

Eficacia de la fenitoína en el cierre de las perforaciones timpánicas experimentales en ratas Wistar

Claudia Sofía Taboada Saavedra,* Adriana Carolina López Ugalde,* Fiacro Jiménez Ponce,* Sandra Berenice Raya Santoyo,* Luis Antonio Ortiz Morales,* Paola Basurto Madero*

Resumen

ANTECEDENTES

La perforación aguda de la membrana timpánica generalmente es resultado de infecciones o traumatismos. Las técnicas quirúrgicas para su reconstrucción hacen uso de distintos materiales y a menudo requieren anestesia general, con la consecuente morbilidad. La fenitoína tópica se ha usado en la cicatrización de úlceras varicosas por su efecto en la proliferación epitelial y es de fácil aplicación.

OBJETIVO

Determinar la eficacia de la fenitoína tópica en el cierre de perforaciones timpánicas en ratas Wistar.

MATERIAL Y MÉTODO

Se hizo un ensayo clínico experimental, prospectivo y longitudinal en 30 ratas Wistar macho a las que se les practicó una perforación timpánica en forma bilateral en los cuadrantes inferiores. Los animales se dividieron al azar en seis grupos (grupo A: control, sólo se perforó el oído, no se aplicó medicamento; grupo B: se aplicaron 100 mg de fenitoína en 1 mL de hipromelosa; grupo C: se administraron 50 mg/1 mL de hipromelosa; grupo D: 25 mg/1 mL de hipromelosa; grupo E: 12.5 mg/1 mL de hipromelosa; grupo F: sólo se aplicó solución salina en la perforación).

RESULTADOS

En el grupo control, se observó en la primera revisión que la perforación de uno de los oídos había cerrado; en la segunda revisión habían cerrado dos; en la última revisión, cinco, y en dos casos no cerró. En el grupo 2 (solución salina), no se había cerrado la perforación de ningún oído en la primera revisión; se habían cerrado tres en la segunda revisión, seis en la tercera revisión y en uno de ellos no cerró. En el tercer grupo, se corroboró que nueve perforaciones se habían cerrado en la primera revisión y una en la segunda. En el grupo 4, se observó el cierre en ocho oídos en la primera revisión, y en dos en la segunda. En el grupo 5, se comprobó el cierre de la perforación timpánica en 10 oídos en la primera revisión. En el grupo 6, hubo cierre en tres oídos en la primera revisión; de dos oídos en la segunda revisión, de tres oídos en la tercera revisión, y en dos casos no cerró.

Abstract

BACKGROUND

Acute perforation of the tympanic membrane is caused by infections or trauma. Surgical reconstruction techniques use different materials and often require general anesthesia, with the resulting morbidity. Phenytoin has been used topically in the healing of varicose ulcers by its effect on epithelial proliferation, besides the ease of application.

OBJECTIVE

To determine the effectiveness of topical phenytoin in the closure of eardrum perforations in Wistar rats.

MATERIAL AND METHOD

We designed an experimental, prospective and longitudinal clinical trial of 30 male Wistar rats that underwent a bilateral eardrum perforation in the lower quadrants. The rats were divided randomly into six groups (group A: control, perforated ears only, no medication was applied; group B: 100 mg of phenytoin in 1 mL of methylcellulose; group C: 50 mg/1 mL of methylcellulose; group D: 25 mg/1 mL of methylcellulose; group E: 12.5 mg/1 mL of methylcellulose; group F, only saline solution applied in perforation).

RESULTS

In the control group, one of the perforations healed in the first examination, two in the second examination, five healed in the last examination and two never healed. In group 2 (saline), none of the perforations healed in the first examination, three healed in the second examination, six in the third examination and one never healed. In the third group, 9 perforations healed in the first examination and one in the second. In the fourth group, eight perforations healed in the first examination and two in the second. In the fifth group, 10 perforations healed in the first examination. In the sixth group, three perforations healed in the first examination, two in the second examination, three in the third examination and two perforations never healed.

CONCLUSIONES

Las perforaciones timpánicas experimentales realizadas en ratas cierran espontáneamente en un periodo de dos semanas en 80% de los casos. La fenitoína acelera dicho cierre de acuerdo con la dosis aplicada tópicamente: la de 50 mg tiene el mejor efecto; por el contrario, la dosis de 100 mg produce los peores resultados.

Palabras clave:

perforación timpánica, fenitoína, ratas Wistar.

CONCLUSIONS

Experimental perforations of the tympanic membrane in rats healed spontaneously over a period of two weeks in 80% of cases. Phenytoin accelerates the healing according to the dose applied topically. The dose of 50 mg has the best effect; on the contrary, the dose of 100 mg produced the worst results.

Key words:

perforated eardrum, phenytoin, Wistar rats.

Introducción

La perforación aguda de la membrana timpánica generalmente es producida por alguna infección o traumatismo. Después de un traumatismo agudo, la membrana timpánica se engruesa como resultado del edema, la inflamación y la neovascularización, sobre todo de la capa fibrosa;¹ sin embargo, el principal cambio en el cierre de la perforación es el movimiento de queratina hacia el centro de la perforación, la proliferación epitelial y la neovascularización, en especial en la capa fibrosa.^{2,3}

En la práctica clínica, las perforaciones timpánicas crónicas son secuelas de otitis media aguda, otitis media serosa, otitis media crónica o alguna lesión traumática. En términos clínicos, una perforación puede describirse como crónica después de tres meses. Las perforaciones timpánicas agudas se curan, por lo general, en siete a diez días. La curación espontánea de perforaciones traumáticas ocurre en 78.7%. En el ámbito experimental, una perforación es crónica cuando dura 8 a 15 semanas.

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

Las dimensiones de la membrana timpánica son: 10 mm de altura y 9 mm de anchura; su grosor es de 0.05 a 0.09 mm, y su superficie de 65 mm². La membrana está orientada hacia delante, abajo y afuera.

Está compuesta por la unión de tres capas. La externa es cutánea (estrato cutáneo) y se continúa con la piel del conducto auditivo externo. La capa interna mucosa (estrato mucoso) está constituida por la mucosa de la cavidad timpánica. La intermedia es fibrosa y se distinguen varios tipos de fibras: una capa externa de fibras radiadas que se extienden entre el anillo fibrocartilaginoso y el mango del martillo, donde se insertan en el lado opuesto a su origen; una capa interna de fibras circulares; fibras parabólicas anteriores y posteriores y fibras arciformes o semilunares.⁴

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

La capa externa es una capa epitelial queratinizada típica; se compone de tres a cinco capas celulares. La capacidad de ésta de migrar lateralmente tiene características únicas. Las vías de migración son específicas, más rápidas en algunas partes de la membrana timpánica. La capa migratoria muestra

* Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, Hospital General de México.

Correspondencia: Dra. Claudia Sofía Taboada S. Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, Hospital General de México. Dr. Balmis 148, colonia Doctores, CP 06720, México, DF.

Recibido: abril, 2011. Aceptado: mayo, 2011.

Este artículo debe citarse como: 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):119-124.

disminución de la adherencia intercelular en las capas profundas y de la diferenciación en todas las capas. La migración ocurre en alguna parte del estrato basal y el espinoso debido a espacios intercelulares, procesos citoplásmicos y pocos desmosomas, aunque es posible que la migración ocurra en la membrana basal. La perforación incrementa la actividad mitótica, no en el borde de la perforación, sino en las células que están 2 mm después del punto de la lesión.

La membrana flácida de la membrana timpánica se compone de tres capas: dos capas epiteliales con una capa gruesa de tejido conectivo entre ellas. Es similar a la membrana tensa. Contiene una mayor proporción de fibras elásticas y carece de tejido conectivo altamente organizado que separe las capas. El epitelio de la membrana mucosa en esta región carece de cilios, es continua con la piel del conducto auditivo externo y el tejido conectivo.

Las primeras etapas de curación de la membrana timpánica siguen a las etapas de curación de heridas convencionales de hemostasia e inflamación. Las etapas proliferativas y migratorias son diferentes. Los principales cambios que produce el cierre de la perforación es el movimiento de la queratina hacia el centro de la perforación, la proliferación epitelial y la final formación de la nueva capa fibrosa. Alrededor de los márgenes de la perforación se produce una reacción exudativa compuesta de líquido intersticial, linfocitos y sangre; a esta formación se le llama costra, la cual protege al tejido subyacente previniendo la deshidratación y provee un medio ideal para la migración de células y el proceso de reparación. En pocos días se ve en la capa epitelial de la membrana timpánica, junto con la proliferación celular, un exceso en la producción de queratina, que es la llave de la dirección de la migración hacia el centro de la perforación. Debido a que el epitelio escamoso hiperplásico descansa sobre tejido de granulación, el cual es infiltrado por polimorfonucleares, el cierre del defecto inicialmente ocurre en la capa epitelial de queratina, pero después el tejido conectivo que lo soporta termina por cerrarla. La mucosa de la cavidad timpánica tiene una importancia mínima en el proceso de reparación, ya que es la más lenta.⁶

El estímulo de queratina inicial tiende un puente producido por una capa escamosa hiperplásica. Los puentes de queratina sirven como andamio para el epitelio. Esto es seguido por la capa de tejido conectivo. De esta manera, la curación de la perforación timpánica es única, y la capa epitelial es la primera, no la última, para tender un puente sobre la perforación. La capa de células mucosas puede tener participación, ya que proporciona el andamio. El epitelio queratinizado y las células suprabasales migran sobre esto. Mediante tinciones de actina F —una proteína citoesquelética contráctil—, se ha demostrado que las células basales se separan y migran en las

primeras 24 horas; después, proliferan y migran de manera suprabasal. La respuesta proliferativa máxima de las células basales ocurre a 2 mm del borde de la perforación.

El grosor promedio en el borde de la perforación es de 0.114 mm en comparación con el grosor normal de la membrana timpánica, que es de 0.05 a 0.09 mm. Una timpanoplastia implica la reconstrucción del mecanismo auditivo del oído medio, creando una cavidad libre de infección con una membrana timpánica intacta.

La reconstrucción sistemática de la membrana timpánica se inicia en la era moderna con los reportes de Wullstein y Zollner, quienes utilizaron piel de espesor parcial y total colocada sobre una membrana timpánica desepitelizada, pero desafortunadamente sobrevino eccema del injerto, inflamación y finalmente reperforación. Se han utilizado muchos materiales en la reparación de esta membrana, como: piel, cartílago, fascia de temporal, pericondrio, grasa, papeles, como el de arroz, y recientemente dermis acelular humana.

Las desventajas de las técnicas quirúrgicas de la timpanoplastia son: que con frecuencia tiene que aplicarse anestesia general, que hay que realizar incisiones para ampliar la exposición quirúrgica y la necesidad de reposo en el posoperatorio, lo que limita las actividades normales del paciente. Un abordaje favorable para las perforaciones timpánicas sería la administración de agentes bioabsorbibles que favorezcan su cierre, proporcionando un andamio para la migración epitelial, sin los efectos nocivos de la intervención quirúrgica. Tal agente podría colocarse bajo visión microscópica en un consultorio.

La fenitoína oral se introdujo en 1937 para el control de las crisis convulsivas. Se relaciona con los barbitúricos por su estructura química que afecta la corteza motora del cerebro, donde inhibe la actividad convulsiva por acción de los canales de sodio y calcio en el tejido neural. Muchos de los pacientes a los que se les ha administrado este fármaco (20%) durante tiempo prolongado sufren hiperplasia gingival; esto ha despertado el interés en su uso en la reparación de heridas.⁵

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

Los experimentos en cultivo de tejidos indican que la fenitoína estimula la proliferación de fibroblastos y del epitelio. Los fibroblastos de la hiperplasia inducida por fenitoína muestran una síntesis mayor de glucosaminoglucanos sulfatados.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la célula predominante en el tejido hiperplásico al que se le administró

fenitoína es el macrófago. Los macrófagos gingivales expuestos a la fenitoína secretan altas concentraciones de factor B de crecimiento derivado de plaquetas, además de estimular la secreción de IL-1 en tejidos inflamados.^{8,9}

Para valorar la efectividad de la fenitoína tópica en la preservación de la viabilidad de injertos de piel se realizó un estudio en 42 ratas divididas en dos grupos, a las que se les hizo una herida en el dorso. Un grupo fue tratado con fenitoína en ungüento a 10% y el otro, con vaselina. Se colocó el injerto una semana después de la aplicación diaria. Se registró la existencia de tejido de granulación sano, la reducción de la superficie de la herida y el tiempo de la integración del injerto. El ungüento de fenitoína indujo un incremento significativo en la viabilidad y la aceptación del injerto en el grupo de fenitoína comparado con el de vaselina.¹⁰

Objetivos

Objetivo general

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

Objetivos secundarios

Encontrar la dilución adecuada para el cierre de perforaciones timpánicas utilizando la menor cantidad de fármaco y conocer la anatomía del oído externo, el oído medio y la membrana timpánica de los roedores para elaborar posteriormente diseños experimentales.

Métodos

Se llevó a cabo un estudio experimental, longitudinal y observacional abierto en el cual se describieron los efectos de la fenitoína tópica en el cierre de perforaciones timpánicas en ratas, en el Servicio de Medicina Experimental del Hospital General de México.

Criterios de inclusión

Se eligieron ratas macho Wistar adultas de 250 a 350 g de peso, que tuvieran membranas timpánicas íntegras, con vacunas completas y bajo condiciones de cuidados e higiene establecidas en el bioterio.

Criterios de exclusión

Se excluyeron las ratas que no cumplieran con el periodo de seguimiento posterior a la aplicación de fenitoína, las que murieron durante el procedimiento, las que tuvieran perforación en los cuadrantes superiores y las ratas que sufrieron infección u afección ótica.

Definición de variables

La variable independiente, categórica ordinal fue la aplicación tópica de fenitoína de la siguiente manera:

Grupo A: control, sólo se perforó el oído y no se administró medicamento.

Grupo B: se aplicaron 100 mg de fenitoína en un mililitro de hipromelosa.

Grupo C: 50 mg/1 mL de hipromelosa.

Grupo D: 25 mg/1 mL de hipromelosa.

Grupo E: 12.5 mg/1 mL de hipromelosa.

Grupo F: sólo se aplicó solución salina en la perforación.

Se utilizaron variables intercurrentes y dependientes, cualitativas nominales dicotómicas.

Procedimiento

Previo a la realización del procedimiento, se hizo una disección de oído en una rata adulta. La rata fue sacrificada y se disecó por completo el hueso temporal, el cual se desarticuló de su unión al cráneo. Se observó un conducto auditivo externo amplio con un trayecto poco sinuoso que estaba formado por una porción cartilaginosa externa de aproximadamente 13 mm de largo y una porción ósea interna de casi 2 mm de longitud, que terminaba con el inicio del oído medio delimitado por la membrana timpánica, la cual tenía un diámetro de 2 mm, aproximadamente. Se hizo una revisión histopatológica de la pieza previa fijación en formol, seguida de descalcificación en ácido nítrico a 10% durante una hora y alcalinización en solución carbonatada durante 10 minutos. Se practicaron múltiples cortes de 3 a 5 micras en forma transversal a la membrana timpánica.

Se hicieron diluciones del medicamento a partir de cápsulas de difenilhidantoína de 100 mg en las siguientes preparaciones con 1 mL de hipromelosa: 12.5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL. Se vació el contenido de una cápsula de difenilhidantoína y se pesó en una balanza analítica, dividiendo el peso total en fracciones equivalentes a la cantidad que se deseaba preparar; se adicionó el polvo a 0.5 mL de hipromelosa y se mezcló en un agitador vórtex a 2,000 rpm durante dos minutos; después se dejó reposar el tiempo suficiente para que desaparecieran las burbujas que se formaron y se llevó a 1 mL de volumen con la hipromelosa. El resto de esa cápsula se dividió nuevamente en dos porciones iguales y se siguió el mismo procedimiento para las demás dosis. Se conservó en refrigeración para evitar la oxidación del fármaco y para que durara más.

Bajo anestesia con 40 mg/kg de ketamina más 10 mg/kg de xilacina por vía intramuscular, con técnica estéril y visión

microscópica, se hizo una perforación de la membrana timpánica de la rata en cuadrantes inferiores de 1 mm de diámetro.

Diez minutos después de hacer la perforación, se aplicó el medicamento correspondiente al grupo al cual se asignó la rata.

Al día 3 de la perforación se hizo la primera exploración de la membrana timpánica bajo visión microscópica con efectos de la anestesia utilizada anteriormente.

Al día 7 de la perforación se llevó a cabo la segunda exploración, también bajo visión microscópica.

A los 14 días del cierre de la perforación se sacrificaron las ratas con una megadosis de pentobarbital. Se observó la membrana timpánica al microscopio y se disecó el hueso temporal de una rata de cada grupo; la pieza se envió al Servicio de Patología del Hospital General de México para corroborar hallazgos de cicatrización.

Aspectos éticos

Con respecto a los lineamientos éticos, se siguió la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999.

Análisis estadístico

Se recabó información en la hoja de cálculo SPSS. Se hizo la estadística descriptiva con frecuencias, porcentajes y medidas de tendencia central, así como estadística analítica.

Resultados

Dos semanas después de hacer la perforación y aplicar el medicamento, se sacrificó a la rata con una megadosis de pentobarbital y se revisaron sus membranas timpánicas al microscopio. En la primera revisión se notó que se había cerrado la perforación en un oído del grupo 1 o control (10%); en la segunda revisión se cerraron dos (20%); en la última revisión se cerraron cinco (50%) y dos no se cerraron (20%). En el grupo 2 (solución salina) no se observó cierre de la perforación de ningún oído en la primera revisión; en la segunda se cerraron tres (30%); en la tercera revisión se cerraron seis (60%) y en uno no cerró (10%). En el tercer grupo (dosis de 12.5 mg), nueve oídos mostraron cierre de la perforación en la primera revisión (90%), y en un oído se notó integridad de la membrana timpánica hasta la segunda revisión (10%). En el grupo 4 (25 mg), se observó el cierre de la perforación en ocho oídos en la primera revisión (80%), mientras que dos oídos cerraron en la segunda revisión (20%). En el grupo 5 (50 mg), los 10 oídos mostraron cierre de la perforación timpánica en la primera revisión (100%). En el grupo 6 (100 mg), hubo tres oídos con cierre de la perforación en la primera revisión (30%), dos oídos con cierre en la segunda revisión (20%), tres oídos con cierre de la perforación en la tercera revisión (30%) y dos oídos no cerraron (20%) [Figura 1].

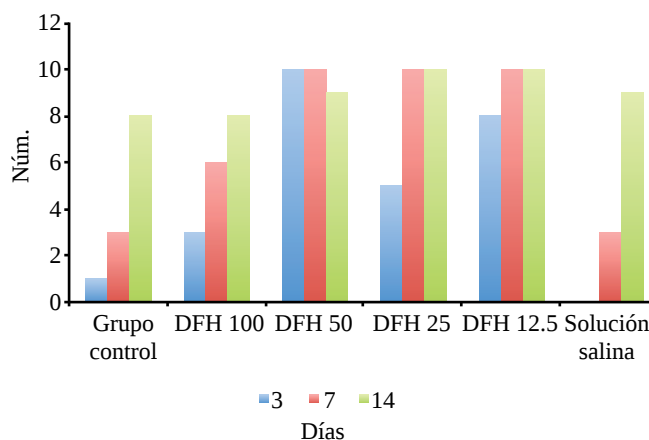


Figura 1. Membranas timpánicas íntegras en las distintas revisiones.

Conclusiones

Las perforaciones timpánicas experimentales realizadas en ratas cierran espontáneamente en un periodo de dos semanas en 80% de los casos. La fenitoína acelera su cierre de acuerdo con la dosis aplicada tópicamente. Se ha observado que la dosis de 50 mg produce los mejores resultados, ya que las perforaciones timpánicas se cierran a los tres días en 100% de los oídos; seguida por la dosis de 12.5 mg, que indujo el cierre en 90% de los oídos a la primera revisión; con la dosis de 25 mg se apreció el cierre en 80% a la primera revisión; por último, la dosis de 100 mg produjo los peores resultados, ya que sólo en 80% (cifra similar a la del grupo control) se logró el cierre de las perforaciones, muy probablemente debido a su consistencia demasiado espesa, lo cual hacía sumamente difícil su aplicación sobre la membrana timpánica.

Discusión

La función de la membrana timpánica íntegra es evitar procesos infecciosos en el oído medio. La aplicación de medicamentos tópicos que favorecen el cierre de una perforación timpánica es un procedimiento útil para lograrlo sin la morbilidad que representa una intervención quirúrgica. En la bibliografía se menciona que la fenitoína, a dosis de 100 mg por mL de hipromelosa, induce el cierre de las perforaciones timpánicas. De acuerdo con la experiencia de los autores de este estudio, la dilución de fenitoína que menos favorece el cierre de la perforación es la dosis de 100 mg, probablemente debido a su consistencia espesa, que la vuelve de difícil aplicación sobre la membrana timpánica. La mejor dilución es la de 50 mg, que es fácil de aplicar y acelera el cierre de las perforaciones.

Referencias

1. Santa Maria PL, Atlas MD, Ghassemifar R. Chronic tympanic membrane perforation: a better animal model is needed. *Wound Repair Regen* 2007;15(4):450-459.
2. Rahman A, Hultcrantz M, Dirckx J, Margolin G, von Unge M. Fresh tympanic membrane perforations heal without significant loss of strength. *Otol Neurotol* 2005;26(6):1100-1107.
3. Guneri E, Tekin S, Yilmaz O, Ozkara E, et al. The effects of hyaluronic acid, epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol* 2003;24:371-377.
4. Stenfeldt K, Johansson C, Hellstrom S. The collagen structure of the tympanic membrane collagen types I, II, and III in the healthy tympanic membrane, during healing of a perforation, and during infection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132:293-299.
5. Spiegel JH, Kessler J. Tympanic membrane perforation repair with acellular porcine submucosa. *Otol Neurotol* 2003;25:563-566.
6. Shaw J, Hughes CM, Lagan KM, Bell PM. The clinical effect of topical phenytoin on wound healing: a systematic review. *Br J Dermatol* 2007;157(5):997-1004.
7. Yadav JK, Singhvi AM, Kumar N, Garg S. Topical phenytoin in the treatment of split-thickness skin autograft donor sites: a comparative study with polyurethane membrane drape and conventional dressing. *Burns* 1993;19(4):306-310.
8. Estrada TC, Martínez C, Díaz de León MLV. Administración tópica de promotores de la cicatrización en perforaciones crónicas de la membrana timpánica. *An Orl Mex* 2008;53(2):75-80.
9. Bansal NK, Mukul. Comparison of topical phenytoin with normal saline in the treatment of chronic trophic ulcers in leprosy. *Int J Dermatol* 1993;32(3):210-213.
10. Pendse AK, Sharma A, Sodani A, Hada S. Topical phenytoin in wound healing. *Int J Dermatol* 1993;32(3):214-217.