



<https://doi.org/10.24245/aorl.v67i1.5564>

Efecto del 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) en la microbiota de pacientes pediátricos con otitis media crónica colesteatomatosa usando la secuenciación del ARNr 16S

Effect of sodium 2-mercaptoethanesulfonate (MESNA) on microbiota of pediatric patients with chronic cholesteatomatous otitis media using 16S bacterial ribosomal RNA sequencing.

Carlos de la Torre-González,¹ Luz Elvira Hernández-Alcántara,⁴ Uriel Gómez-Ramírez,² Norma Velázquez-Guadarrama³

Resumen

OBJETIVO: Evaluar los cambios en la microbiota en la otitis media crónica colesteatomatosa posterior a la aplicación de 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) en población pediátrica, a través de secuenciación de ARN ribosomal bacteriano 16S.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio subexperimental, prolectivo, efectuado en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, de diciembre de 2017 a diciembre de 2018. Se incluyeron niños con otitis media crónica colesteatomatosa operados de mastoidectomía primaria o de revisión. Se obtuvo ARN total de colesteatomas (antes y después de la aplicación de MESNA). Se determinó abundancia relativa, riqueza y diversidad a nivel de filo y género.

RESULTADOS: Se incluyeron 26 muestras de 13 niños de uno y otro sexo sin comorbilidades. Se identificó más del 98% de las secuencias en cuanto a filo, clase, orden y familia. La microbiota estuvo representada por los filos predominantes *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* y *Bacteroidetes*. En cuanto al género se observaron *Turicella* y *Alloccoccus* asociados con la enfermedad. Posterior a la aplicación de MESNA prevalecieron y aumentaron en abundancia los géneros *Propionibacteria* y *Staphylococcus* asociados con la microbiota habitual del oído medio. También se observó incremento en la diversidad de bacterias, aumento y surgimiento de otros géneros que forman parte de la microbiota endógena del oído medio.

CONCLUSIONES: El surgimiento y prevalencia de géneros presentes en la microbiota habitual de oído medio sano y la pérdida de géneros patógenos demuestran la utilidad del MESNA.

PALABRAS CLAVE: Otitis media; colesteatoma; MESNA; microbiota; ARNr 16s.

Abstract

OBJECTIVE: To evaluate the changes in the microbiota in the chronic cholesteatomatous otitis media after the application of sodium 2-mercaptoethanesulfonate (MESNA) in the pediatric population, through 16S bacterial ribosomal RNA sequencing.

¹ Jefe del Servicio de Otorrinolaringología.

² Posgrado en Ciencias Químico-Biológicas. Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas.

³ Investigador en Ciencias Médicas. Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Área de Genética Bacteriana.

Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, México.

⁴ Otorrinolaringóloga pediatra adscrita, Hospital Infantil de Veracruz, Veracruz, México.

Recibido: 27 de abril, 2021

Aceptado: 27 de enero 2020

Correspondencia

Carlos de la Torre González
carlosdltgz@hotmail.com

Este artículo debe citarse como:

De la Torre-González C, Hernández-Alcántara LE, Gómez-Ramírez U, Velázquez-Guadarrama N. Efecto del 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) en la microbiota de pacientes pediátricos con otitis media crónica colesteatomatosa usando la secuenciación del ARNr 16S. An Orl Mex 2022; 67 (1): 1-15.

MATERIALS AND METHODS: A subexperimental, prolective study done at the Otorhinolaryngology service of Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, from December 2017 to December 2018, including children with chronic cholesteatomatous otitis media who underwent primary or revision mastoidectomy. The RNA of cholesteatomas was obtained (before and after MESNA application). Relative abundance, richness and diversity were determined at the level of *phylum* and genera.

RESULTS: Twenty-six samples were included, corresponding to 13 children of both sexes, without comorbidities. It was possible to identify more than 98% of the sequences at the level of *phylum*, class, order, and family. The microbiota was represented by the predominant phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* and *Bacteroidetes*. At the genus level, *Turicella* and *Alloiooccus* were observed in association with the disease. Likewise, it was observed that after the application of MESNA, the genera *Propionibacteria* and *Staphylococcus* associated with the usual microbiota of the middle ear prevailed and increased in abundance. Similarly, an increase in the diversity of bacteria was observed, as well as an increase and emergence of other genera that are part of the endogenous microbiota of the middle ear.

CONCLUSIONS: The emergence and prevalence of genera present in the normal healthy middle ear microbiota and the loss of pathogenic genus demonstrate the usefulness of MESNA.

KEYWORDS: Otitis media; Cholesteatoma; MESNA; Microbiota; 16s rRNA.

ANTECEDENTES

La otitis media crónica colestomatosa se define como una infección recurrente o persistente que puede acompañarse de destrucción de los huesecillos y hueso temporal. En niños su comportamiento clínico es agresivo, invasivo y con altas tasas de recidiva. En la otitis media crónica colestomatosa la biopelícula bacteriana juega un papel fundamental en la resistencia antimicrobiana, cronicidad, recurrencia y agresividad de la enfermedad. Las comunidades bacterianas existentes en el oído medio forman biopelículas y las diferentes asociaciones bacterianas en la otitis media crónica colestomatosa cambian según el tipo de tratamiento, lo que repercute en el éxito o fracaso. Su identificación permitirá el desarrollo de tratamientos alternativos que logren modificar el comportamiento clínico de la enfermedad.

Por otra parte, la disección químicamente asistida mediante la aplicación del 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) ha mostrado ser efectiva en modelos experimentales y en estudios clínicos con humanos, facilitando la disgregación de la estructura del colestoma y de las biopelículas asociadas, disminuyendo las tasas de enfermedad residual. Lo anterior ha modificado el panorama en términos del pronóstico, en especial en población pediátrica.

El estudiar el efecto del MESNA en la microbiota de la otitis media crónica colestomatosa pediátrica permitiría generar nuevos conocimientos del efecto de diversos agentes químicos en su composición y diversidad que pudieran ser de utilidad en el tratamiento, curso clínico y pronóstico de la enfermedad.



Las biopelículas juegan un papel en la patogénesis de la otitis media crónica.¹ En la otitis media crónica colesteatomatosa, el colesteatoma frecuentemente se infecta en forma crónica y la formación de biopelículas bacterianas parece ser la responsable de la resistencia a los antibióticos tópicos y sistémicos.²

El filo *Proteobacteria* predomina en la mucosa normal del oído medio de niños y adultos, seguido de *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*.³ Sin embargo, en la otitis media crónica, la microbiota normal se modifica ante los cambios derivados de la inflamación crónica que favorecen el crecimiento y establecimiento de bacterias patógenas. Los mediadores expresados durante la inflamación como interleucina 1 (IL-1), factor activador de las plaquetas y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) inducen hipersecreción de mucina, hiperproliferación de células epiteliales y queratinocitos y resorción ósea por activación de colágenasas y osteoclastos.⁴ Asimismo, la administración frecuente e inapropiada de antibióticos tópicos y soluciones antisépticas crea un entorno adecuado para la resistencia a los microorganismos.⁵

En términos histológicos, se ha demostrado que la mayor carga bacteriana y formación de biopelículas ocasionan progresión y agresividad en la otitis media crónica, en especial, por su asociación con reclutamiento de osteoclastos y erosión ósea.^{2,6}

Un reporte que incluyó 20 estudios con 2254 pacientes pediátricos, de 1978 a 2003, mostró una tasa de recuperación bacteriana de solo el 35%.⁷ Quizá esto se deba a que no todas las bacterias son cultivables mediante métodos tradicionales. Algunas técnicas de biología molecular permiten identificar ampliamente a los patógenos asociados con la cronicidad y severidad del colesteatoma pediátrico.⁸ Minami y colaboradores usaron estas técnicas para comparar la

microbiota de adultos y niños sanos *versus* otitis media crónica, mostrando menor prevalencia de *Proteobacteria* y mayor prevalencia de *Firmicutes* en los pacientes con infección crónica del oído.³

Una de las características del colesteatoma en el niño que lo diferencian del adulto es su comportamiento clínico. Algunos autores han propuesto que la composición histopatológica es uno de los factores decisivos que pudieran explicar este comportamiento.³ Sin embargo, publicaciones recientes sugieren que las biopelículas bacterianas juegan un papel fundamental en la resistencia antimicrobiana, cronicidad, recurrencia y agresividad de la enfermedad.^{8,9,10}

En microbiología clínica, la identificación rápida y correcta de los agentes patógenos es un requisito esencial para el diagnóstico y aplicación posterior de un tratamiento adecuado. La identificación molecular basada en el ARNr 16S se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo. Esto último ha conducido al descubrimiento de nuevos agentes patógenos.

La secuenciación del ARNr 16S ha permitido a los investigadores aprovechar nueve regiones hipervariables (V1-V9) para identificar el ADN procariota sin confundirse con material genético eucariota.⁸

Los estudios de secuenciación del ARNr 16S permiten analizar la abundancia relativa a nivel de filo o género y obtener la riqueza y diversidad bacteriana.¹¹ En otitis media se han identificado los géneros *Turicella* y *Alloicoccus* en abundancias relativas significativas. Asimismo, se han reportado algunas especies de *Lactobacillus* y *Doloresgranulum*, que pueden ser protectores para el oído medio y desempeñar un papel en el desarrollo de probióticos como una nueva modalidad de tratamiento.¹²

Por otra parte, es indudable la utilidad del MESNA en el manejo quirúrgico de algunos padecimientos otológicos. En 2004 Yilmaz y colaboradores publicaron un estudio sobre el manejo de la otitis media adhesiva con bolsillos de retracción mediante la aplicación de MESNA. Observaron lisis de las adherencias entre la mucosa del oído medio y la membrana timpánica, con lo que se facilitaba su disección.¹³ Posteriormente, Kalcioğlu y Vicenti, en 2014, publicaron la efectividad del MESNA en el colesteatoma residual, reportando tasas significativamente menores de recidiva post-tratamiento, al demostrar la fragmentación de las capas de queratina con la aplicación del medicamento.^{14,15}

En 2016 en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil de México Federico Gómez se llevó a cabo un estudio prospectivo con el objeto de evaluar la utilidad del MESNA intraoperatorio en pacientes pediátricos con otitis media crónica colesteatomatosa; se observaron cambios en la estructura del colesteatoma (separación de láminas de queratina y desorganización de su estructura).¹⁶ Recientemente, De La Torre y colaboradores demostraron que el MESNA es capaz de desintegrar y separar la estructura de las biopelículas bacterianas en colesteatomas pediátricos.¹⁷

En la actualidad se reconoce al MESNA como un medicamento que disminuye significativamente la recurrencia de la otitis media crónica colesteatomatosa.¹⁷ Se sabe que el medicamento disgrega y separa las biopelículas bacterianas.¹⁸ Sin embargo, se desconoce si el compuesto químico tiene efecto en la frecuencia relativa de las bacterias presentes en el sitio anatómico de los pacientes, antes y después de su aplicación. Con el uso de técnicas moleculares como la secuenciación del ARNr 16S logran identificarse las comunidades bacterianas, así como su riqueza y diversidad.¹⁹

Con base en lo anterior, consideramos que pudieran existir cambios en la microbiota del colesteatoma en niños posterior a la aplicación de MESNA capaces de ser documentados mediante la secuenciación del ribosomal bacteriano 16S.

El objetivo de este artículo es evaluar los cambios que ocurren en la microbiota del colesteatoma de pacientes pediátricos, posterior a la aplicación de MESNA mediante la secuenciación del ARNr 16S.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio subexperimental, prolectivo, efectuado en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México, de diciembre de 2017 a diciembre de 2018. Se incluyeron pacientes pediátricos con diagnóstico de otitis media crónica colesteatomatosa operados de mastoidectomía primaria o de revisión. Se realizó un muestreo no probabilístico de casos consecutivos. La asignación fue no aleatoria.

El grupo de estudio incluyó pacientes con diagnóstico de otitis media crónica colesteatomatosa. Se contó con consentimiento informado que detalla ampliamente, tanto para el paciente como al familiar responsable, los objetivos del protocolo de investigación, la técnica quirúrgica, obtención de muestras, riesgos y posibles complicaciones.

El día previo al evento quirúrgico se solicitó la preparación de la dilución del MESNA a una concentración del 4%, que fue proporcionado por SAFE Productos Hospitalarios SA de CV.

Técnica quirúrgica

Paciente bajo anestesia general balanceada y previa asepsia y antisepsia de la región quirúrgica con solución ChlorPrep, se realizó



incisión retroauricular, disección por planos hasta el tejido muscular, elevación de colgajo de Palva y exposición de la región mastoidea. Posteriormente se realizó fresado de la cortical y exenteración de celdillas hasta completar mastoidectomía primaria en los oídos sin antecedente de cirugía o mastoidectomía de revisión en los pacientes con cirugía otológica previa. Se identificó y tomó muestra basal del colesteatoma, colocándose en un frasco con solución fisiológica. Posteriormente se instiló MESNA al 4% sobre el tejido de colesteatoma durante 10 minutos para, finalmente, realizar toma de muestra y colocación en un frasco con solución fisiológica. Se completó la mastoidectomía para el retiro del resto del colesteatoma con técnica de muro alto o muro bajo de acuerdo con el plan quirúrgico y hallazgos transoperatorios. Las muestras de colesteatoma, basal y con MESNA se transportaron de forma inmediata al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Infantil de México, donde permanecieron en solución fisiológica refrigeradas a 4°C.

Extracción de ARN del colesteatoma a partir de TRIzol reagent

Para la extracción del ARN total, se incubó durante 5 min y a temperatura ambiente una muestra de 50 mg de tejido inmerso en 500 µL de TRIzol reagent®. Durante la incubación, se procedió a macerar el tejido hasta disgregarlo completamente. A estos macerados, se les adicionaron 100 µL de cloroformo, se mezclaron vigorosamente durante 15 segundos y se procedió a recuperar la fase acuosa. Enseguida, a las muestras se adicionaron 250 µL de isopropanol, se incubaron por 10 min y centrifugaron por 10 min a 13000 rpm a 4°C para precipitar el ARN total; se recuperaron como un pellet de gel blanco en el fondo del tubo. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 µL de etanol al 75% por cada 500 µL de TRIzol usados para lisis. Se mezcló brevemente la muestra y

se centrifugó por 5 min a 13000 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 5-10 minutos. Por último, se resuspendió el pellet en 30 µL en agua libre de nucleasas y se calentó la muestra a 55-60°C por 15 minutos para su cuantificación.

Síntesis de cDNA

La concentración del ARN total de los colesteatomas se normalizó a una concentración final de 200 ng/µL. Para la síntesis de cDNA, se usó el kit SCRIPT cDNA Synthesis (Jena Bioscience, Jena) siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de cDNA de las muestras se normalizó a una concentración final de 50 ng/µL en un volumen final de 20 µL, a partir de una concentración inicial de 1000 ng/µL en volumen inicial de 20 µL. El cDNA de las muestras se envió a Zymo Research (California, Estados Unidos) para el análisis metagenómico de las regiones variables V3-V4 del gen 16S rRNA a través de la tecnología Illumina.

Aspectos éticos

Esta investigación estuvo dentro del acuerdo con las normas éticas del comité (institucional o regional) que supervisa la experimentación en seres humanos y con la Declaración de Helsinki de 1975, enmendada en 1983.

Definición del procesamiento y análisis de la información

Análisis metagenómico

Las 26 librerías se procesaron usando las plataformas Quantitative Insights into Microbial Ecology 2 (QIIME2 2019.4)²⁰ y Galaxy (<http://usegalaxy.org>). Las lecturas de baja calidad en cada librería se removieron de acuerdo con los siguientes criterios de calidad: secuencias cortas < 150 pb o > 470 pb y una calidad de Phred

< 20. Todas las secuencias de las librerías se alinearon usando PyNAST²⁰ y la eliminación de secuencias quimeras se realizó con Chimera Slayer.²¹ La asignación taxonómica en los niveles de filo y género se establecieron al 97% de corte en la base de datos Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/Download/>). La mejor secuencia de cada una de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de cada librería, antes y después del tratamiento, se utilizó para determinar la asignación taxonómica en los niveles de género y filo en la base de datos Greengenes (versión 13_8). Además, con estas secuencias representativas de las diferentes OTUs, se realizó un Blastn manual en la base de datos del NCBI para confirmar la identidad taxonómica.

Análisis estadístico

Con el paquete estadístico para las ciencias sociales (SPSS, versión 22.0) se realizó estadística descriptiva de las variables del estudio, reportándose las frecuencias y porcentajes, así como la medida de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar) cuando fue pertinente.

Para describir si había diferencia en la expresión de las bacterias antes y después del MESNA se utilizó la prueba χ^2 , se consideraron los valores estadísticamente significativos cuando el valor de p fue igual o menor de 0.05, con intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS

Se incluyeron 13 niños, 9 hombres y 4 mujeres, con edad media de 10.3 años (límites: 1-17 años). De los 13 pacientes, 3 tenían comorbilidades, como síndrome de Down y secuelas de labio y paladar hendido. En 11 de estos niños la cirugía fue primaria y en los 2 restantes se realizó cirugía de revisión. En todos se confirmó colesteatoma; en 3 se hizo mastoidectomía de muro alto y en el resto mastoidectomía de muro bajo.

Se obtuvieron 26 muestras. 13 correspondieron a colesteatoma previo a la aplicación de MESNA (pre-MESNA) y 13 se recolectaron después de su instilación (post-MESNA).

Los filos predominantes y más abundantes en las librerías de las 26 muestras analizadas (pre y post-MESNA) fueron *Firmicutes* (31.7%), *Proteobacteria* (29.8%), *Actinobacteria* (28.3%), *Cyanobacteria* (1.4%) y *Bacteroidetes* (6.8%). Las bacterias gramnegativas predominaron en el 67.5%. **Figura 1**

Del filo *Firmicutes* se obtuvieron las clases *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, *Negativicutes*. De las proteobacterias recabamos *alphaproteobacteria*, *betaproteobacterias*, *deltaproteobacterias*, *epsilonproteobacterias*, *gammaproteobacterias*. De las *Actinobacterias* la clase más predominante fue *Actinobacteria*. De los *Bacteroides* se identificaron la clase *bacteroidia*, *Cythophagia*, *Flavobacteriia* y *Sphingobacteriia*.

Por género, las más representativas fueron *Actinobacterias* (pre-MESNA [5/13] y post-MESNA [11/13]), *Corynebacterium* (pre-MESNA [10/13] y post-MESNA [6/13]), *Escherichia* (7/13) y (4/13) pre y post-MESNA, respectivamente, *Haemophilus* (4/13 y 5/13 pre y post-MESNA, respectivamente), *Pseudomonas* (8/13 y 9/13 pre y post-MESNA, respectivamente). Asimismo, otro de los géneros más frecuentes fue *Staphylococcus* (pre-MESNA: [9/13] y post-MESNA: [12/13]).

En el **Cuadro 1** se muestran las especies aisladas, así como su frecuencia, significación estadística y los intervalos de confianza correspondientes.

Proteus vulgaris (pre-MESNA: [3/13] y post-MESNA: [0/13], $p = 0.033$. IC95% 0.273-0.693) fue la única especie que mostró diferencia significativa pre y post-MESNA.

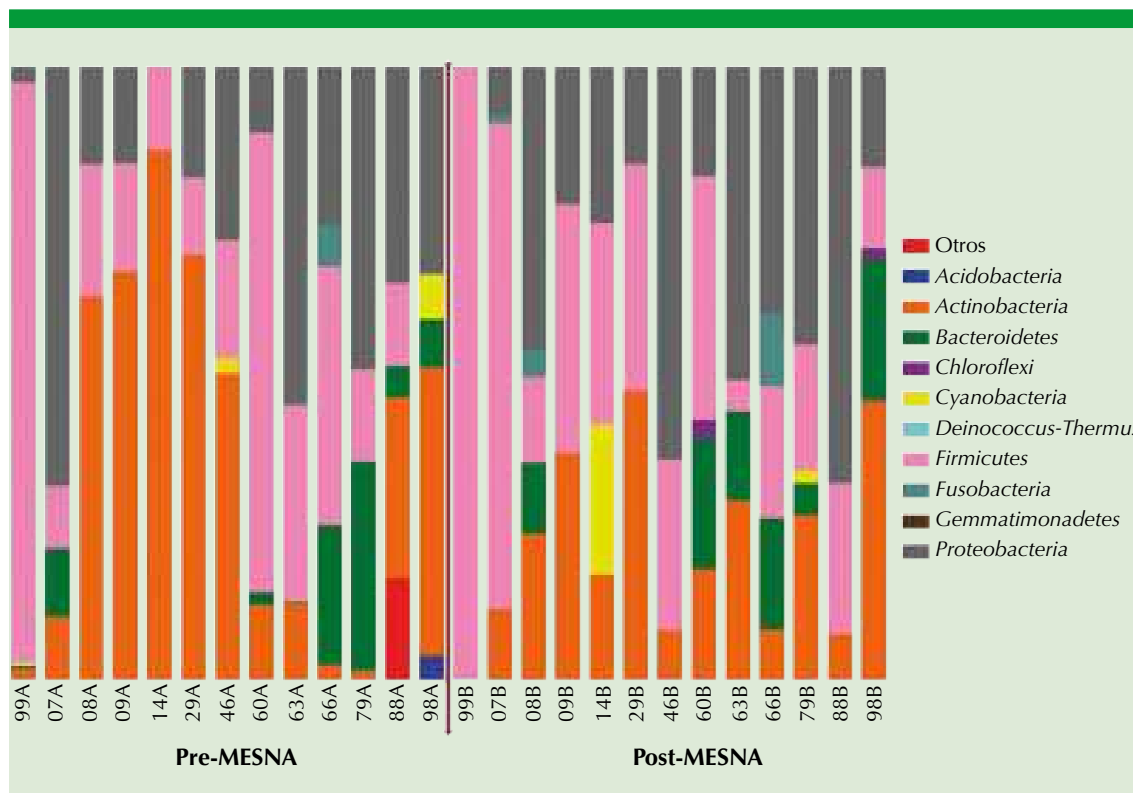


Figura 1. Comparación de las abundancias relativas a nivel de filo en pacientes pre-MESNA con otitis media crónica colesteatomatosa (99A-98A) y pacientes post-MESNA (99B-98B). En las muestras de pacientes pre-MESNA se observa predominio del filo *Actinobacteria*, al igual que en los pacientes post-MESNA. Se observa disbiosis de la microbiota previa a la aplicación del MESNA por paciente, con prevalencia y aumento de *Firmicutes* y *Proteobacteria* y disminución de actinobacterias.

En el 61.5% de las muestras hubo una prevalencia y aumento del género *Corynebacterium* posterior al uso de MESNA.

Turicella otitidis se halló en el 6.7% de las tomas (38.4% pre-MESNA); sin embargo, no pudo identificarse en las muestras post-MESNA.

Propionibacterium acnes se identificó en 11/13 muestras pre-MESNA y en 10/13 muestras post-MESNA. Cabe señalar que en 6 muestras se observó mayor riqueza en la abundancia relativa posterior a la administración del medicamento.

Figura 2

S. capitis-caprae-epidermidis se reportó en el 12.7% del total de muestras, sobre todo en el paciente 99 A (92.7%) donde fue el género dominante. En este mismo paciente se observó aumento en su abundancia en el 100% posterior a la administración de MESNA. Esta bacteria se reportó en 5/13 muestras pre-MESNA y en 10/13 muestras post-MESNA.

Se identificó *Pelomonas saccharophila* en 3/13 muestras pre-MESNA y en 4/13 muestras post-MESNA, *Pseudomonas fluorescens-yamanorum* en 4/13 muestras pre-MESNA y en 6/13 muestras post-MESNA mostrando aumento en su

Cuadro 1. Especies aisladas pre y post-MESNA (continúa en la siguiente página)

Bacteria	MESNA		p	RR	IC95%
	Pre Núm. (%)	Post Núm. (%)			
<i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i>	1 (7.7)	1 (7.7)	1.000	1.000	.056-17.231
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1 (7.7)	0	.232	.480	.319-.722
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2 (15.4)	0	.086	.458	.297-.708
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	1 (7.7)	0	.232	.480	.319-.722
<i>Brevundimonas staleyi</i>	1 (7.7)	0	.232	.480	.319-.722
<i>Burkholderia-Burkholderia-Paraburkholderia tropica</i>	0	2 (15.4)	.086	.458	.297-.708
<i>Campylobacter rectus-showae</i>	1 (7.7)	1 (7.7)	1.000	1.000	.056-17.903
<i>Campylobacter ureolyticus</i>	2 (15.4)	2 (15.4)	1.000	1.000	.119-8.421
<i>Corynebacterium accolens</i>	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	3 (23.1)	2 (15.4)	.618	.606	.083-4.405
<i>Corynebacterium amycolatum-argentoratense</i>	0	1 (7.7)	.232	.480	.319-.722
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	0	1 (7.7)	.232	.480	.319-.722
<i>Corynebacterium callunae</i>	1 (7.7)	0	.232	.480	.319-.722
<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>	1 (7.7)	0	.232	.480	.319-.722
<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	2 (15.4)	0	.086	.458	.297-.708
<i>Corynebacterium pseudogenitalium-tuberculostearicum</i>	3 (23.1)	2 (15.4)	.618	.606	.083-4.405
<i>Enterobacter NA</i>	1 (7.7)	0	.232	.480	.319-.722
<i>Enterococcus NA</i>	1 (7.7)	0	.232	.480	.319-.722
<i>Escherichia-Shigella NA</i>	0	1 (7.7)	.232	.480	.319-.722
<i>Escherichia-Shigella coli</i>	7 (53.8)	4 (30.8)	.234	.381	.077-1.896
<i>Haemophilus haemolyticus-influenzae</i>	2 (15.4)	1 (7.7)	.536	.458	.036-5.789
<i>Haemophilus influenzae</i>	1 (7.7)	1 (7.7)	1.000	1.000	.056-17.903
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0	1 (7.7)	.232	.480	.319-.722
<i>Haemophilus pittmaniae</i>	0	1 (7.7)	.232	.480	.319-.722
<i>Haemophilus sp62189</i>	0	1 (7.7)	.232	.480	.319-.722
<i>Helicobacter pylori</i>	1 (7.7)	0	.232	.480	.319-.722
<i>Mycobacterium chubuense-iranicum</i>	0	1 (7.7)	.232	.480	.319-.722
<i>Mycobacterium doricum-monacense</i>	1 (7.7)	0	.232	.480	.319-.722
<i>Mycobacterium gordonae</i>	2 (15.4)	0	.086	.458	.297-.708
<i>Neisseria elongata</i>	1 (7.7)	0	.232	.480	.319-.722
<i>Neisseria macacae-mucosa-sicca</i>	0	1 (7.7)	.232	.480	.319-.722
<i>Paracoccus-Paracoccus huijuniae-sp44862</i>	1 (7.7)	0	.232	.480	.319-.722
<i>Paracoccus tibetensis</i>	1 (7.7)	0	.232	.480	.319-.722
<i>Paracoccus yeei</i>	1 (7.7)	0	.232	.480	.319-.722
<i>Proteus hauseri</i>	2 (15.4)	1 (7.7)	.536	.458	.036-5.789

**Cuadro 1.** Especies aisladas pre y post-MESNA (continuación)

Bacteria	MESNA		p	RR	IC95%
	Pre Núm. (%)	Post Núm. (%)			
<i>Proteus hauseri-vulgaris</i>	1 (7.7)		0		.232
<i>Proteus mirabilis</i>	2 (15.4)		1 (7.7)		.536
<i>Proteus vulgaris</i>	3 (23.1)		0		.033
<i>Providencia rettgeri-vermicola</i>	1 (7.7)		0		.232
<i>Providencia stuartii</i>	1 (7.7)		0		.232
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1 (7.7)		0		.232
<i>Pseudomonas costantinii-fluorescens-poeae</i>	1 (7.7)		0		.232
<i>Pseudomonas fluorescens-yamanorum</i>	6 (46.2)		6 (46.2)		1.000
<i>Pseudomonas japonica-putida</i>	0		1 (7.7)		.232
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes-stutzeri</i>	0		1 (7.7)		.232
<i>Pseudomonas putida-taetrolens</i>	1 (7.7)		0		.232
<i>Ralstonia insidiosa</i>	1 (7.7)		3 (23.1)		.268
<i>Ralstonia pickettii</i>	0		1 (7.7)		.232
<i>Sphingomonas humi-kaistensis</i>	0		1 (7.7)		.232
<i>Sphingomonas panni</i>	0		1 (7.7)		.232
<i>Sphingomonas sp47912</i>	0		1 (7.7)		.232
<i>Staphylococcus argenteus-aureus-simiae</i>	2 (15.4)		1 (7.7)		.536
<i>Staphylococcus auricularis</i>	0		1 (7.7)		.232
<i>Staphylococcus capitis-caprae-epidermidis</i>	5 (38.5)		8 (61.5)		.239
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2 (15.4)		1 (7.7)		.536
<i>Staphylococcus epidermidis-hominis</i>	0		1 (7.7)		.232
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	1 (7.7)		0		.232
<i>Streptococcus mitis-pneumoniae</i>	1 (7.7)		0		.232
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 (7.7)		0		.232

abundancia relativa en el 30.7% de las muestras. **Figura 3**

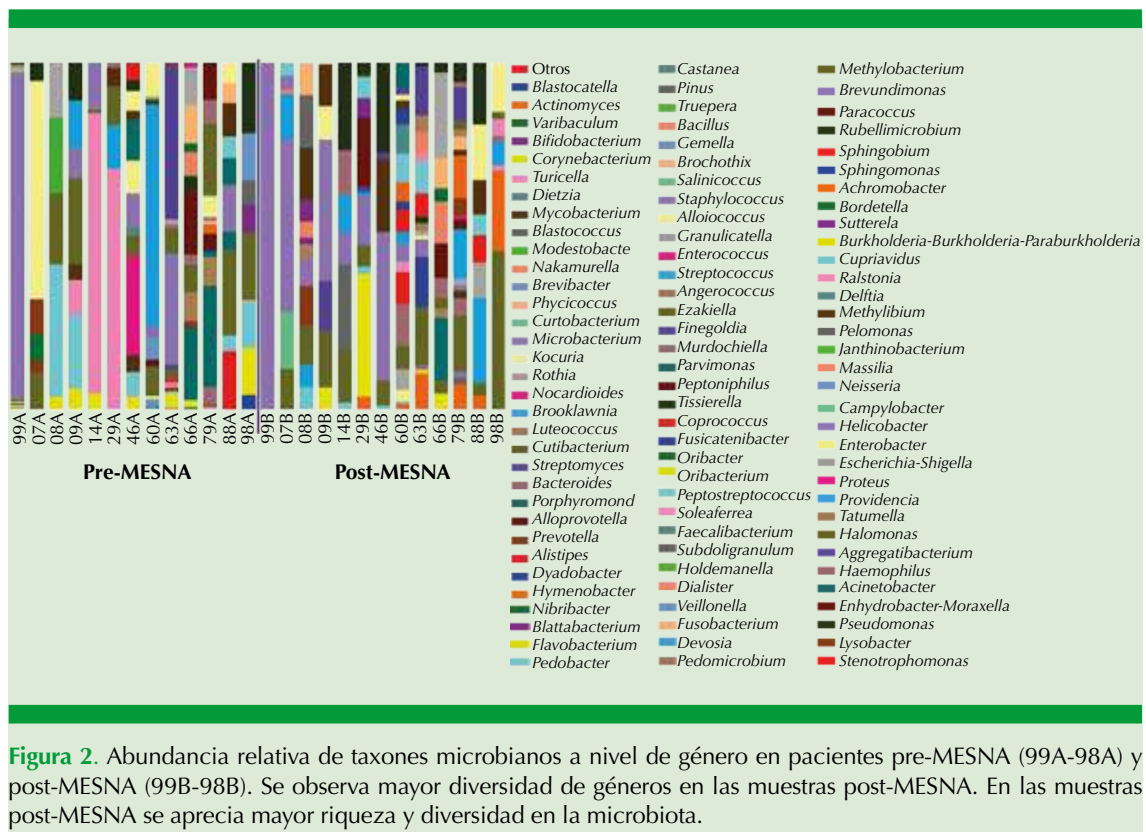
Escherichia-Shigella coli se identificó en 6/13 y 4/13 muestras pre y post-MESNA, respectivamente.

En ningún paciente se observó capacidad anti-biótica del MESNA; sin embargo, mostró efecto en el recambio o disbiosis en la microbiota prevalente.

DISCUSIÓN

Aunque no observamos agentes causales dominantes novedosos, nuestros resultados pueden contribuir al conocimiento de las especies que rara vez se ven en la otitis media crónica colesteatomatosa.

El desarrollo de nuevas tecnologías con enfoques moleculares ha permitido realizar una investiga-



ción detallada de la diversidad y complejidad de los microorganismos que pueden estar presentes en las diversas muestras de tejidos.¹²

T. otitidis fue un patógeno claramente dominante en cinco muestras pre-MESNA, lo que coincide con otras investigaciones.^{12,22} La discusión sobre el papel de este agente como colonizador del conducto auditivo externo o como patógeno ha sido motivo de múltiples debates; nuestros resultados sugieren que, en algunos casos de otitis media crónica, podría ser un agente causal, como se reportó en otro estudio.²³

La proporción de *A. otitidis* en el total de nuestras muestras de otitis media crónica colesteatomatosa fue menor a la reportada en estudios previos¹² y fue el patógeno dominante en un solo paciente. Se sabe que es capaz

de formar biopelículas de una o varias especies con *Haemophilus influenzae*. Cuando está presente en las biopelículas microbianas, aumenta la supervivencia y favorece la producción de biopelículas en condiciones adversas, favoreciendo la resistencia a los antimicrobianos.^{24,25}

Debido a la cuantificación relativa, que es una característica del perfil del gen 16S, podemos distinguir los patógenos dominantes presentes en grandes cantidades de las señales de las bacterias presentes en pequeñas cantidades, cuya participación patógena podría ser poco probable.

Propionibacterium forma parte de la microbiota normal de la piel, boca e intestino. Se cree que participa en la estabilización de la microbiota normal al ocupar sitios que no pueden ser

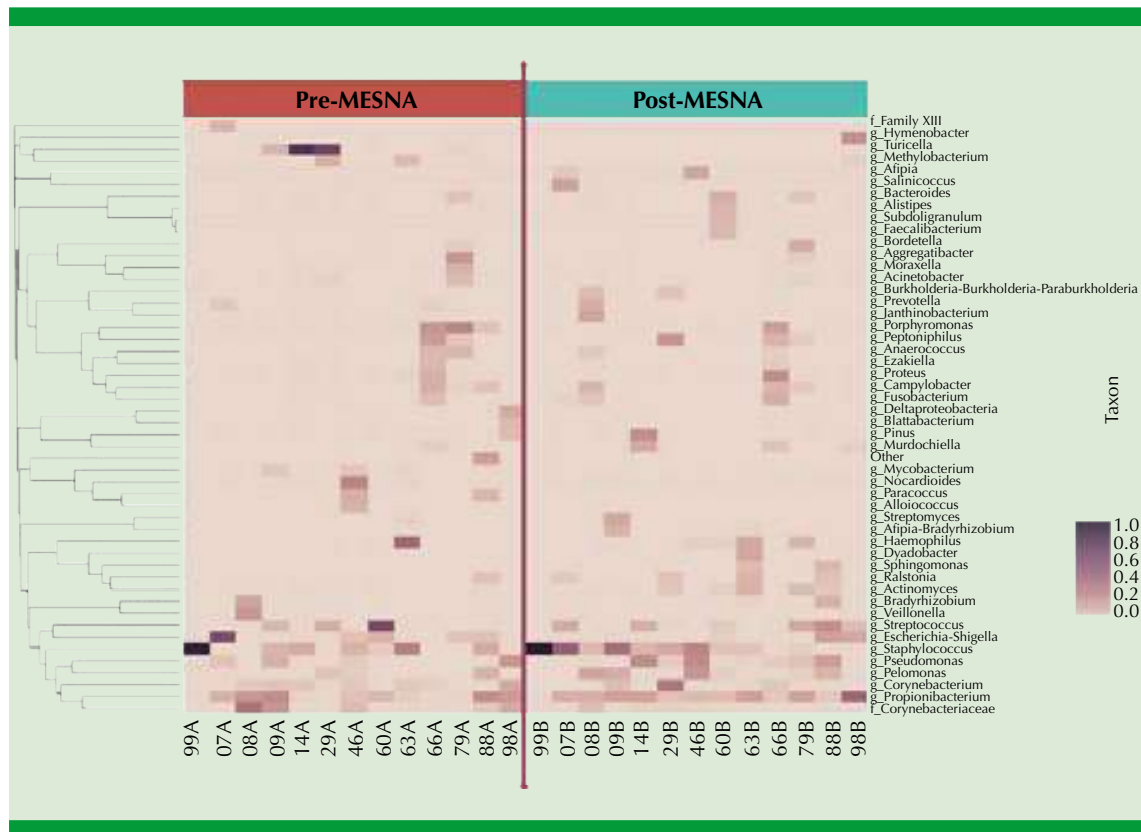


Figura 3. Mapa de calor que representa la abundancia de los taxones a nivel de género prevalente y más abundante por paciente, antes y después de la aplicación de MESNA. En este mapa se observa la abundancia relativa de géneros implicados en la enfermedad como: *Turicella* y *Alloiooccus*. Asimismo, se observa que en las muestras post-MESNA prevalecen y aumentan en abundancia los géneros propionobacterias y *Staphylococcus*. Además, se observa incremento en la diversidad de bacterias, aumento y surgimiento de otros géneros que forman parte de la microbiota endógena del oído medio.

invasión por patógenos.^{25,26} Es posible que se produzcan perturbaciones en la microbiota común debido a la administración excesiva de antibióticos, a la inmunidad afectada (o a ambos), y que esto favorezca el surgimiento de la enfermedad. En este trabajo pudo observarse la microbiota prevalente previo a la administración de medicamento y cómo prevaleció el aumento de la abundancia relativa, riqueza y diversidad posterior a la administración del MESNA. El MESNA no es una sustancia bactericida; sin embargo, favorece la quimiodisección quirúrgica al romper los puentes disulfuro, propiedad que

podría ayudar a la disbiosis de la microbiota presente en los pacientes con otitis media crónica colesteatomatosa, favoreciendo a la microbiota del oído medio con bacterias protectoras, como *Propionibacterium*.^{27,28}

Se ha establecido que la otitis media crónica resulta del paso de bacterias que ascienden desde la nasofaringe a través de la trompa de Eustaquio hacia el oído medio o que invaden el conducto auditivo externo a través de una perforación de la membrana timpánica.²² En otros estudios se ha demostrado la detección de géneros bacterianos

vinculados con su capacidad para la formación de biopelículas, como sucede con especies de *Pseudomonas*, *Turicella* y *Alloiococcus*.¹⁸ En este estudio, *Pseudomonas*, *Turicella* y *Alloiococcus* no se identificaron después de la aplicación de MESNA, lo que genera expectativas en la administración de este compuesto.

Los hallazgos preliminares de nuestro estudio deberán validarse en el futuro con tamaños de muestra más grandes, para tener resultados con significación estadística, así como tener mayor diversidad de bacterias que podamos encontrar en el colesteatoma pediátrico. Esta información permitiría analizar parámetros de biodiversidad importantes en los estudios de metagenómica.

Al igual que otros autores, con este estudio confirmamos que el análisis de secuenciación de nueva generación permite obtener mayor positividad del método y esto puede explicarse por su capacidad para detectar microbiomas acumulativos en una muestra y su capacidad para detectar bacterias con baja abundancia.^{19,23} Este método también permite la identificación de organismos poco frecuentes dentro de una comunidad polimicrobiana, que de otra manera serían enmascarados por bacterias dominantes en un ensayo tradicional basado en cultivos o pirosecuenciación (basado en la clonación y secuenciación del gen 16S). Gracias a esta sensibilidad fue posible identificar bacterias, consideradas no relevantes, en nuestros pacientes con otitis media crónica colesteatomatosa.

Los estudios del oído medio relacionados con ARNr 16S comenzaron en el decenio de 1980 y principios del de 1990.¹² En nuestra investigación pudimos observar que con una pequeña cantidad de muestra fue posible obtener aislamientos de microorganismos que de otra forma y con el uso de técnicas convencionales no hubiera sido posible.

P. aeruginosa, *Proteus* spp, *S. aureus*, *Bacteroides* spp, *Clostridium* spp y *Bifidobacterium* spp son géneros que se han reportado en los casos de colesteatoma extenso y asociado con complicaciones.^{19,23} De acuerdo con nuestros resultados preliminares, la existencia de bacterias gramnegativas, grampositivas, aerobias y anaerobias en muestras de colesteatoma está acorde con diversas publicaciones.

La colonización nasal con *Staphylococcus* y eventos como la rinitis pueden alterar el microbioma del oído medio, de tal forma que pudiéramos encontrarlo también dentro del oído medio.^{24,25} En este estudio se identificó al género *Staphylococcus* en mayor abundancia relativa posterior a la administración de MESNA, resultado que permite por primera vez demostrar que la aplicación de MESNA podría ayudar en el recambio de la microbiota del oído medio presente en los pacientes con otitis media crónica, favorecer la disbiosis y la colonización por géneros protectores.

Un informe anterior mostró que los filos *Actinobacteria* y *Firmicutes* representan un gran porcentaje de los microbiomas en el oído medio y la nariz. Estudios recientes también revelaron que la mayor parte de las bacterias aisladas del oído medio normal de individuos sanos eran especies de *Staphylococcus* coagulasa negativas (63-83%) y *Corynebacterium diphtheriae* (19-32%). En este estudio se observó prevalencia y aumento en la abundancia relativa de géneros protectores posterior a la administración de MESNA, mismas que en otro estudio se mencionan como bacterias protectoras de la vía aérea superior.²⁹

Como se ha visto en otros trabajos de la aplicación de MESNA en otitis media crónica colesteatomatosa en niños, además de tener efecto en las láminas de queratina (rompiendo los enlaces disulfuro), provoca alteraciones en



la estructura de las biopelículas y su separación del tejido de colesteatoma.

En este trabajo pudimos observar que quizá el MESNA favorezca que ciertos géneros bacterianos aumenten en abundancia relativa, debido a que se han disminuido las proteínas de adhesión y expresión de exopolisacáridos relacionados con la unión y formación de las biopelículas, perdiendo su protección. De esta forma, surge la interrogante sobre la posibilidad de que los géneros bacterianos sean más sensibles a los antibióticos posterior a la aplicación de MESNA.

Debido a las hipótesis que se han formulado en trabajos previamente publicados, el MESNA pudiera ser un facilitador para otras opciones terapéuticas al alterar la estructura de las biopelículas. Los efectos del MESNA en las biopelículas no se ha estudiado exhaustivamente. Un estudio reciente con *E. coli* mostró que el compuesto era capaz de inhibir las fases iniciales de adhesión y formación de biopelículas, destruyendo las membranas maduras, reduciendo las concentraciones de proteínas extracelulares y exopolisacáridos e inhibiendo la expresión de genes asociados con proteínas de adhesión y la expresión de exopolisacáridos.

Por último, el papel del MESNA en la otitis media crónica colesteatomatosa pudiera ubicarse plenamente en el manejo quirúrgico del colesteatoma a través de una disección químicamente asistida.²⁹ Los estudios previos que mostraron su efecto en la disgregación de las biopelículas¹⁸ nos motivaron a la búsqueda de beneficios adicionales del compuesto en los microorganismos presentes en esta enfermedad; sin embargo, los resultados preliminares de esta investigación no muestran efectos positivos en cuanto a lisis o propiedades bactericidas en los gérmenes bacterianos. No obstante, sí observamos cambios en la microbiota. La expresión y repercusión

clínica de estos cambios deberá ser motivo de otros estudios, con un tamaño de muestra más representativo.

Limitación de estudio

El tamaño de la muestra es muy pequeño para poder demostrar el efecto del MESNA en la eliminación bacteriana, por lo que se propone continuar.

CONCLUSIONES

En otras investigaciones se ha concluido que el MESNA no causa lisis bacteriana ni muestra propiedades bactericidas. Sin embargo, en nuestro estudio se observó que el uso de MESNA provoca disbiosis en la microbiota del paciente con la eliminación de géneros patógenos y el surgimiento de géneros protectores. Lo anterior fue posible al realizar técnicas de biología molecular, como la secuenciación del ARN ribosomal bacteriano 16S.

Asimismo, al igual que otras investigaciones, se concluye que el MESNA inhibe la adhesión y formación de biopelículas de bacterias, provoca disbiosis y aumento de la abundancia relativa de la microbiota del oído medio, lo que podría ser motivo de una línea de investigación para valorar su relación con las bacterias comensales como factor protector. La expresión y repercusión clínica de los cambios observados deberá ser motivo de otros estudios, con un tamaño de muestra más representativo.

Agradecimientos

Deseamos manifestar nuestro agradecimiento a la Dra. Gabriela Tercero Quintanilla, doctora en ciencias, por su apoyo en la revisión metodológica y análisis estadístico, así como a la Dra. Annery R Peguero por su colaboración en la redacción de una parte del manuscrito.

REFERENCIAS

1. Post JC. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. 2001. *Laryngoscope* 2015; 125 (9): 2003-14. doi: 10.1002/lary.25291.
2. Galli J, Calò L, Giuliani M, Sergi B, Lucidi D, Meucci D, et al. Biofilm's role in chronic cholesteatomatous otitis media: A pilot study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2016; 154 (5): 914-6. doi: 10.1177/0194599816630548.
3. Minami SB, Mutai H, Suzuki T, Horii A, Oishi N, Wasano K, et al. Microbiomes of the normal middle ear and ears with chronic otitis media. *Laryngoscope* 2017; 127 (10): E371-E377. doi: 10.1002/lary.26579.
4. Frickmann H, Zautner AE. Cholesteatoma? A potential consequence of chronic middle ear inflammation. *Otolaryngol* 2012; 55: 001. Doi: 10.4172/2161-119X.S5-001
5. Kaya E, Dag I, Incesulu A, Gurbuz M, Acar M, Birdane L. Investigation of the presence of biofilms in chronic suppurative otitis media, nonsuppurative otitis media, and chronic otitis media with cholesteatoma by scanning electron Microscopy *Scien World J* 2013: 1-6. doi. org/10.1155/2013/638715.
6. Chole RA, Faddis BT. Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128 (10): 1129-33. doi: 10.1001/archotol.128.10.1129.
7. Brook I. The role of anaerobic bacteria in chronic suppurative otitis media in children: Implications for medical therapy. *Anaerobe* 2008; 14 (6): 297-300.
8. Nogues JC, Pérez-Losada M, Preciado D. Review of otitis media microbiome studies: What do they tell us? *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 2020; 5 (5): 936-940.
9. Bassiouny M, Badour N, Omran A, Osama H. Histopathological and immunohistochemical characteristics of acquired cholesteatoma in children and adults. *Egypt J Ear Nose Throat Allied Scien* 2012; 13 (1): 7-12.
10. Maniu A, Harabagiu O, Perde-Schrepler M, Cătană A, Fănuță B, Mogoantă CA. Molecular biology of cholesteatoma. *Rom J Morphol Embryol* 2014; 55: 7-13.
11. Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (12): 6123-5. doi: 10.1128/JCM.43.12.6123-6125.2005.
12. Kalcioğlu MT, Guldemir D, Unaldi O, Egilmez OK, Celebi B, Durmaz R. Metagenomics analysis of bacterial population of tympanosclerotic plaques and cholesteatomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2018; 159 (4): 724-732. doi: 10.1177/0194599818772039.
13. Yilmaz M, Goksu N, Bayramoglu I, Bayazit YA. Practical use of MESNA in atelectatic ears and adhesive otitis media. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2006; 68 (4): 195-8. doi: 10.1159/000091472.
14. Kalcioğlu MT, Cicek MT, Bayindir T, Ozdamar OI. Effectiveness of MESNA on the success of cholesteatoma surgery. *Am J Otolaryngol* 2014; 35 (3): 357-61. doi: 10.1016/j.amjoto.2014.01.002.
15. Vincenti V, Magnan J, Saccardi MS, Zini C. Chemically assisted dissection by means of mesna in cholesteatoma surgery. *Otol Neurotol* 2014; 35 (10): 1819-24. doi: 10.1097/MAO.0000000000000514.
16. Mantilla E. Uso de MESNA en el tratamiento de colesteatoma adquirido de oído medio en niños. Evaluación mediante microscopía de luz y electrónica. Tesis sub-especialidad Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
17. De la Torre González C, Huante-Guido M, Velázquez Guadarrama N, Preciado D, Patiño López G. Changes in biofilm in chronic cholesteatomatous otitis media in children following the application of sodium 2-mercaptoethane-sulfonate (MESNA). *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2018; 110: 48-52.
18. Casale M, Di Martino A, Salvinelli F, Trombetta M, Denaro V. MESNA for chemically assisted tissue dissection. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19 (6): 699-707. doi: 10.1517/13543784.2010.485192.
19. Ju F, Zhang T. 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99 (10): 4119-29. doi: 10.1007/s00253-015-6536-y.
20. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010; 7 (5): 335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303.
21. Haas BJ, Gevers D, Earl AM, Feldgarden M, Ward DV, Gianoukos G, et al.; Human Microbiome Consortium, Petrosino JF, Knight R, Birren BW. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res* 2011; 21 (3): 494-504. doi: 10.1101/gr.112730.110.
22. Ricciardiello F, Cavaliere M, Mesolella M, Iengo M. Notes on the microbiology of cholesteatoma: clinical findings and treatment. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2009; 29 (4): 197-202.
23. Neeff M, Biswas K, Hoggard M, Taylor M, Douglas R. Molecular Microbiological Profile of Chronic Suppurative Otitis Media. *J Clin Microbiol* 2016; 54 (10): 2538-2546.
24. Madana J, Yolmo D, Kalaiarasi R, Gopalakrishnan S, Sujatha S. Microbiological profile with antibiotic sensitivity pattern of cholesteatomatous chronic suppurative otitis media among children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011; 75 (9): 1104-1108.
25. Boers SA, de Zeeuw M, Jansen R, van der Schroeff MP, van Rossum AMC, Hays JP, et al. Characterization of the nasopharyngeal and middle ear microbiota in gastroesophageal reflux-prone versus gastroesophageal reflux non-prone children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 37 (5): 851-857. doi: 10.1007/s10096-017-3178-2.
26. Su Z, Ning B, Fang H, Hong H, Perkins R, Tong W, Shi L. Next-generation sequencing and its applications in molecular



- diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2011; 11 (3): 333-43. doi: 10.1586/erm.11.3.
27. Santos-Cortez RL, Hutchinson DS, Ajami NJ, Reyes-Quintos MR, Tantoco ML, Labra PJ, et al. Middle ear microbiome differences in indigenous Filipinos with chronic otitis media due to a duplication in the A2ML1 gene. *Infect Dis Poverty* 2016; 5 (1):97. doi: 10.1186/s40249-016-0189-7.
28. Pettigrew MM, Laufer AS, Gent JF, Kong Y, Fennie KP, Metlay JP. Upper respiratory tract microbial communi- ties, acute otitis media pathogens, and antibiotic use in healthy and sick children. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78 (17): 6262-70.
29. De la Torre C, Villamor P. Chemically assisted dissection with sodium 2-mercaptoethanesulfonate (MESNA) in the surgical management of pediatric cholesteatoma. *Otol Neurotol* 2019; 40 (5): 645-650.