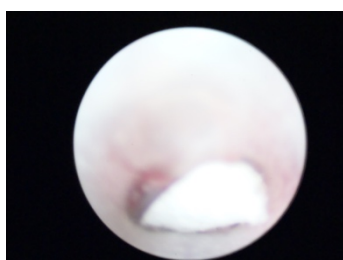
Día 0 (Íntegro)



Día 56



Día 56 tras reavivar



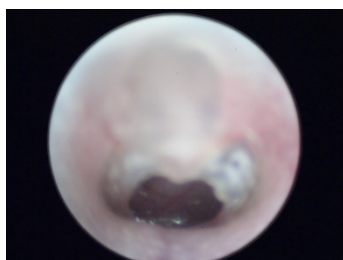
Día 56 cutanplast externo



Día 60



Día 64



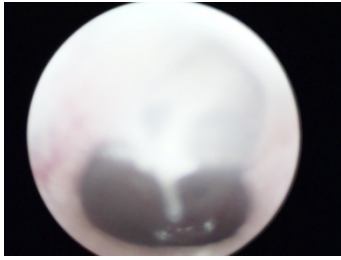
Día 68



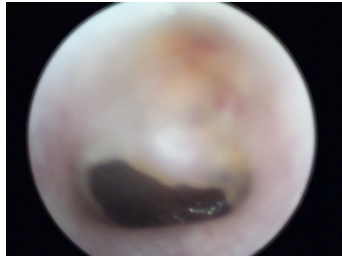
Día 72



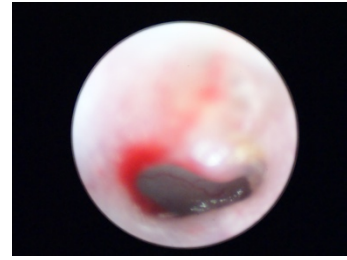
Día 76

Paciente 58: Rata 29 – OD (Grupo D: Membrana amniótica)

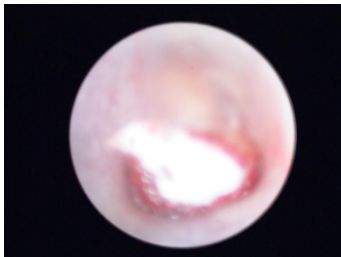
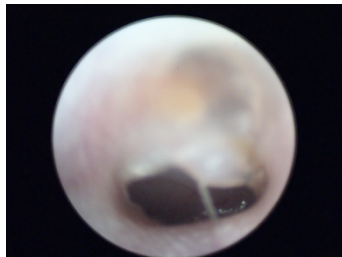
Día 0 (Íntegro)



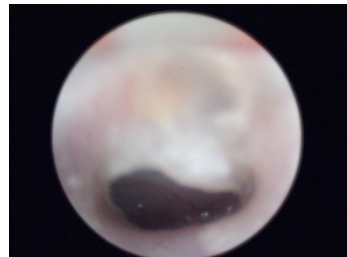
Día 56



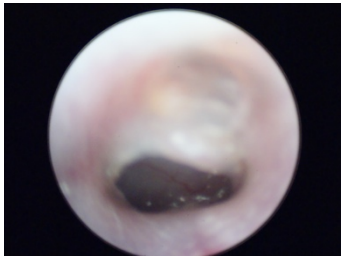
Día 56 tras reavivar

Día 56 MA + cutanplast
externo

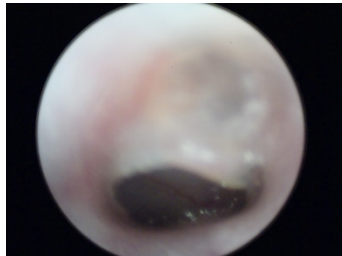
Día 60



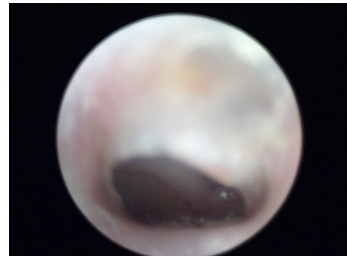
Día 64



Día 68

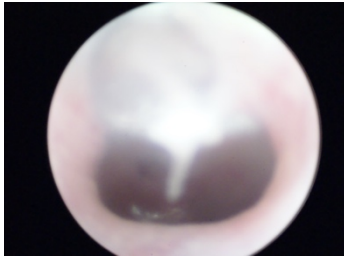


Día 72

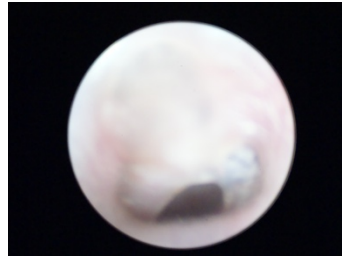


Día 76

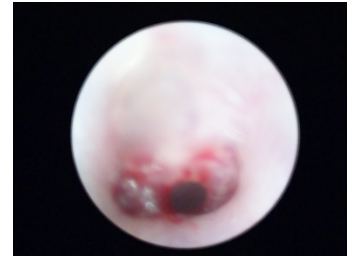
Paciente 59: Rata 30 – OI (Grupo D: Membrana amniótica)



Día 0 (Íntegro)



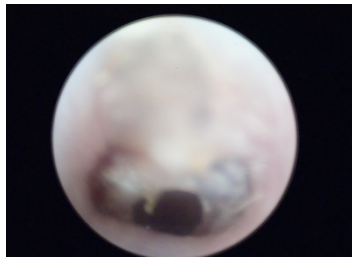
Día 56



Día 56 tras reavivar



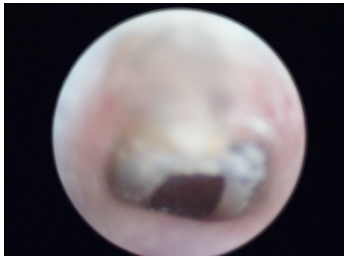
Día 56 MA + cutanplast
externo



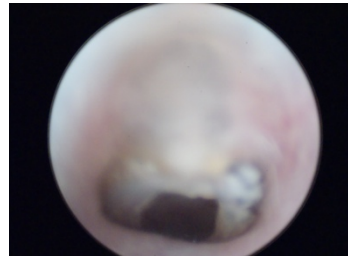
Día 60



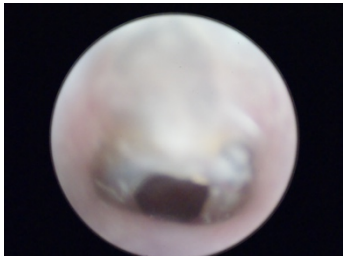
Día 64



Día 68

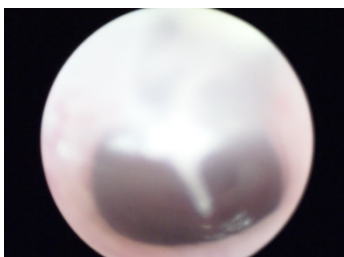


Día 72



Día 76

Paciente 60: Rata 30 – OD (Excluido)

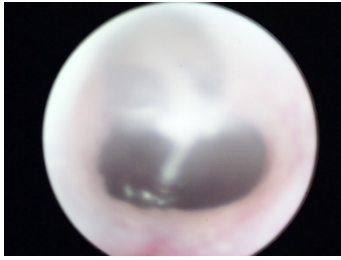


Día 0 (Íntegro)

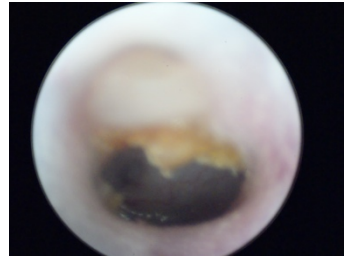


Día 56 (Cerrado)

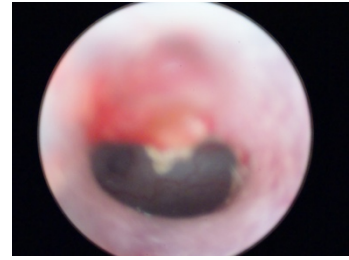
Paciente 61: Rata 31 – OI (Grupo D: Membrana amniótica)



Día 0 (Íntegro)



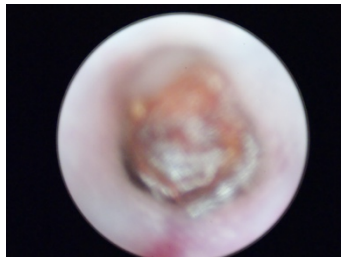
Día 56



Día 56 tras reavivar



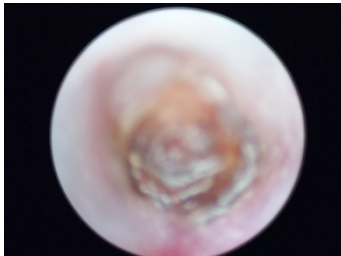
Día 56 MA + cutanplast
externo



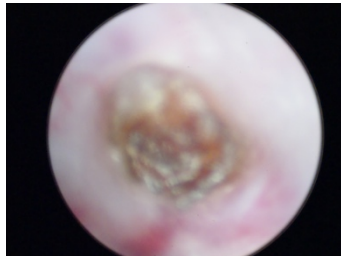
Día 60



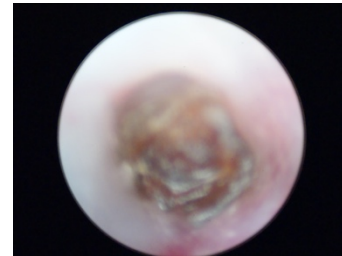
Día 64



Día 68



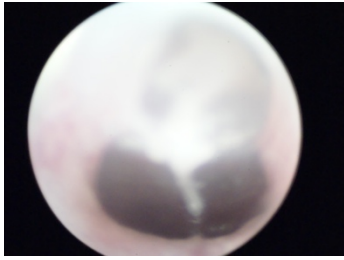
Día 72



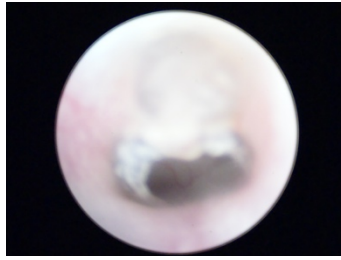
Día 76



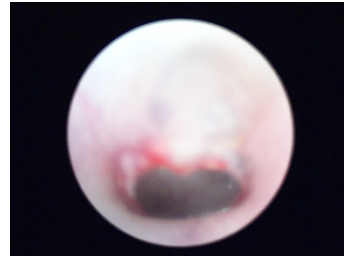
Día 76 tras retirar costra

Paciente 62: Rata 31 – OD (Grupo D: Control)

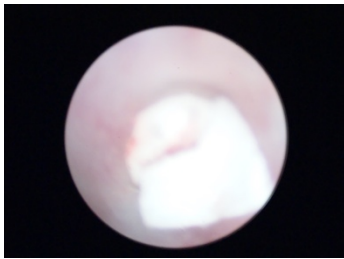
Día 0 (Íntegro)



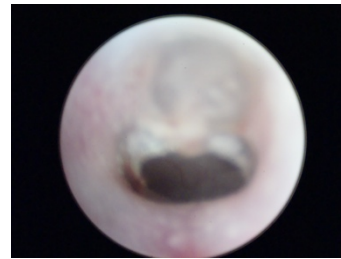
Día 56



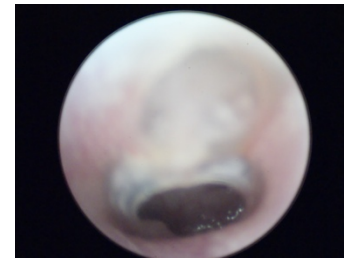
Día 56 tras reavivar



Día 56 cutanplast externo



Día 60



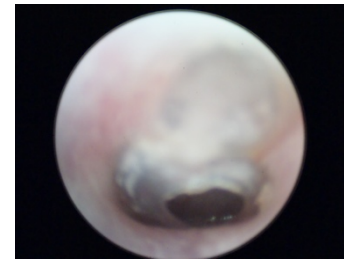
Día 64



Día 68

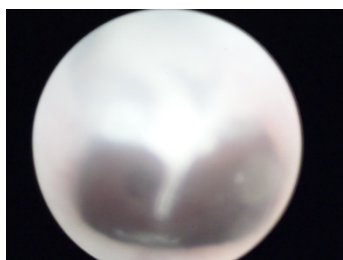


Día 72

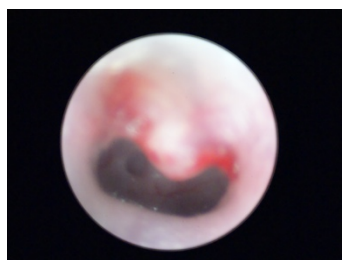


Día 76

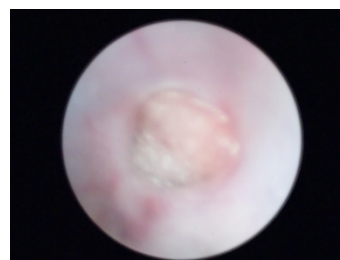
Paciente 63: Rata 32 – OI (Grupo D: Control)



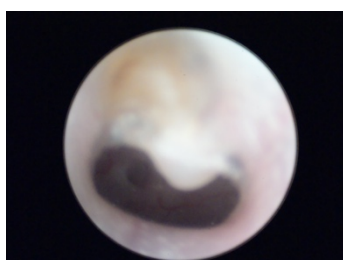
Día 0 (Íntegro)



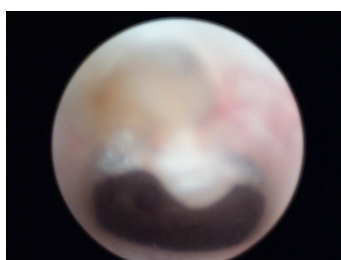
Día 56 tras reavivar



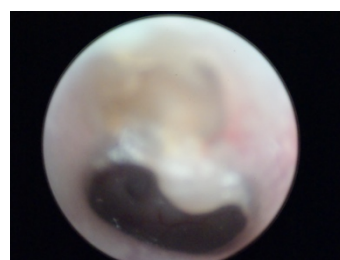
Día 56 cutanoplast externo



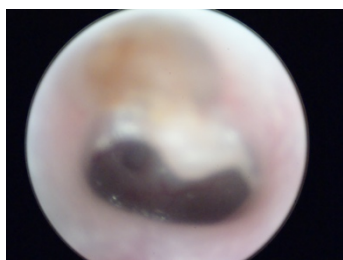
Día 60



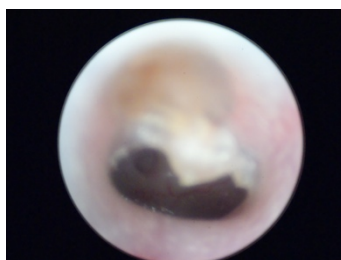
Día 64



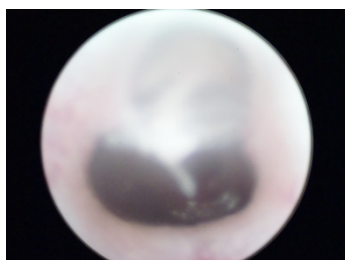
Día 68



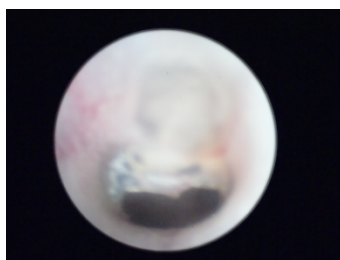
Día 72



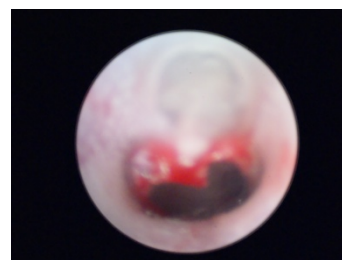
Día 76

Paciente 64: Rata 32 – OD (Grupo D: Control)

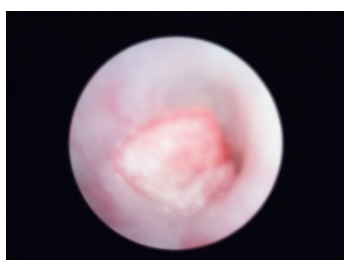
Día 0 (Íntegro)



Día 56



Día 56 tras reavivar



Día 56 cutanplast externo



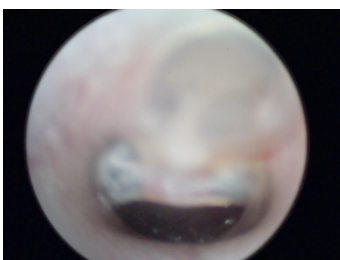
Día 60



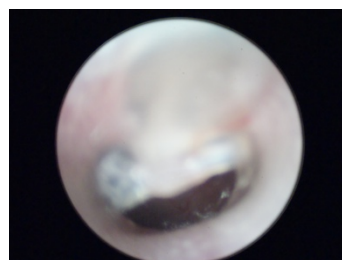
Día 64



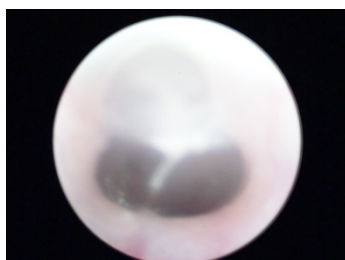
Día 68



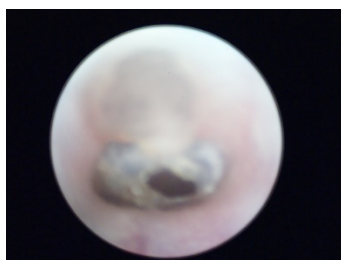
Día 72



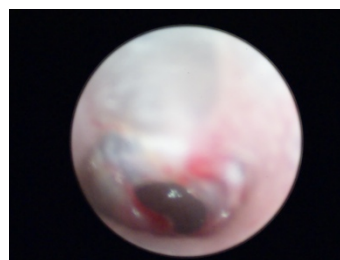
Día 76

Paciente 65: Rata 33 – OI (Grupo D: Control)

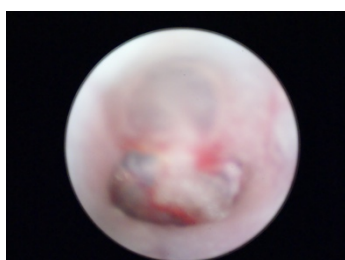
Día 0 (Íntegro)



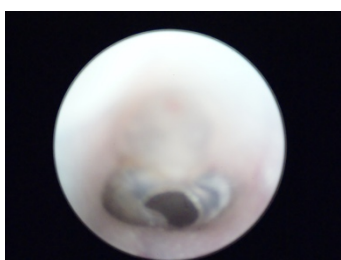
Día 56



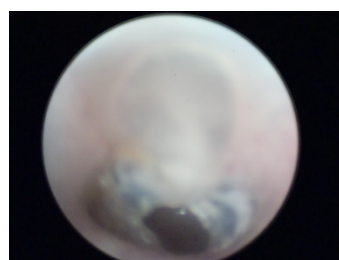
Día 56 tras reavivar



Día 56 cutanplast externo



Día 60



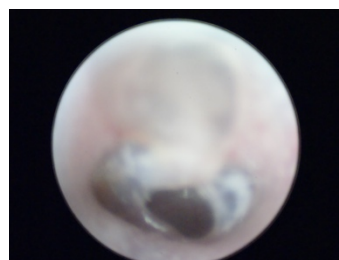
Día 64



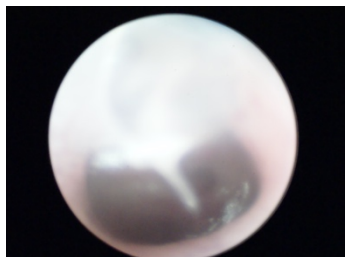
Día 68



Día 72



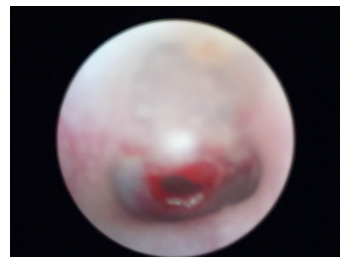
Día 76

Paciente 66: Rata 33 – OD (Grupo D: Control)

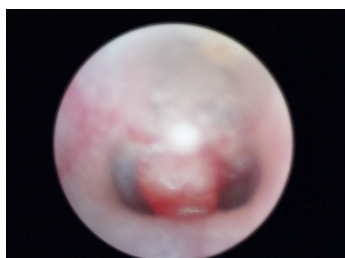
Día 0 (Íntegro)



Día 56



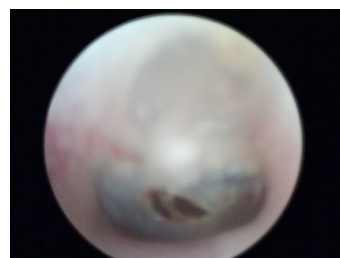
Día 56 tras reavivar



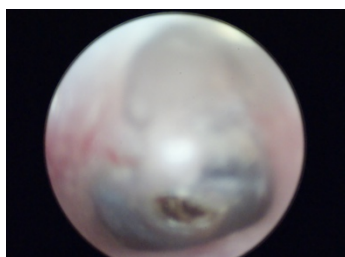
Día 56 cutanplast externo



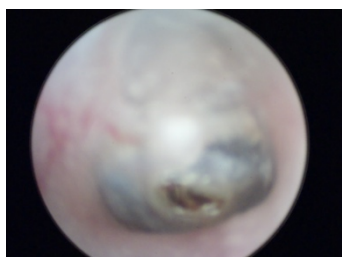
Día 60



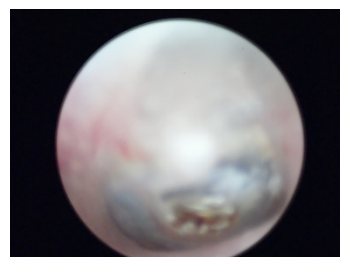
Día 64



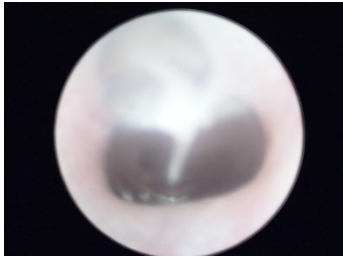
Día 68



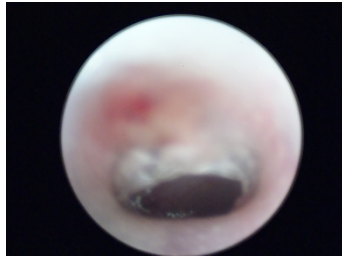
Día 72



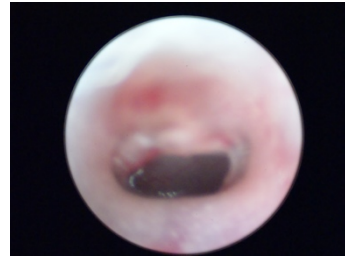
Día 76

Paciente 67: Rata 34 – OI (Grupo D: Control)

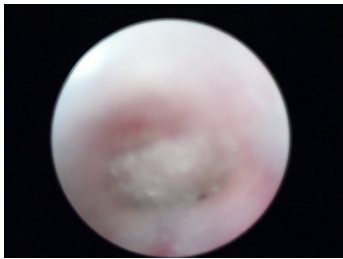
Día 0 (Íntegro)



Día 56



Día 56 tras reavivar



Día 56 cutanplast externo



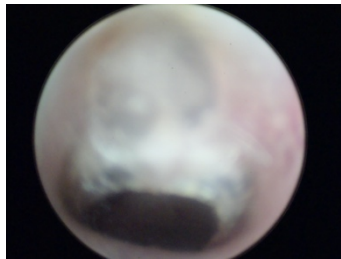
Día 60



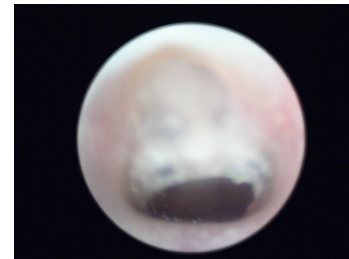
Día 64



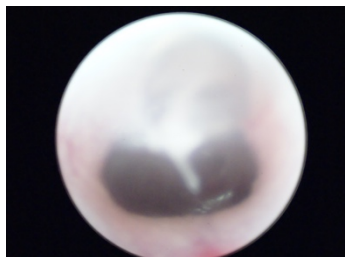
Día 68



Día 72



Día 76

Paciente 68: Rata 34 – OD (Grupo D: Control)

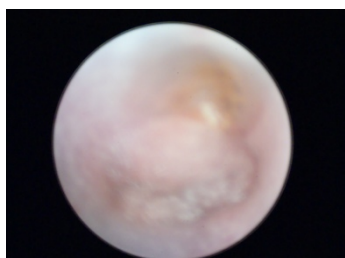
Día 0 (Íntegro)



Día 56



Día 56 tras reavivar



Día 56 cutanplast externo



Día 60



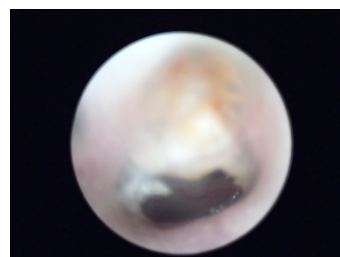
Día 64



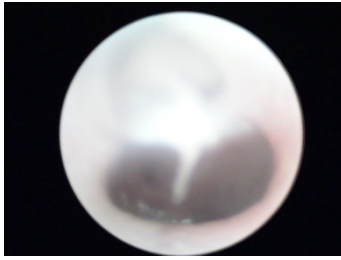
Día 68



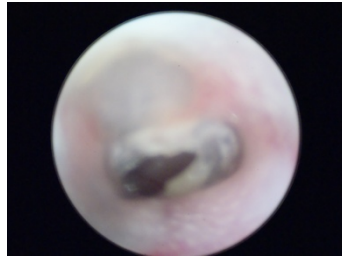
Día 72



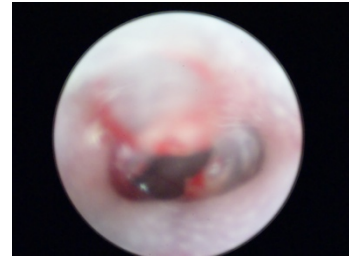
Día 76

Paciente 69: Rata 35 – OI (Grupo D: Membrana amniótica)

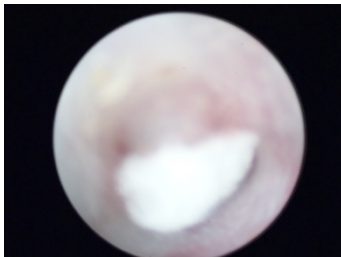
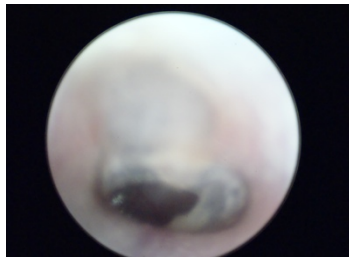
Día 0 (Íntegro)



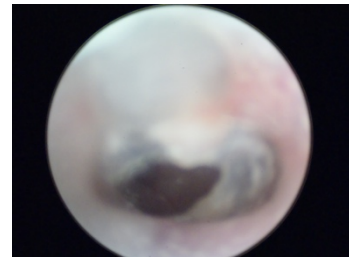
Día 56



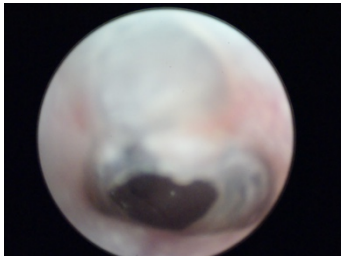
Día 56 tras reavivar

Día 56 MA + cutanplast
externo

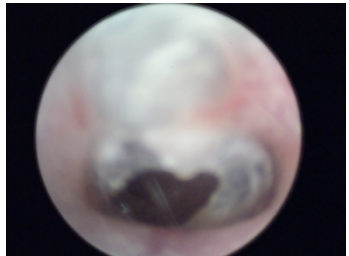
Día 60



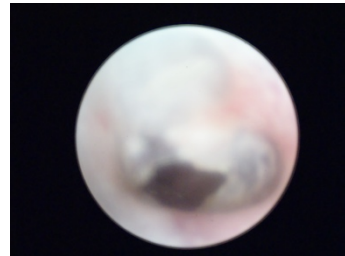
Día 64



Día 68

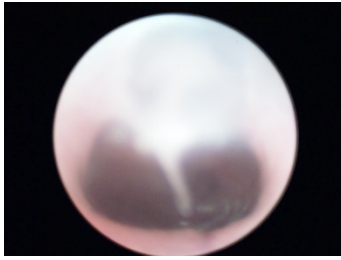


Día 72

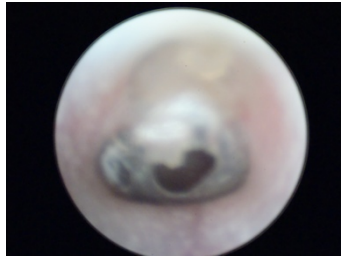


Día 76

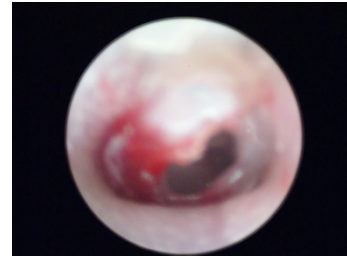
Paciente 70: Rata 35 – OD (Grupo D: Membrana amniótica)



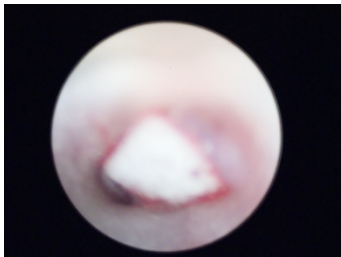
Día 0 (Íntegro)



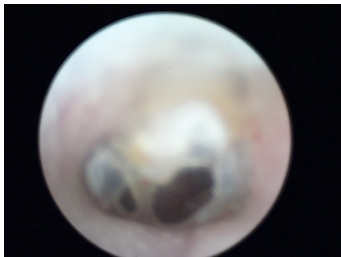
Día 56



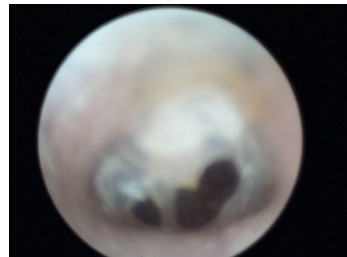
Día 56 tras reavivar



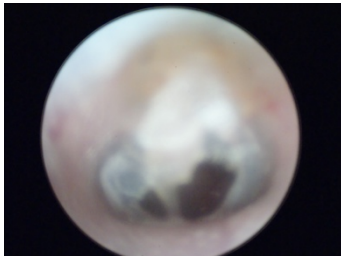
Día 56 MA + cutanplast
externo



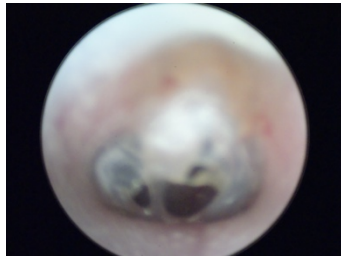
Día 60



Día 64



Día 68

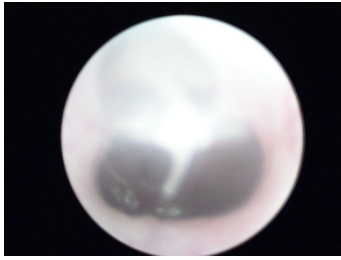


Día 72

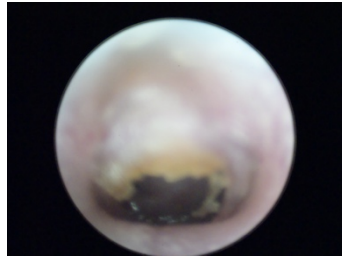


Día 76

Paciente 71: Rata 36 – OI (Excluido)

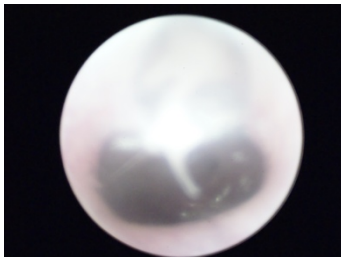


Día 0 (Íntegro)

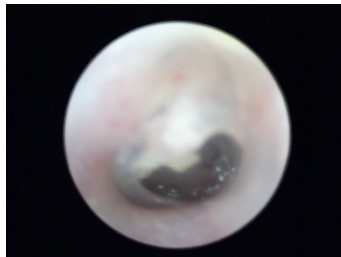


Día 56 (Infectado)

Paciente 72: Rata 36 – OD (Grupo D: Control)



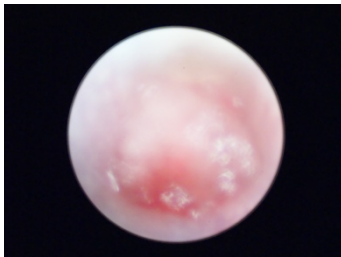
Día 0 (Íntegro)



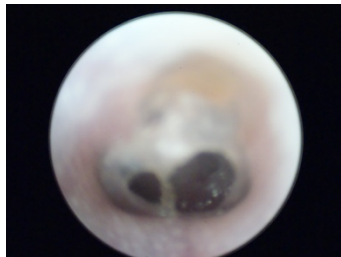
Día 56



Día 56 tras reavivar



Día 56 cutanplast externo



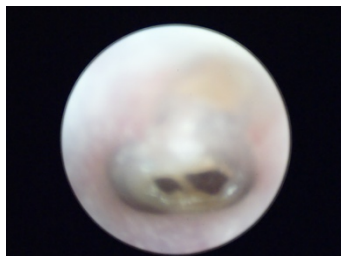
Día 60



Día 64



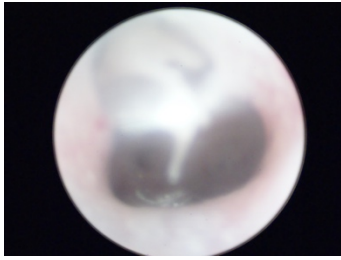
Día 68



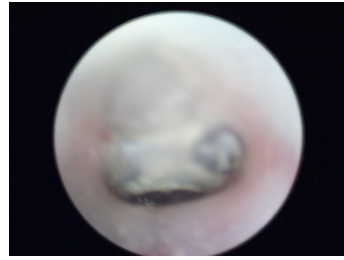
Día 72



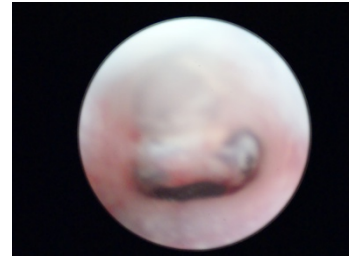
Día 76

Paciente 73: Rata 37 – OI (Grupo D: Control)

Día 0 (Íntegro)



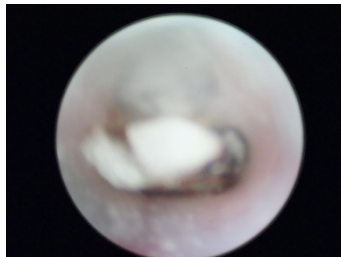
Día 56



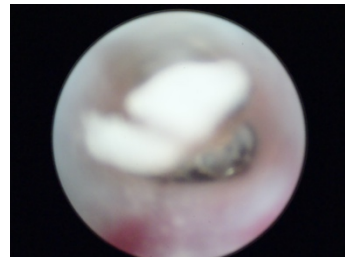
Día 56 tras reavivar



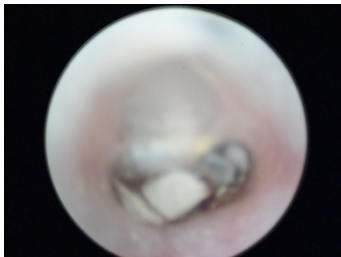
Día 56 cutanplast externo



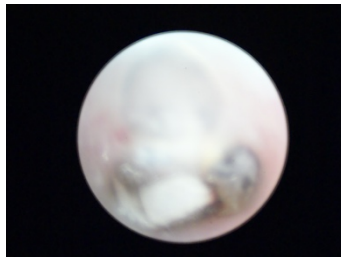
Día 60



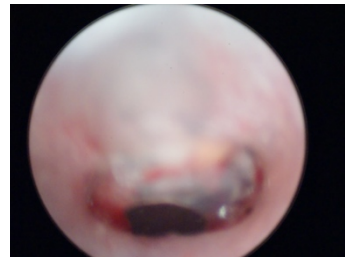
Día 64



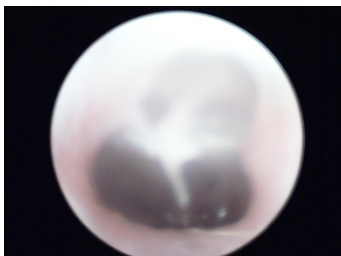
Día 68



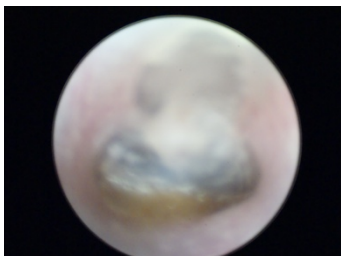
Día 72



Día 76 tras retirar cutanplast

Paciente 74: Rata 37 – OD (Excluido)

Día 0 (Íntegro)



Día 56 (Cerrado)