



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Cronificación de Perforación Timpánica en  
Ratas con Mitomicina C**

**D. Tomás Esteban Sánchez  
2015**



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

*CRONIFICACIÓN DE PERFORACIÓN  
TIMPÁNICA EN RATAS CON MITOMICINA C*

Doctorando: Tomás Esteban Sánchez

Director: Dr. José María Moraleda Jiménez  
Codirectores: Dra. Carmen García De Insausti  
Dra. Noemí Marín Atucha



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero dar las gracias a los directores de esta tesis. Al Dr. Jose M<sup>a</sup> Moraleda Jiménez por acogerme y guiar mis pasos, estimulándome en todo momento. A la Dra. Carmen García De Insausti por los buenos consejos y oportunas correcciones. Y a la Dra. Noemí Marín Atucha porque ha sido mi guía en el día a día del laboratorio.

En segundo lugar quiero agradecer al Dr. Mathieu Kessler la ayuda que me ha dispensado en la elaboración del estudio estadístico.

No me quiero olvidar de mi amigo Javier Moraleda que despertó en mí el proyecto que dormía desde la juventud.

Gracias a todos vosotros se ha hecho realidad un sueño.

También quiero agradecer el apoyo que me ha dado en todo momento mi familia, que es el sentido de mi vida.



## **ÍNDICE**



|   |              |
|---|--------------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>  | <b>3-20</b>  |
| 1.1 Otitis media crónica.....   | 3            |
| 1.2 Anatomía del oído.  |              |
| 1.2.1 Descripción anatómica del oído humano.....                                | 3            |
| 1.2.2 Descripción anatómica de la membrana timpánica humana.....                | 5            |
| 1.3 Histología de la membrana timpánica.  |              |
| 1.3.1 Histología de la membrana timpánica humana.....                           | 6            |
| 1.3.2 Histología de la membrana timpánica de la rata.....                       | 7            |
| 1.4 Patología de oído con afectación timpánica.                                 |              |
| 1.4.1 Perforaciones timpánicas agudas.....                                      | 8            |
| 1.4.2 Perforaciones timpánicas crónicas.....                                    | 8            |
| 1.4.3 Otitis media crónica seromucosa.....                                      | 12           |
| 1.5 Modelos animales.   |              |
| 1.5.1 Ensayos de cronificación de las perforaciones timpánicas en animales..... | 17           |
| <br>  |              |
| <b>2 JUSTIFICACIÓN</b>  | <b>23-24</b> |
| <br>  |              |
| <b>3 OBJETIVOS</b>  | <b>27</b>    |
| <br>  |              |
| <b>4 MATERIAL Y MÉTODO</b>  | <b>31-42</b> |
| 4.1 Instalaciones físicas.....  | 31           |
| 4.2 Diseño del estudio.....   | 32           |
| 4.3 Animales.....   | 34           |
| 4.4 Procedimiento.....  | 35           |
| 4.4.1 Primeras intervenciones del grupo A.....                                  | 36           |
| 4.4.2 Revisiones del grupo A.....   | 39           |
| 4.4.3 Primeras intervenciones del grupo B.....                                  | 39           |
| 4.4.4 Revisiones del grupo B.....   | 40           |



|   |              |
|---|--------------|
| 4.4.5 Primeras intervenciones del grupo C.....                                      | 40           |
| 4.4.6 Revisiones del grupo C.....   | 41           |
| 4.5 Estudio Estadístico .....   | 42           |
| <b>5 RESULTADOS</b>   | <b>45-58</b> |
| 5.1 Recogida de datos.....  | 45           |
| 5.2 Peso.....   | 49           |
| 5.3 Tiempo de duración de las perforaciones timpánicas                              |              |
| 5.3.1 Duración de las perforaciones timpánicas tratadas<br>con Solución Salina..... | 50           |
| 5.3.2 Duración de las perforaciones timpánicas tratadas<br>con Mitomicina C.....    | 51           |
| 5.4 Análisis Estadístico .....  | 54           |
| 5.5 Revisión a las 8 y 13 semanas.....  | 56           |
| 5.6 Resumen de resultados.....  | 57           |
| <b>6 DISCUSIÓN</b>  | <b>61-75</b> |
| <b>7 CONCLUSIONES</b>   | <b>79</b>    |
| <b>8 REFERENCIAS</b>  | <b>83-90</b> |
| <b>9 ANEXOS</b>   |              |





## **1 INTRODUCCIÓN**



## 1.1 Otitis media crónica

La otitis media crónica en humanos es una patología del oído medio con una duración mayor de tres meses, que se presenta como distintas entidades clínicas: otitis seromucosa, otitis mucosa abierta, perforación timpánica, timpanoesclerosis, otitis colesteatomatosa, otitis granulomatosa, otitis adhesiva y otitis atelectásica<sup>1</sup>. La patología más frecuente de las descritas es la perforación timpánica con una prevalencia ajustada por la edad de 0,45%<sup>2</sup>.

## 1.2 Anatomía del oído

### 1.2.1 Descripción anatómica del oído humano

El oído humano se encuentra situado en el hueso temporal y se divide en tres partes: oído externo, medio e interno (Figura 1).

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

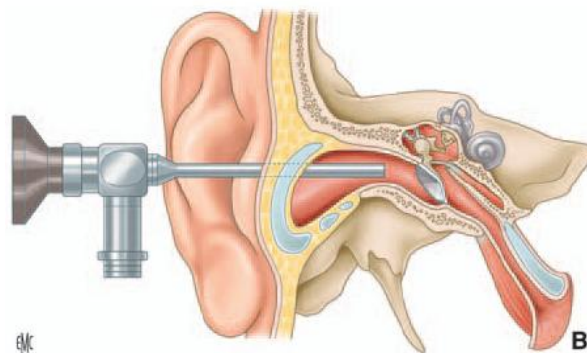
El oído externo está formado por el pabellón auricular y el conducto auditivo externo. El pabellón auricular es una estructura constituida por piel y cartílago que tiene por misión redirigir las ondas sonoras hacia el conducto auditivo externo (CAE), que está formado por una porción externa fibrocartilaginosa y otra interna ósea. Sus dimensiones longitudinales van de 2.5 a 3.0 cm., su altura de 0.8 a 1.0 cm. y su anchura algo menor, entre 0.6 y 0.9 cm. Tiene forma de S con concavidad posteroinferior y conecta el exterior con la membrana timpánica. En la unión del tercio interno con los dos tercios externos presenta un estrechamiento denominado istmo<sup>3</sup>.

El oído medio está constituido por la caja timpánica, los anexos mastoideos y la trompa de Eustaquio. La caja timpánica es una cavidad con forma de paralelepípedo irregular que alberga la cadena de huesecillos: martillo, yunque y estribo. Además en su interior se sitúan los músculos del martillo y del estribo y los ligamentos que fijan los huesecillos a la estructura ósea de la caja. El nervio facial cruza la cavidad en su salida del cráneo hacia la cara y las estructuras vasculares vena yugular interna y arteria carótida interna se relacionan con el oído medio en su salida y entrada al cráneo respectivamente. Su pared externa está constituida por una pequeña porción ósea y la membrana timpánica. Sus paredes anterior y posterior comunican con las otras dos

partes del oído medio, la trompa de Eustaquio que supone el ventilador del oído medio y el antro y las celdillas mastoideas que representan el sistema neumático<sup>4</sup>.

La trompa de Eustaquio es un conducto que comunica el oído medio con la nasofaringe. Está formada por hueso en su porción más próxima a la caja timpánica y por una estructura condromembranosa en su porción más distal. Tiene en su totalidad una longitud entre 4-5 cm., siendo casi el doble la porción condromembranosa. Hay un sistema muscular peritubárico formado por el músculo elevador del velo del paladar y por el músculo tensor del velo del paladar. Cuando ambos músculos se encuentran en reposo la trompa permanece cerrada y se abre cuando se contraen. Existen otros músculos que se consideran accesorios de esta función, como el constrictor superior de la faringe, el tensor del tímpano, el palatofaríngeo, el palatogloso y el músculo de la úvula<sup>5</sup>. La alteración funcional del sistema muscular peritubárico ocasionará alteraciones de ventilación del oído medio, que constituirán la fisiopatología de entidades como la otitis seromucosa, entre otras.

El sistema neumático se encuentra situado en la apófisis mastoidea del temporal. Está formado por unas cavidades llamadas celdillas. Hay una de mayor tamaño denominada antro mastoideo y otras menores, en número variable, que se encuentran unidas entre sí. Al nacer el antro está conformado, desarrollándose el resto de celdillas en los primeros 4-5 años de vida.



**Figura 1.** Esquema de oído externo, medio e interno. B: Trompa de Eustaquio<sup>4</sup>.

### 1.2.2 Descripción anatómica de la membrana timpánica humana

La membrana tiene una orientación anterior, inferior y lateral. Las dimensiones medias de la membrana timpánica son 1 cm de altura y 0.90 cm de anchura, su grosor es de 0.03- 0.09 mm y su superficie es de 0.65 cm<sup>2</sup>. El ángulo de inclinación con el plano horizontal es menor en el niño (tímpano más horizontalizado) y llega a unos 45 ° en el adulto<sup>5</sup>.

Tiene dos partes claramente diferenciadas, tanto en tamaño como en estructura: la pars tensa y la pars flácida o membrana de Shrapnell (Figura 2).

La pars tensa tiene forma de embudo con vértice en el extremo inferior del mango del martillo o umbo, encontrándose retraído unos 2 mm respecto a la zona periférica timpánica. Se encuentra fijada al sulcus timpánico del hueso timpanal mediante el annulus o anillo fibroso de Gerlach, que es un engrosamiento de la capa fibrosa del tímpano. El mango del martillo se encuentra englobado en la membrana timpánica y es la estructura visible que sirve de referencia en la otoscopia, además de dar información sobre la horizontalización o retracción de la misma. En el extremo superior del mango del martillo se encuentra una prominencia que corresponde a la apófisis lateral o *prominentia mallearis*<sup>4</sup>.



**Figura 2.** Imagen de un conducto auditivo externo y membrana timpánica normales.



La pars flácida o membrana de Shrapnell es la porción de tímpano que se inserta en la escama del temporal, sin tener anillo fibroso que la fije. Tiene forma de triángulo con vértice inferior de unos pocos milímetros de altura. El límite inferior corresponde a los ligamentos timpanomaleolares anterior y posterior. Estos ligamentos son la continuidad del anillo fibroso que salta entre las espinas timpánicas mayor y menor, límites superiores del hueso timpanal<sup>4</sup>.

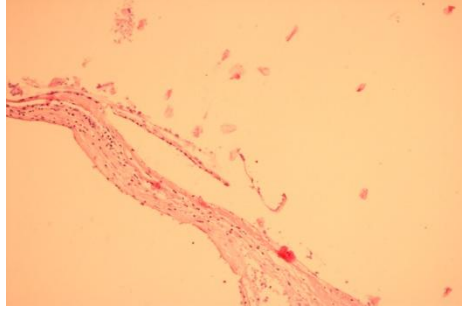
En la zona límite entre la pars flácida y la pars tensa hay un nervio denominado cuerda del tímpano. Es una rama del nervio facial (VII par) que sale tras la rama que inerva el músculo del estribo. Cruza el tímpano de atrás a delante, por la cara interna del mismo y apoyándose a nivel del cuello del martillo. Sale del oído medio a través de la sutura petrotimpánica y se une al nervio lingual, encargándose de recoger la sensibilidad gustativa de los 2/3 anteriores de la lengua y fibras preganglionares para las glándulas submaxilar y sublingual.

### **1.3 Histología de la membrana timpánica**

#### **1.3.1 Histología de la membrana timpánica humana**

La estructura histológica de la membrana timpánica humana varía según se trate de la pars tensa o de la pars flácida, siendo muy parecida a la del tímpano de rata<sup>6</sup>.

La pars tensa está formada por cinco capas según describe Lim DJ<sup>7</sup>: una capa externa, una lámina propia constituida por tres capas de tejido conectivo y una capa interna de células epiteliales (Figura 3). La capa externa o epidérmica se continúa con la piel del conducto auditivo externo estando formada por epitelio queratinizante escamoso y tiene entre 3 y 5 hileras de células<sup>7</sup>. La lámina propia está constituida por tres capas de tejido conectivo que de fuera adentro son: una capa delgada, otra densa y de nuevo otra delgada. Entre estas capas existen dos capas de fibras, una externa con posición radial y otra interna circular. También hay otra capa, entre las dos de fibras comentadas, con fibras oblicuas, que se han descrito como parabólicas, semilunares y transversas<sup>8</sup>. La capa más interna es la mucosa y está formada por células epiteliales simples. Esta capa continúa con la capa mucosa de la cavidad del oído medio, donde se presentan unas zonas de epitelio cilíndrico pseudo-estratificado y otras de epitelio cúbico<sup>7</sup>.



**Figura 3.** Membrana timpánica humana. Hematoxilina eosina. 20x.

La pars flácida está constituida por tres capas: una capa externa epidérmica, una lámina propia y una capa interna mucosa. La capa externa está formada por 5-10 hileras de células epiteliales. La lámina propia está compuesta de fibras de colágeno y elásticas dispuestas irregularmente, siendo este tejido conectivo más grueso que en la pars tensa. En esta capa también encontramos capilares y fibras nerviosas con terminaciones no especializadas. La capa mucosa tiene células escamosas simples, alternándose las zonas de epitelio cilíndrico pseudoestratificado con otras de epitelio cúbico bajo<sup>7</sup>.

### **1.3.2 Histología de la membrana timpánica de la rata**

El tímpano de la rata tiene un gran parecido estructural con el humano, pero menor espesor. Si en el humano está entre 0.030 y 0.095 mm de grosor, en la rata se encuentra entre 0.004 y 0.006 mm<sup>9</sup>.

En el tímpano de la rata hay dos partes: pars tensa y pars flácida. Las capas que constituyen cada una de estas partes son parecidas a las descritas en el tímpano humano, existiendo ligeras diferencias como es el grosor de la capa externa epitelial de la pars tensa, que en la rata está formada por 1-2 hileras de células<sup>9</sup> (Figura 4). El tejido conectivo es acelular y está engrosado junto al mango del martillo, en unos 0.75 mm alrededor del mismo. También se encuentra engrosado a nivel del annulus en unos 0.12 mm de longitud. El grosor en estas dos zonas puede llegar a ser hasta 5 veces el grosor normal del resto del tímpano. No se visualizan vasos sanguíneos y el martillo está formado por hueso compacto, aunque no tiene una disposición típica de osteonas y canales de Havers<sup>6</sup>.



**Figura 4.** Membrana timpánica de rata. Hematoxilina eosina. 20x.

## **1.4 Patología de oído con afectación timpánica**

### **1.4.1 Perforaciones timpánicas agudas**

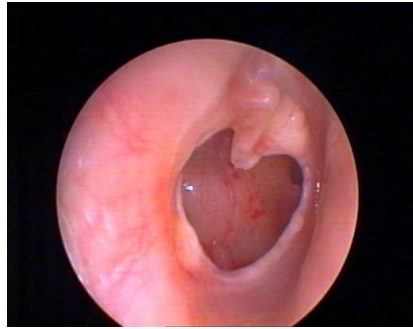
Una perforación timpánica es una solución de continuidad en la membrana timpánica. Las perforaciones timpánicas agudas son muy frecuentes, siendo el resultado de patología muy diversa. Puede tratarse de una otitis media aguda que produce una perforación timpánica con salida de material purulento. En otras ocasiones es producto de un traumatismo timpánico, tanto directo como indirecto. Los traumatismos directos suceden tras el manejo de bastoncillos y otros cuerpos extraños que se introducen en el oído externo. Los indirectos se producen tras golpes a nivel del pabellón auricular, ocasionando hiperpresión del aire del CAE que provoca la perforación timpánica. La evolución natural de las perforaciones agudas es la curación de forma espontánea en el 97% de los casos cuando son ocasionadas por traumatismos<sup>10</sup>.

En las perforaciones agudas la cicatrización comienza con el crecimiento de una capa epitelial delgada en los márgenes de la perforación, que se dirige hacia el centro de la misma. Después se produce una fibroplasia de la capa intermedia timpánica y se forma una costra marrón-amarillenta, formada por coágulo, restos celulares de la capa de queratina y otros materiales<sup>11</sup>.

### **1.4.2 Perforaciones timpánicas crónicas**

La perforación timpánica crónica es un proceso que presenta una solución de continuidad en la membrana timpánica de más de 3 meses de duración<sup>12</sup> (Figura 5).

La etiopatogenia es muy variada, pudiendo acontecer como secuela de otitis medias agudas, otitis medias crónicas, tratamientos con drenajes transtimpánicos, traumatismos timpánicos, cuerpos extraños, barotraumas y cirugía de oído medio, entre otras. Cuando las condiciones no son favorables, las perforaciones timpánicas no evolucionan hacia la curación espontánea, sino que permanecen abiertas más de 12 semanas, estableciéndose el diagnóstico de otitis media crónica simple. Esta es la situación de las perforaciones de gran tamaño, de las que mantienen un conducto auditivo externo húmedo por entrada de agua o por secreción debida a una ototubaritis y de las que presentan complicaciones como sobreinfecciones<sup>13</sup>.



**Figura 5.** Perforación timpánica crónica

Es una patología muy frecuente y aparece en todas las décadas de la vida, desde la primera infancia hasta la tercera edad, presentando una prevalencia ajustada por edad de 0.45 % según el estudio de Kaftan y col<sup>2</sup>, pudiendo llegar a 1.77% en un estudio de jóvenes varones realizado por Salihoqlu y col<sup>14</sup>.

La clínica fundamental es la hipoacusia de transmisión, que puede ser más o menos intensa en función del tamaño de la perforación timpánica, siendo mayor de 30 dB si hay afectación de la cadena osicular. Además es frecuente una historia de otorreas en el oído perforado, bien como consecuencia de cuadros catarrales que afecten a la mucosa del oído medio o bien por la entrada de agua, ocasionando otitis medias agudas supuradas. Cuanto más tiempo permanezca abierta una perforación timpánica, sobre todo con tubos de drenaje transtimpánicos, mayor es el riesgo de hialinización de la capa intermedia, resultando placas escleróticas que se visualizarán por otoscopia<sup>15</sup>.

En la exploración otoscópica podemos encontrar roturas timpánicas que se pueden clasificar, según el cuadrante afectado en: posteriores o anteriores y a su vez en superiores o inferiores. Según la afectación del ánulus pueden ser marginales si está afectado o centrales si no lo está. Según el tamaño, la perforación puede ser de un cuadrante, dos cuadrantes, subtotal o total. Estas perforaciones precisarán de un tratamiento quirúrgico o timpanoplastia para su resolución. El término de timpanoplastia define cualquier tipo de cirugía destinada a tratar la otitis media crónica, implicándose a la membrana timpánica y/o a la cadena de huesecillos y estructuras óseas que forman el estuche óseo del oído medio<sup>16</sup>. Una revisión histórica nos lleva a 1640, fecha en la que Marcus Banzer realizó un cierre de una perforación timpánica con vejiga de cerdo. Pero fue Berthold quien introdujo el término de miringoplastia en 1878, empleando injertos de piel libre.

Las timpanoplastias se han clasificado en cinco tipos desde Zollner y Wullstein en 1952<sup>16,17</sup>. Según Wullstein el tipo I reconstruye un tímpano con un oído medio normal, preservando las funciones de audición y de protección. El tipo II soluciona pequeños defectos de la cadena osicular intentando mantener un tamaño y una profundidad de oído medio normales. El tipo III se aplica a los oídos con grandes defectos del martillo y del yunque. Se eliminan dichos huesecillos y el epitímpano. El tipo IV se presenta cuando hay una platina móvil sin cruras del estribo. Se deja el nicho de la ventana oval abierto hacia el CAE. El tipo V muestra una platina fija, precisando abrir una nueva ventana. Solo se conserva del oído medio la entrada a la trompa de Eustaquio y el hipotímpano para proteger la ventana redonda.

En nuestro trabajo nos interesa conocer la timpanoplastia tipo I o miringoplastia, que es la utilizada para resolver las perforaciones timpánicas, cuando éstas no se acompañan de patología en la cadena de huesecillos ni en el estuche óseo. Consiste en activar la cicatrización reavivando los bordes de la perforación, extirpando los restos de la capa epidérmica próximos a la misma, y después colocando un injerto que la cubra.

Los materiales utilizados habitualmente para realizar la miringoplastia son:

Aponeurosis o fascia de músculo temporal.

Esta técnica fue desarrollada en la década de los años 60 por Heermann y Storrs.<sup>18,19,20</sup> Es la más utilizada por ser de fácil acceso (extracción de la fascia del músculo temporal en la región retro auricular) y resistente a la anoxia. El injerto debe adelgazarse y

liberarse de cualquier tejido muscular o adiposo, tras lo cual se seca aplastándolo y se recorta al formato deseado antes de colocarlo. El injerto suele situarse medial al resto timpánico, salvo en las perforaciones subtotales en las que el injerto se puede situar lateral al mango del martillo y medial al resto del tímpano. Se trata de la técnica *over-underlay*<sup>21</sup>.

#### Pericondrio de trago o de concha auricular.

El material utilizado es el pericondrio o envoltura del cartílago y se trata de un tejido que tapiza al cartílago por sus dos caras. Es de características muy parecidas al de la aponeurosis temporal, pero algo más fácil de manipular debido a su consistencia<sup>22</sup>.

#### Grasa.

Se trata de un material utilizado en la década de los 60, que fue abandonado y cuya utilización se ha reiniciado nuevamente en los últimos años<sup>23</sup>. La grasa abdominal es preferible a la del lóbulo de la oreja. Esta se coloca como si fuera un diábolo a través de la perforación, tras haber reavivado los bordes. Tiene como limitaciones, que la perforación debe ser menor del 50% del tamaño timpánico, además de no ser marginal, no presentar timpanoesclerosis en el borde de la perforación y tener mucosa de la caja timpánica sana. Se puede realizar bajo anestesia local. Las limitaciones para su utilización y los resultados inferiores a los obtenidos con los materiales mencionados anteriormente, hicieron que se abandonara la técnica. Hay autores que la utilizan en la actualidad con ácido hialurónico, con unos resultados comparables a las técnicas *underlay* y *overlay* y con la ventaja de ser una técnica ambulatoria<sup>24</sup>.

#### Cartílago.

En perforaciones recidivantes y tímpanos atelectásicos o con retracciones, se suele utilizar cartílago tragal o de la concha, debido a su rigidez y resistencia a la reabsorción. Como inconvenientes está la recuperación funcional que depende del grosor<sup>25</sup>. Si el injerto de cartílago no es demasiado grande y lo adelgazamos mucho, no alterará demasiado la movilidad timpánica. Esto permitiría estudiar el funcionamiento del oído medio mediante la timpanometría. Otro inconveniente es la opacidad que no permite controlar la aparición de un colesteatoma, necesitando realizar estudios de Tomografía Axial Computarizada (TAC) para su diagnóstico. Eavey<sup>26</sup> describió la técnica del cartílago en mariposa colocándolo con el pericondrio. Tek y col<sup>27</sup> obtienen

mejores resultados utilizando la combinación de cartílago y fascia en las perforaciones subtotales y anteriores, que en las que utilizan solo la fascia.

#### Gelfoam.

Es una esponja hemostática preparada a partir de piel porcina purificada, que se reabsorbe en unas semanas. Se utiliza para cerrar perforaciones pequeñas centrales entre 2 y 4 mm, tras reavivar los bordes. En el trabajo de Niklasson se obtienen un 83% de buenos resultados con esta técnica<sup>28</sup>.

#### Aloinjertos y heteroinjertos. Membrana amniótica.

Se han publicado numerosos estudios sobre la utilización de injertos de origen humano o animal<sup>29</sup>. En los últimos años la terapia celular con células stem mesenquimales constituye una opción terapéutica reparadora en muchas especialidades médicas, no solo en hematología<sup>30-32</sup>. La utilización de materiales como membrana amniótica<sup>33,34</sup> para medicina regenerativa supone una buena fuente de células madre multipotentes, con baja inmunogenicidad y de fácil adquisición.

En la reparación de perforaciones timpánicas no se ha trabajado directamente con membrana amniótica, aunque si se han utilizado células madre mesenquimales en suero salino a una concentración de  $1.2 \times 10^6$  células/ml<sup>35</sup>. En este trabajo Rahman y col cronificaban las perforaciones timpánicas de las ratas mediante corticoides y después reavivaban los bordes de la perforación y llenaban la cavidad del oído medio con la solución de células madre mesenquimales, consiguiendo el cierre de las perforaciones timpánicas en un 40%, muy superior al 10% de cierre conseguido en los controles.

### **1.4.3 Otitis media crónica seromucosa**

La otitis media seromucosa u otitis media secretora es una enfermedad crónica de la mucosa del oído medio, caracterizada por una colección seromucosa en la caja del tímpano, con una evolución mayor de 3 meses. Suele afectar a niños menores de 8 años suponiendo el 70% de las otitis secretoras, correspondiendo el 20% a los lactantes y el resto a los adultos. La afectación en la población infantil suele ser bilateral mientras que en los adultos predomina la unilateralidad<sup>36</sup>.

En la actualidad la teoría etiopatogénica más aceptada es la de un proceso inflamatorio del oído medio. Se produce una metaplasia mucípara en la mucosa de las cavidades

timpánicas, que producen un exudado parecido a las mucinas. La trompa de Eustaquio solo tiene un papel secundario, porque el bloqueo tubárico ocurre tras la inflamación y la producción de moco. El tapón mucoso puede enclavarse en la trompa y generar una hipopresión en el oído medio. El análisis bioquímico del material acumulado en el oído medio de una otitis secretora, es de un exudado con glucoproteínas. Además se ha aislado Ig A secretora<sup>38</sup> igual que la de la mucosa nasal y digestiva, constituyendo una primera línea defensiva inmunitaria frente a la invasión de bacterias y virus. También se han detectado mediante técnicas de PCR fragmentos de ADN de bacterias como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis*<sup>39</sup>. Todo esto avala la hipótesis de una infección primaria en la patogenia de la otitis secretora. Hace unos años, el papel principal en la etiopatogenia de la otitis secretora correspondía a la trompa de Eustaquio, pero últimamente se ha observado que solo tiene una influencia directa en las obstrucciones agudas por barotraumatismos o fracturas del peñasco. En estos casos la trompa es responsable de una hipopresión en el oído medio y de la producción de un trasudado<sup>37</sup>.

Clínicamente la hipoacusia es el síntoma principal de la otitis seromucosa. Se trata de una hipoacusia de transmisión en la que se mantiene normal el umbral de la vía ósea y está descendido el umbral de la vía aérea. El nivel de pérdida auditiva es variable, dependiendo del contenido seromucoso que haya en el oído medio. Fria y col<sup>40</sup> encontraron, en un estudio de 977 otitis secretoras, un nivel medio auditivo de 24.6 dB en los niños menores de 2 años y un nivel auditivo de 27 dB en los niños entre 2 y 12 años. Además, cuando la pérdida auditiva era bilateral y mayor de 30 dB repercutía en la adquisición del lenguaje de los niños. Los adultos con otitis secretoras tienen a veces taponamiento con autofonía (resonancia de la propia voz en el oído afecto) e incluso desequilibrio que va desde una ataxia leve al vértigo según Grace<sup>41</sup>. Otros síntomas menos constantes son las otalgias fugaces de unos minutos. Las otitis medias agudas recidivantes suelen alertar sobre la posibilidad de presentar otitis seromucosas, dada la frecuente asociación de estos procesos.

Hay unos factores de riesgo para padecer otitis secretora como son la prematuridad y haber precisado una reanimación neonatal. Los niños con otitis medias agudas muy precoces suelen tener más frecuentemente otitis secretoras. Los antecedentes alérgicos propios o familiares, el tabaquismo pasivo y el inicio precoz en guarderías son factores



que influyen en la frecuencia de esta patología. El reflujo gastroesofágico y haber recibido radioterapia en el macizo facial también se consideran factores de riesgo<sup>41</sup>.

El diagnóstico se realiza mediante la otoscopia y las exploraciones audiométricas<sup>42</sup>.

En la otoscopia se observa una pérdida de la semitransparencia timpánica. Aunque se observe cierto edema en el tímpano se identifican los relieves a diferencia de lo que ocurre en la otitis media aguda. La coloración del tímpano también es variable en esta patología pudiendo presentar tonos sonrosados, anaranjados y azulados (Figura 6). El aspecto timpánico puede ser retraído y atrófico, con afectación de todo el tímpano o de algún cuadrante, sobre todo el posterosuperior. La visualización de un nivel líquido a través del tímpano suele ayudar en el diagnóstico.



**Figura 6.** Otitis seromucosa. Coloración anaranjada con nivel hidro-aéreo.

Las exploraciones audiométricas consisten en timpanometría y audiometría. Las timpanometrías son pruebas objetivas que permiten el estudio de la movilidad timpánica a cualquier edad. Se somete el tímpano a presiones de aire variables y se observa la presión en la que el tímpano presenta la máxima movilidad, que coincidirá con la presión del oído medio. Los modelos de curvas descritos por Jerger<sup>43</sup> en 1970 son:

-Tipo A la máxima flexibilidad timpánica se encuentra entre +50 y -100 daPa.

-Tipo B cuando la curva es una recta sin pico de máxima flexibilidad.

-Tipo C la máxima flexibilidad timpánica está en presiones menores de -100 daPa.

Aunque hay otros subtipos de curvas, éstos son los más utilizados en clínica. En la otitis seromucosa encontraremos curvas tipo B.

La audiometría es una prueba que consiste en medir el umbral auditivo de cada frecuencia desde 250 a 8000 Hz. En la otitis secretora nos encontraremos una hipoacusia de transmisión que consiste en una diferencia mayor de 15 dB, entre los umbrales óseos y los de vía aérea. Precisa para su realización la colaboración del paciente, por ello la audiometría convencional solo se puede realizar en niños mayores de 5 años. Entre los 2 y los 5 años se pueden realizar audiometrías mediante juegos como el *peep show*<sup>44</sup>. En los niños entre 5 meses y 2 años se utiliza la audiometría por reflejo de orientación condicionado. En esta última se presentan estímulos por la espalda del niño y se observan los cambios posturales que se producen. Si precisáramos una audiometría objetiva en menores de 5 años deberíamos recurrir a los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC) que estudian la vía auditiva hasta la corteza cerebral.

En la actualidad el único tratamiento eficaz para tratar la otitis secretora es la paracentesis con colocación de un drenaje transtimpánico<sup>45</sup>. El resto de tratamientos que se han usado como antibióticos, mucolíticos, antihistamínicos y descongestivos no han dado buenos resultados<sup>37</sup>.

Los drenajes transtimpánicos son unos tubos fenestrados de diferentes materiales, con dilataciones en los extremos para mantenerse situados en la membrana timpánica, cuya misión es la de impedir el cierre de la perforación que hemos realizado en dicha membrana y mantener ventilado el oído medio. Los más utilizados hoy en día son de dos tipos: los estándar tipo *Donaldson*<sup>46</sup> o de corta duración y los de larga duración tipo *T-tube de Goode*. Los primeros suelen permanecer colocados de 6 a 12 meses, antes de la expulsión espontánea, mientras que los segundos pueden estar años. Los drenajes transtimpánicos se colocan en los cuadrantes anteroinferiores, tras la realización de una incisión en el tímpano en el sentido radial de las fibras, bajo control microscópico. Antes de su colocación se puede extraer parte del contenido mucoso del oído medio mediante aspiración. En los adultos se puede realizar la técnica descrita con anestesia tópica como la lidocaína o fenol. Sin embargo en los niños, dada la necesidad de

utilizar el microscopio para la colocación de los drenajes, con la inmovilidad cefálica que se requiere, tenemos que realizar como mínimo una sedación.

Las complicaciones de los drenajes transtimpánicos fueron estudiadas en un meta análisis por Kay<sup>47</sup> siendo la complicación más frecuente la recidiva de la otitis secretora tras la expulsión o la extracción de los drenajes transtimpánicos. En su estudio observó que en el 3.9% de los oídos se producía la extrusión de los drenajes y en el 0.5% de los casos una migración hacia el oído medio, antes de los 4-6 meses. También se pueden producir obstrucciones de los drenajes de forma precoz, en 7% de los casos. Suele tener relación con la sangre que se haya producido en la cirugía, pudiendo quedar coagulada obstruyendo el drenaje. Otra complicación es la otorrea secundaria, que constituye el 26% y suele producirse por la entrada de agua en el oído durante el baño, aunque esta otorrea también se puede producir por una infección rinofaríngea. Habrá que proceder a la limpieza del CAE y a la aplicación de gotas antibióticas en el oído. Podemos tener perforaciones timpánicas residuales tras la extracción o la expulsión espontánea de los drenajes. En los drenajes de corta duración esta complicación se presenta en un 2.2 % y en los de larga duración puede llegar hasta el 16.6 %. Con la colocación de drenajes y dependiendo del tiempo de permanencia de los mismos podemos encontrar placas calcáreas a nivel timpánico en un 32 % de los casos. Otras complicaciones como colesteatomas iatrogénicos o laberintización son muy poco frecuentes<sup>47</sup>.

## **1.5 Modelos animales**

La búsqueda de modelos animales con cronificación de las perforaciones timpánicas se ha ensayado desde los años 90, con la realización de la miringotomía incisional (con instrumentos fríos) o mediante un equipo láser (CO2, Argón) con o sin la aplicación de sustancias como: 5 fluorouracilo, halofuginona, colchicina, hidrocortisona, glutaraldehído y mitomicina C entre otras.

### **1.5.1 Ensayos de cronificación de las perforaciones timpánicas en animales.**

#### Láser de CO<sub>2</sub>.

Se utiliza como un bisturí. Consiste en una amplificación de luz por emisión estimulada de radiación. Hay muchos tipos de láser según el medio que se utilice. El de CO<sub>2</sub> utiliza un gas con transiciones vibracionales de los átomos. Tiene una gran precisión y consigue mínimas pérdidas sanguíneas en comparación con otros instrumentos de corte. La radiación tiene una longitud de onda de 10600 nm. y tiene una potencia de salida de 5 a 50 vatios. Realizando la perforación timpánica con el láser se ha conseguido cronificar las perforaciones timpánicas en ensayos realizados en ratas y en humanos<sup>48-50</sup>. Con la asociación de otras sustancias se obtienen los mejores resultados de cronificación timpánica en modelos animales.

#### Láser de Argón.

El láser de Argón utiliza como medio un gas pero con transiciones electrónicas. Se utiliza en oftalmología para el tratamiento de los desgarros retinales, antes de que se produzca el desprendimiento de retina. Desplazó al láser de rubí. Su radiación es de 414 nm. de longitud de onda. Tiene menor potencia de salida que el de CO<sub>2</sub>, de 1 a 15 vatios. Se ha utilizado en ratas y conejillos de indias para estudiar la cronificación de las perforaciones timpánicas<sup>51-53</sup>.

#### 5 Fluorouracilo.

El Fluorouracilo es un quimioterápico antimetabolito. Los antimetabolitos son sustancias similares a las sustancias normales que se encuentran dentro de la célula pero cuando las células incorporan estas sustancias a su metabolismo celular, pierden la capacidad de dividirse.

Además de la utilización como quimioterápico, se ha usado en estudios de cronificación de perforaciones timpánicas en ratas<sup>54,55</sup>. Los resultados prolongan la permeabilidad timpánica cuando se compara con la solución salina.

#### Halofuginona.

La halofuginona es un agente antiprotozoario del grupo de los derivados de la quinazolinona. Tiene capacidad de retrasar el crecimiento del tejido conjuntivo e impedir el crecimiento de una nueva vascularización.

Es otra sustancia que se ha probado en los trabajos de cronificación de las perforaciones timpánicas en ratas<sup>56</sup>. Los resultados de duración de permeabilidad de las perforaciones son de 3 semanas de media.

#### Colchicina.

Es un fármaco antimitótico que reduce la formación de tejido de granulación. Su mecanismo de acción es por la formación de un complejo entre la colchicina y la proteína tubulina. Esta última forma parte del citoesqueleto del huso mitótico y al formarse ese complejo se evita la división celular, bien por interrupción de la misma o por la formación de células inviables debido a su carga cromosómica anómala. La colchicina se ha utilizado por Haim G y col<sup>57</sup> para la cronificación de perforaciones timpánicas en ratas. Los resultados de la duración de las perforaciones timpánicas son de unas dos semanas de media.

#### Hidrocortisona.

La hidrocortisona aplicada en la piel produce efectos sobre los componentes del tejido conjuntivo como son el colágeno, la elastina, los glicosaminoglicanos y la fibronectina. Provocan atrofia de la unión dermo-epidérmica. Produce también una reducción de la síntesis del ácido hialurónico, elemento importante en la cicatrización. Spandow O y col<sup>58</sup> han utilizado la hidrocortisona, aplicándola durante 10 días, para establecer un modelo animal de ratas con cronificación de las perforaciones timpánicas.

#### Glutaraldehido.

Provoca la desnaturalización de las proteínas e induce la reticulación del colágeno. Detiene el desarrollo de la red vascular de la capa fibrosa. El glutaraldehido es un producto químico tóxico utilizado frecuentemente en la desinfección del material médico. El glutaraldehido al 2% se ha probado por Truy E y col<sup>59</sup>, como sustancia para cronificar las perforaciones timpánicas en perros. Consiguen una permeabilidad de las miringotomías elevada, manteniendo más del 50% de las perforaciones más de tres meses.

#### Mitomicina C.

La mitomicina C es un antibiótico antitumoral, de la familia de los aminoglucósidos que se comporta como un alquilante, desorganizando el ADN en las células tumorales. Se extrae del hongo *Streptomyces caespitosus*. Se comporta interrumpiendo la

replicación del ADN, inhibiendo la mitosis y la síntesis de proteínas. Altera la replicación de los fibroblastos y de las células epiteliales<sup>29</sup>. Tiene una actividad carcinogénica en ratones, tras una administración subcutánea, sin embargo no hay datos recogidos sobre la carcinogenicidad en humanos. Los principales efectos tóxicos se dan en la médula ósea y en sangre periférica, pudiendo presentar atrofia del bazo, timo, testículos, vesícula seminal, próstata y ovarios.

La mitomicina C, como sustancia para generar cronicidad en las perforaciones timpánicas, ha sido utilizada en ensayos con ratas por Kaftan H. y col<sup>60,61</sup>, Yucel OT<sup>49</sup>, Estrem y col<sup>62,63</sup> y Hesham y col<sup>64</sup>, entre otros. Otros animales como conejillos de indias<sup>51,52</sup> han sido utilizados en los ensayos donde se ha aplicado mitomicina C para cronificar las perforaciones timpánicas.



## **2 JUSTIFICACIÓN**





La gran variedad de materiales utilizados para tratar la perforación timpánica es evidencia de que los resultados distan mucho de ser satisfactorios y que por ello se mantiene abierta la investigación sobre nuevas alternativas de andamiajes biológicos o constructos de ingeniería tisular que pudieran facilitar la cicatrización.

Dada la experiencia positiva de nuestro grupo en el estudio y utilización de la membrana amniótica como apósito biológico para la cicatrización de las heridas, por sus propiedades regenerativas, anti-inflamatorias, anti-infecciosas e inmunomoduladoras, nos planteamos su utilización en el cierre de las perforaciones timpánicas en humanos, porque además es un material fácilmente disponible y sin problemas éticos para su utilización en clínica humana<sup>30, 33-34</sup>. Como primer paso para llegar a plantear un ensayo clínico del uso de membrana amniótica en las perforaciones timpánicas es necesario realizar un estudio preclínico que demuestre su seguridad y eficacia en un modelo animal con perforaciones timpánicas cronicadas y en consecuencia nos enfocamos al desarrollo del modelo animal. En nuestra revisión de la literatura encontramos estudios que conseguían la cronicación de las perforaciones utilizando miringotomías con láser asociadas a la utilización de hidrocortisona o mitomicina C, siendo esta última un citostático que ya se había utilizado para retrasar la cicatrización de diferentes patologías en especialidades como oftalmología y otorrinolaringología. Otros autores obtienen buenos resultados con las técnicas de miringotomía incisional tratadas con glutaraldehído en perros, aunque son escasos los ensayos realizados con esta sustancia.

Debido a que el láser es caro y no está disponible habitualmente en los laboratorios de investigación y a la gran dispersión de métodos publicados para potenciar la capacidad de la mitomicina C para cronicar las perforaciones timpánicas, como son la amputación del mango del martillo, la aplicación previa a la miringotomía y la asociación de dexametasona, sin que existan resultados concluyentes, se decidió desarrollar un modelo de cronicidad de perforación timpánica mediante el uso de miringotomías incisionales con mitomicina C que permita establecer un protocolo reproducible en la mayoría de los laboratorios de investigación.

Además, si pudiéramos establecer un modelo murino de cronicidad de perforación timpánica y se mantuviera la permeabilidad mayor de 3 meses, podríamos plantear nuevos ensayos para estudiar la cronicidad de la perforación timpánica como

alternativa terapéutica en las otitis seromucosas, evitando el uso de drenajes transtimpánicos.

### **3 OBJETIVOS**



### OBJETIVO PRINCIPAL

Establecer un modelo murino de cronificación de las perforaciones timpánicas mediante miringotomía incisional y aplicación de mitomicina C, que se mantenga durante un mínimo de 8 semanas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la duración de las perforaciones timpánicas (miringotomías) tras la aplicación de mitomicina C, en ratas Sprague Dawley, utilizando como grupo control la aplicación de solución salina.
2. Estudiar el efecto sobre la duración de la permeabilidad de las miringotomías, de la amputación del mango del martillo tras la aplicación de mitomicina C
3. Estudiar el efecto sobre la duración de la permeabilidad de las miringotomías, de la aplicación de mitomicina C antes o después de la perforación timpánica.
4. Comparar la duración de las miringotomías al aplicar mitomicina C sola o asociada a dexametasona.
5. Comprobar, si se consigue el modelo murino de cronificación de perforación timpánica, con una duración de la permeabilidad mayor de 3 meses. Esto serviría para proponer una alternativa terapéutica en las otitis seromucosas, evitando los drenajes transtimpánicos, que habría que estudiar mediante un ensayo.



## **4 MATERIAL Y MÉTODO**





#### 4.1 Instalaciones físicas

Todo el trabajo de investigación se ha realizado en las instalaciones del Centro de Experimentación e Investigación Biosanitaria (CEIB) del Campus de Ciencias de la Salud de la Universidad de Murcia, localizado en El Palmar.

Las instalaciones del animalario del CEIB reúnen los requisitos establecidos por ley, con paredes, techos y suelos lisos, hechos de materiales de fácil lavado. También son resistentes a la aplicación de desinfectantes. Hay cierres herméticos en las puertas, con barreras anti roedores y anti insectos. Se controlan los factores ambientales de temperatura, humedad, ventilación y presurización, además de los factores físico-químicos: iluminación, ruido, etc. Hay dos pasillos que separan las zonas estériles, disminuyendo la transmisión de agentes infecciosos que puedan afectar a los animales.

Los animales utilizados en el estudio estuvieron en cubetas en condiciones libres de patógenos específicos (SPF), con sistemas de Racks ventilados con presión positiva (Figura 7).



**Figura 7.** Cubetas aisladas para las ratas del sistema de Racks ventilados

Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes durante todo el estudio, con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La temperatura se mantuvo constante a 20°C y la humedad al 48%<sup>65</sup>.

El Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia emitió un dictamen favorable del proyecto presentado, tras considerar los informes propuestos y señalando que se respetaban los principios éticos básicos recogidos en la legislación actual vigente sobre protección de animales utilizados en investigación a nivel nacional y europeo<sup>66-68</sup>.

Se solicitó autorización al Servicio de Sanidad Animal de la Consejería de Agricultura y Agua, que fue concedida por la Dirección General de Ganadería y Pesca (Anexo 1).

## 4.2 Diseño del estudio

Se diseñó un ensayo prospectivo analítico con tres grupos de ratas Sprague Dawley. Los grupos del estudio se nombraron con las letras A, B y C (Tabla 1).

El grupo A estaba formado por 10 ratas a cuyos oídos izquierdos se les aplicó Mitomicina C y a los oídos derechos solución salina.

En el grupo A se hicieron dos brazos:

Grupo A1) Los OI de cada una de las 10 ratas fueron tratados con una perforación casi total de la membrana timpánica, con amputación del mango del martillo y posteriormente se les aplicó Mitomicina C durante 10 minutos.

Grupo A2) Los OD de cada rata fueron tratados igual que los izquierdos pero se les aplicó Solución Salina.

El grupo B estaba formado por 12 ratas. A 10 ratas se les aplicó Mitomicina C y las dos restantes del grupo se trataron con una solución salina fisiológica y fueron los controles del grupo.

En el grupo B se establecieron 4 brazos:

Grupo B1) Los oídos de cada una de las 10 ratas que fueron tratados con Mitomicina C durante 10 minutos, previamente a la perforación casi total de la membrana timpánica, sin amputación del mango del martillo.

Grupo B2) Los oídos contralaterales de las 10 ratas fueron tratados con Mitomicina C durante 10 minutos, previamente a la perforación de la membrana timpánica con amputación del mango del martillo.

Grupo B3) Los dos oídos de las ratas controles fueron tratadas con aplicación de solución salina, previamente a la perforación timpánica sin amputación del mango del martillo.

Grupo B4) Los dos oídos contralaterales de las ratas controles fueron tratados con aplicación de solución salina, previamente a la perforación timpánica con amputación del mango del martillo.

El grupo C estaba formado por 12 ratas. A 10 ratas se les aplicó Mitomicina C y Dexametasona y las dos restantes del grupo se trataron con una solución salina fisiológica y fueron los controles del grupo.

En el grupo C los brazos estaban constituidos:

Grupo C1) Los oídos de cada una de las 10 ratas que fueron tratados con Mitomicina C previo a la perforación timpánica, sin amputación del mango del martillo, aplicándoseles con posterioridad Dexametasona.

Grupo C2) Formado por los oídos contralaterales de las 10 ratas que fueron tratados con Mitomicina C previo a la perforación timpánica, con amputación del mango del martillo y aplicación posterior de Dexametasona.

Grupo C3) Los dos oídos de las ratas controles fueron tratadas con solución salina, previamente a la perforación timpánica sin amputación del mango del martillo, aplicándoseles después solución salina.

Grupo C4) Los dos oídos contralaterales de las ratas controles, fueron tratados con solución salina previamente a la perforación timpánica con amputación del mango del martillo, con posterioridad se les aplicó solución salina.

**Tabla 1** Grupos y brazos del ensayo. Tratamiento aplicado.

| Grupos | Brazos | Tratamiento Previo | Miringotomía Amputación | Miringotomía Sin Amputación | Tratamiento Posterior |
|--------|--------|--------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| A      | A1     | ---                | X                       | ---                         | Mitomicina C          |
|        | A2     | ---                | X                       | ---                         | Solución Salina       |
| B      | B1     | Mitomicina C       | ---                     | X                           | ---                   |
|        | B2     | Mitomicina C       | X                       | ---                         | ---                   |
|        | B3     | Solución Salina    | ---                     | X                           | ---                   |
|        | B4     | Solución Salina    | X                       | ---                         | ---                   |
| C      | C1     | Mitomicina C       | ---                     | X                           | Dexametasona          |
|        | C2     | Mitomicina C       | X                       | ---                         | Dexametasona          |
|        | C3     | Solución Salina    | ---                     | X                           | Solución Salina       |
|        | C4     | Solución Salina    | X                       | ---                         | Solución Salina       |

Tratamiento Previo: el tratamiento aplicado antes de realizar la perforación timpánica.

Miringotomía Amputación: se ha realizado miringotomía con amputación del mango del martillo.

Miringotomía Sin Amputación: se ha realizado miringotomía sin amputación del mango del martillo.

Tratamiento Posterior: el tratamiento aplicado tras realizar la perforación timpánica.

### 4.3 Animales

Se han utilizado ratas Sprague Dawley (Figura 8) que son una raza muy utilizada en investigación médica y psicológica. Son animales albinos, tranquilos, que facilitan el trabajo de laboratorio. Pueden vivir hasta 3,5 años y los adultos llegan a alcanzar un peso de 250 a 300 gramos las hembras y de 450 a 520 gramos los machos. Estas ratas como características reseñables presentan la imposibilidad para vomitar debido a la colocación del esófago, la ausencia de vesícula biliar y la distribución pulmonar con un solo lóbulo izquierdo y cuatro derechos. Alcanzan la madurez sexual a los 65 días y se reproducen todo el año, lo que facilita la disponibilidad de animales para la investigación. El periodo de gestación es de 22 días y suelen ser camadas de unas 12 crías. A las 4 semanas de vida son completamente independientes, comiendo dieta de adultos.



**Figura 8.** Rata Sprague Dawley

#### **4.4 Procedimiento**

Las ratas seleccionadas fueron machos de 8 semanas de edad sin patología aguda de oído externo o medio. Se realizó un archivo con el peso, número de identificación, grupo, protocolo asignado a cada oído, anestesia utilizada en cada intervención, fecha de la primera intervención y de las revisiones, tamaño de las perforaciones y observaciones.

Se anestesiaron mediante la inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina y Xilacina (Figura 9) a unas dosis de 40 a 90 mg/kg de la primera y 5-10 mg/kg de la segunda<sup>69</sup>. Se utilizó Ketolar<sup>R</sup> de laboratorios Parke Davis SL (Ketamina: 50 mg/ml) y Rompun<sup>R</sup> 2% de laboratorios Bayer (Xilacina: 20 mg/ml). La ketamina es un anestésico utilizado tanto en humanos como en veterinaria. La xilacina es un potente sedante, miorrelajante y analgésico no narcótico. Se utilizaron jeringuillas de 1 ml y agujas de 0.5 mm x 16 mm. (25 G 5/8 “ ) y se inyectó en la cavidad peritoneal, en el lateral derecho del abdomen. En las primeras intervenciones se utilizó 0.7 ml de la mezcla de Ketamina-Xilacina, manteniéndose las ratas dormidas de 45 a 60 minutos. En las revisiones se utilizó 0.4 ml de la mezcla de Ketamina-Xilacina, teniendo una duración la anestesia entre 20 y 30 minutos.



**Figura 9.** Xilacina y Ketamina

#### 4.4.1 Primeras intervenciones del grupo A

En las primeras anestias se inyectaron 0.7 ml de la mezcla de Ketamina-Xilacina. Se les realizó otoscopia a los dos oídos de cada rata mediante un espéculo de oído de 4 mm de diámetro menor y un microscopio marca Zeiss (Alemania) y se descartaron las ratas que tuvieran cualquier patología de oído externo o medio como perforación timpánica, otitis seromucosa, otitis externa aguda u otitis media aguda.

Se marcó en la cola de cada rata un número con rotulador permanente, para su identificación.

Después se fotografiaron los dos tímpanos íntegros de cada rata. Para realizar las fotografías se utilizó una cámara Canon, modelo Power Shot Pro 1 (Japón) (Figura 10) con un adaptador para fijar unas ópticas rígidas, una de 4 mm de diámetro y 0° marca Richard Wolf (EEUU) y otra de 3 mm de diámetro y 0° marca Gaes audiotest HD.



**Figura 10.** Cámara Canon Power Shot Pro 1 con el adaptador para fijación de ópticas

Como fuente de luz para la óptica se utilizó una fuente de luz fría marca Karl Storz modelo 482 (Alemania) (Figura 11).



**Figura 11.** Fuente de luz Storz

Se empleó un frasco de mitomicina C (Mitomycin C<sup>R</sup>) fabricada por laboratorios Inibsa SA (Figura 12), para cada grupo de ratas, desechando el sobrante. Se seleccionó la presentación de 2 mg y fue reconstituida con 5 ml de agua bidestilada estéril, resultando una solución de mitomicina C a una concentración de 0.4 mg/ml. Se protegió el frasco de mitomicina C de la luz con papel de plata durante todas las intervenciones.



**Figura 12.** Mitomicina C y Solución Salina



Después se realizó una perforación timpánica con el punzón agudo de la caja de timpanoplastia, que afectó a la totalidad del tímpano, cuadrantes anteriores y posteriores, amputando el mango del martillo en los dos oídos de cada rata, mediante el mismo punzón agudo, extrayendo el fragmento óseo con una micropinza de Hartmann de pico de pato (Figura 13).



**Figura 13.** Micropinza de Hartmann, despegador de Rosen, punzón de timpanoplastia y espéculo de oído.

Se cortaron fragmentos de espongostan (Spongostan Codman<sup>R</sup>), (es una esponja estéril de gelatina absorbente utilizada en cirugía para hemostasia) de unos 3 mm de diámetro mayor. Se extrajo 0.1 ml de mitomicina C para empapar el espongostan cortado.

Después se aplicó, en las perforaciones de los oídos izquierdos de cada rata, un fragmento de espongostan empapado en mitomicina C reconstituida, durante 10 minutos. La colocación del espongostan se realizó con el punzón romo de la caja de timpanoplastia del Dr. Salvá.

Transcurrido ese tiempo se extrajo el espongostan mediante una micropinza de oído con terminación en pico de pato.

En los oídos derechos de cada rata, tras la perforación se colocó un espongostan empapado con solución salina 0.9 % fabricada por laboratorios Serra Pamies (Figura

12), durante 10 minutos. Retirándolo de igual forma que la descrita para el espongostan con Mitomicina C.

Tras esto se realizaron fotografías de todos los tímpanos.

#### **4.4.2 Revisiones del grupo A**

En la anestesia de las revisiones de las ratas se utilizó 0.4 ml de mezcla de Ketamina-Xilacina.

Se revisaron los tímpanos mediante microscopía, observando si había sobreinfecciones en los oídos, lo que los descartaría del estudio. Se midió el tamaño de las perforaciones mediante un Rosen pequeño de la caja de timpanoplastia del Dr. Salvá (espátula circular). Se trata de un instrumento que tiene un pequeño disco en el extremo de 0.8 mm de diámetro, permitiendo medir las perforaciones como unidades de Rosen. Se anotó en el archivo de cada rata el tamaño de la perforación en el sentido antero posterior primero y después cráneo-caudal.

Por último se fotografiaron los tímpanos de ambos oídos.

Estas revisiones se realizaron en los tres grupos los días 3, 7, 10, 14 y después semanalmente hasta la cicatrización de las perforaciones o los 6 meses.

#### **4.4.3 Primeras intervenciones del grupo B**

Al igual que en el resto de grupos, en las primeras anestesisas se inyectaron 0.7 ml de la mezcla de Ketamina-Xilacina. A los animales se les realizó otoscopia en ambos oídos para confirmar la normalidad ótica.

Tras marcar en la cola de cada rata un número con rotulador permanente (para su identificación).

Se fotografiaron los dos tímpanos íntegros de cada rata.

Posteriormente se cortaron fragmentos de espongostan, de unos 3 mm de diámetro mayor. Se extrajo mediante jeringuilla 0.1 ml de mitomicina C (0.4 mg/ml) para empapar el espongostan cortado. Esta operación se repitió para cada oído de cada rata, de forma que el espongostan con mitomicina C se colocará inmediatamente después de su preparación.

El espongostan se aplicó mediante el punzón romo utilizando un espéculo de oído de 4 mm para visualizar el tímpano y las maniobras de colocación del espongostan empapado con mitomicina C en el tímpano. Este se mantuvo en cada oído durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se extrajo el espongostan mediante una micropinza de oído con terminación en pico de pato.

Después se realizó una perforación timpánica con el punzón agudo de la caja de timpanoplastia, que afectó a la totalidad del tímpano, cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo. En uno de los oídos de cada rata se fracturó el mango del martillo con el mismo punzón agudo, extrayendo el fragmento óseo con la micropinza de pico de pato. Se fue alternando la amputación del mango del martillo en los tímpanos derecho e izquierdo de cada rata.

Tras esto se fotografiaron los tímpanos perforados, finalizando la primera intervención.

En las ratas utilizadas como control se realizó el mismo procedimiento, con iguales pasos y tiempos de aplicación, pero el espongostan fue empapado con una solución salina fisiológica al 0.9%.

#### **4.4.4 Revisiones del grupo B**

En la anestesia de las revisiones de las ratas se utilizó 0.4 ml de mezcla de Ketamina-Xilacina.

Se revisaron los tímpanos mediante microscopía, observando si había sobreinfecciones en los oídos de las ratas, lo que los descartaría del estudio. Se midió el tamaño de las perforaciones mediante un Rosen pequeño de la caja de timpanoplastia. Tras anotar en el archivo de cada rata el tamaño de la perforación en el sentido antero posterior primero y después en el cráneo-caudal, se fotografiaron las perforaciones.

#### **4.4.5 Primeras intervenciones del grupo C**

Al igual que en el resto de grupos, en las primeras anestesis se inyectaron 0.7 ml de la mezcla de Ketamina-Xilacina. Se les realizó otoscopia a ambos oídos para confirmar la normalidad ótica.

Se marcó en la cola de cada rata un número con rotulador permanente, para su identificación.

Después se fotografiaron los dos tímpanos íntegros de cada rata.

Después se aplicó en los dos tímpanos de 10 ratas durante 10 minutos, un espongostan empapado en mitomicina C reconstituida. La colocación del espongostan a nivel timpánico se realizó con el punzón romo de la caja de timpanoplastia.

Tras esto se realizó la perforación timpánica total en cada oído con el punzón agudo de la caja de timpanoplastia, respetando el mango del martillo.

En uno de los tímpanos de cada rata se realizó una amputación del mango del martillo mediante el mismo punzón agudo, extrayendo el fragmento óseo con una micropinza de pico de pato. Alternando la elección del lado de la amputación del mango del martillo en cada rata.

Después se realizaron fotografías de todos los tímpanos.

En las 2 ratas utilizadas como control del grupo se realizó el mismo procedimiento, con iguales pasos y tiempos de aplicación, pero el espongostan fue empapado con una solución salina fisiológica al 0.9%.

#### **4.4.6 Revisiones del grupo C**

En la anestesia de las revisiones de las ratas se utilizó 0.4 ml de mezcla de Ketamina-Xilacina.

Se revisaron los tímpanos mediante microscopía, observando si había sobreinfecciones en los oídos, lo que los descartaría del estudio. Se midió el tamaño de las perforaciones mediante un Rosen pequeño de la caja de timpanoplastia. Se anotó en el archivo de cada rata el tamaño de la perforación en el sentido antero posterior primero y después en el cráneo-caudal.

Se fotografiaron las perforaciones.

Después se aplicó a las 10 ratas tratadas con Mitomicina C, una solución de Dexametasona al 4% en cada oído, llenando el oído medio y el externo. En las 2 ratas control se aplicó en ambos oídos una solución salina al 0.9%. Esto se repitió los días 3, 7, 10 y 14 del ensayo en las 12 ratas del grupo.

## 4.5 Estudio Estadístico

Se ha realizado un estudio descriptivo. Hemos utilizado ANOVA simplificando el modelo de manera secuencial. Hemos partido del modelo completo con posibles interacciones y hemos llegado hasta el modelo más simple, descartando para ello los factores que no resultaron con diferencias significativas. Los factores que han presentado diferencias significativas se han estudiado mediante comparaciones múltiples por pares, usando el procedimiento de Tuque cuando el factor tenía más de dos valores posibles.

En todo el estudio se ha utilizado el programa informático *R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.*

## **5 RESULTADOS**



## 5.1 Recogida de datos

Los resultados obtenidos en cada ensayo se han ido reflejando en una tabla Excel para cada grupo, detallándose el tamaño de la perforación timpánica de los oídos de cada rata.

En la tabla del grupo A (Tabla 2) se identifica cada número de rata en dos filas, en una se sitúa el oído izquierdo y en otra el derecho, después se detalla el tratamiento aplicado en cada oído. Los oídos izquierdos fueron tratados (Amp + MC) con miringotomías incisionales con amputación del mango del martillo, aplicando después mitomicina C (Brazo A1) y los oídos derechos se trataron (Amp + SF) mediante miringotomías incisionales con amputación del mango del martillo y aplicación de solución salina (Brazo A2). La siguiente columna (0 DÍAS) recoge el tamaño de la perforación timpánica en el día de la primera intervención, siendo igual en todos los oídos (3x3), el primer dato refleja la medida anteroposterior de la perforación timpánica y el segundo la medida cráneo-caudal. Los datos se muestran en unidades rosen (el número de veces que aplicamos este instrumental para medir la perforación) cuyo tamaño es de 0.8 mm, luego cada perforación inicialmente tiene un tamaño de 2.4 mm de ancha por 2.4 mm de alta. Las siguientes columnas muestran las revisiones realizadas con los días que han pasado desde el inicio y refleja el tamaño de la perforación de igual manera a la descrita para el día inicial.

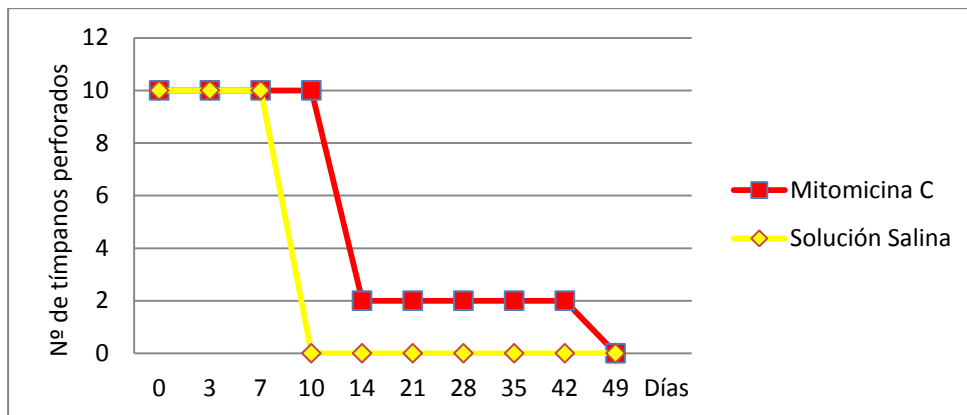
**Tabla 2** Recogida de datos del grupo A

| GRUPO A    | OIDO | TTO     | 0 DIAS | 3 DIAS | 7 DIAS  | 10 DIAS | 14 DIAS | 21 DIAS | 28 DIAS | 35 DIAS | 42 DIAS | 49 DIAS |
|------------|------|---------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Rata nº 1  | OI   | Amp.+MC | 3x3    | 3x2    | 3x1,5   | 2x1     | 1,5x1   | 1,5x1   | 1x0,5   | 1x0,5   | 0,5x0,5 | Cerrada |
| Rata nº 1  | OD   | Amp.+SF | 3x3    | 2x1,5  | 0,1x0,1 | Cerrada |         |         |         |         |         |         |
| Rata nº 2  | OI   | Amp.+MC | 3x3    | 3x3    | 3x2     | 1,5x1   | Cerrada |         |         |         |         |         |
| Rata nº 2  | OD   | Amp.+SF | 3x3    | 2x2    | 0,1x0,1 | Cerrada |         |         |         |         |         |         |
| Rata nº 3  | OI   | Amp.+MC | 3x3    | 3x3    | 3x2     | 3x2     | 2x1,5   | 1,5x1,5 | 1,5x1   | 1x1     | 1x0,5   | Cerrada |
| Rata nº 3  | OD   | Amp.+SF | 3x3    | 3x2    | 2x1     | Cerrada |         |         |         |         |         |         |
| Rata nº 4  | OI   | Amp.+MC | 3x3    | 3x2,5  | 3x1,5   | 3x1,5   | Cerrada |         |         |         |         |         |
| Rata nº 4  | OD   | Amp.+SF | 3x3    | 3x2    | 2x1     | Cerrada |         |         |         |         |         |         |
| Rata nº 5  | OI   | Amp.+MC | 3x3    | 3x2    | 3x2     | 1,5x1,5 | Cerrada |         |         |         |         |         |
| Rata nº 5  | OD   | Amp.+SF | 3x3    | 3x2    | 2,5x1   | Cerrada |         |         |         |         |         |         |
| Rata nº 6  | OI   | Amp.+MC | 3x3    | 3x3    | 3x2,5   | 2,5x2   | Cerrada |         |         |         |         |         |
| Rata nº 6  | OD   | Amp.+SF | 3x3    | 3x1,5  | 2x1     | Cerrada |         |         |         |         |         |         |
| Rata nº 7  | OI   | Amp.+MC | 3x3    | 3x3    | 3x2     | 1x1     | Cerrada |         |         |         |         |         |
| Rata nº 7  | OD   | Amp.+SF | 3x3    | 3x2    | 2x1,5   | Cerrada |         |         |         |         |         |         |
| Rata nº 8  | OI   | Amp.+MC | 3x3    | 3x2,5  | 3x2     | 2x1,5   | Cerrada |         |         |         |         |         |
| Rata nº 8  | OD   | Amp.+SF | 3x3    | 2x1,5  | 1x1,5   | Cerrada |         |         |         |         |         |         |
| Rata nº 9  | OI   | Amp.+MC | 3x3    | 3x3    | 3x2     | 0,5x0,5 | Cerrada |         |         |         |         |         |
| Rata nº 9  | OD   | Amp.+SF | 3x3    | 3x2    | 2x1     | Cerrada |         |         |         |         |         |         |
| Rata nº 10 | OI   | Amp.+MC | 3x3    | 3x3    | 3x2     | 2x1     | Cerrada |         |         |         |         |         |
| Rata nº 10 | OD   | Amp.+SF | 3x3    | 2x1,5  | 0,5x0,5 | Cerrada |         |         |         |         |         |         |



OI: oído izquierdo. OD: oído derecho. TTO: tratamiento. Amp: miringotomía incisional con amputación del mango del martillo. MC: mitomicina C. SF: Solución salina. (3x3): 3 unidades rosen de ancho x 3 unidades de alto. Cerrada: cicatrización de la perforación timpánica.

Los datos de la tabla del grupo A se han representado en una gráfica (Figura 14) que muestra en el eje horizontal los días en los que se realizaron las revisiones y en el eje vertical el número de ratas que permanecían con los tímpanos perforados. En esta figura observamos como el 80% de las perforaciones timpánicas tratadas con mitomicina C se encontraban cerradas en las dos primeras semanas y el 100% de los controles se cerraron antes del día 10.



**Figura 14.** Gráfica de duración (días) de las perforaciones timpánicas en el grupo A. (Número de tímpanos perforados x Días de duración de las perforaciones).

(En rojo brazo A1: miringotomía incisional + mitomicina C. En amarillo brazo A2: miringotomía incisional + Solución salina)

La tabla de recogida de datos del grupo B (Tabla 3) presenta algunas diferencias respecto a la tabla del grupo A. En la primera columna de la tabla 2 se observa que hay 12 ratas a diferencia de la tabla del grupo A que solo tiene 10 ratas. Además en la tabla 2, en la columna del tratamiento, se van alternando dos tratamientos, uno (MC + No Amput) en el que aplicamos mitomicina C realizando después la miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo (brazo B1) y otro (MC + Amp) en el que aplicamos la mitomicina C y realizamos después la miringotomía incisional con amputación del mango del martillo (brazo B2). Las ratas 11 y 12 se trataron alternando dos tratamientos, uno (SF + No amput) en el que se aplicó solución salina y después se realizó una miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo (brazo B3)

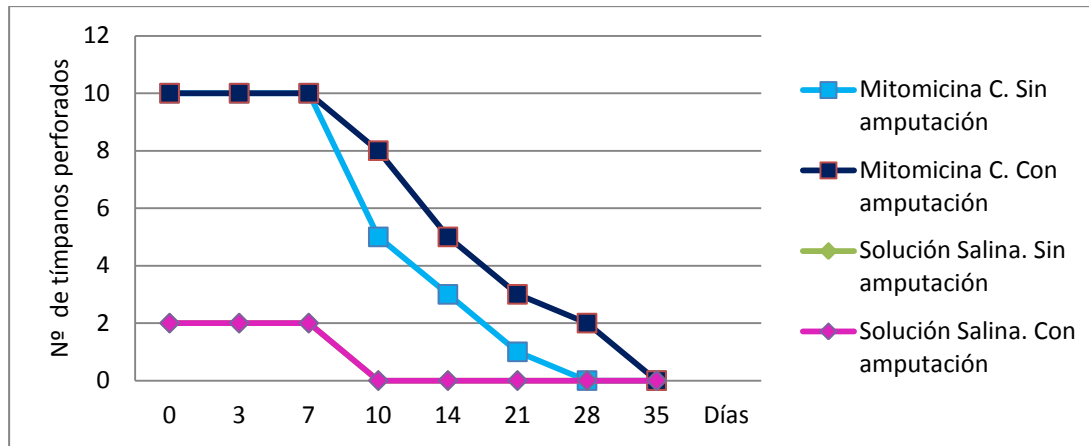
y otro (SF + Amp) en el que se aplicó solución salina y después se realizó una miringotomía incisional con amputación del mango del martillo (brazo B4).

**Tabla 3** Recogida de datos del grupo B

| GRUPO B    | OIDO | TTO         | 0 DIAS | 3 DIAS  | 7 DIAS  | 10 DIAS   | 14 DIAS | 21 DIAS | 28 DIAS | 35 DIAS |
|------------|------|-------------|--------|---------|---------|-----------|---------|---------|---------|---------|
| Rata nº 1  | OI   | MC+ Amput.  | 3x3    | 3x3     | 3x3     | 3x2,5     | 2x1     | 0,5x0,5 | Cerrado |         |
| Rata nº 1  | OD   | MC+No amp.  | 3x3    | 3x3     | 3x3     | 1x1       | Cerrado |         |         |         |
| Rata nº 2  | OI   | MC+No amp.  | 3x3    | 3x3     | 3x2     | Cerrado   |         |         |         |         |
| Rata nº 2  | OD   | MC + Amput. | 3x3    | 3x3     | 3x3     | Cerrado   |         |         |         |         |
| Rata nº 3  | OI   | MC + Amput. | 3x3    | 3x3     | 3x2,5   | 3x2       | 2x1     | 2x1     | 0,1x0,1 | Cerrado |
| Rata nº 3  | OD   | MC+ No amp  | 3x3    | 3x3     | 2,5x2,5 | Cerrado   |         |         |         |         |
| Rata nº 4  | OI   | MC+ No amp  | 3x3    | 3x3     | 2x2     | 0,5x0,5   | Cerrado |         |         |         |
| Rata nº 4  | OD   | MC+ Amput.  | 3x3    | 3x3     | 2x2     | 0,3 x 0,3 | Cerrado |         |         |         |
| Rata nº 5  | OI   | MC+Amput.   | 3x3    | 3x3     | 2,5x2   | 2,5x2     | 2x1     | Cerrado |         |         |
| Rata nº 5  | OD   | MC+No amp.  | 3x3    | 3x2,5   | 2x2     | Cerrado   |         |         |         |         |
| Rata nº 6  | OI   | MC+No amp.  | 3x3    | 3x3     | 3x3     | 3x3       | 3x3     | 0,5x0,5 | Cerrado |         |
| Rata nº 6  | OD   | MC+Amput.   | 3x3    | 3x3     | 2,5x2,5 | 1,5x1     | 0,5x0,5 | Cerrado |         |         |
| Rata nº 7  | OI   | MC+Amput.   | 3x3    | 3x3     | 2,5x2,5 | 1,5x1     | Cerrado |         |         |         |
| Rata nº 7  | OD   | MC+No amp.  | 3x3    | 3x2,5   | 2x2     | Cerrado   |         |         |         |         |
| Rata nº 8  | OI   | MC+No amp.  | 3x3    | 3x3     | 2x2     | 1,5x1,5   | 0,5x0,5 | Cerrado |         |         |
| Rata nº 8  | OD   | MC+Amput.   | 3x3    | 3x3     | 2x2     | Cerrado   |         |         |         |         |
| Rata nº 9  | OI   | MC+Amput.   | 3x3    | 3x2,5   | 3x2     | 1,5x1     | Cerrado |         |         |         |
| Rata nº 9  | OD   | MC+No amp.  | 3x3    | 2,5x2,5 | 1,5x1   | Cerrado   |         |         |         |         |
| Rata nº 10 | OI   | MC+No amp.  | 3x3    | 3x2     | 2,5x2   | 2,5x1,5   | 1,5x1,5 | Cerrado |         |         |
| Rata nº 10 | OD   | MC+Amput.   | 3x3    | 3x3     | 3x2     | 2,5x2     | 2,5x2   | 2x1,5   | 1,5x1   | Cerrado |
| Rata nº 11 | OI   | SF+Amput.   | 3x3    | 3x2     | 2x1     | Cerrado   |         |         |         |         |
| Rata nº 11 | OD   | SF+No amp.  | 3x3    | 2x2     | 1,5x1,5 | Cerrado   |         |         |         |         |
| Rata nº 12 | OI   | SF+No amp.  | 3x3    | 2x2     | 2x1,5   | Cerrado   |         |         |         |         |
| Rata nº 12 | OD   | SF+Amput.   | 3x3    | 2x2     | 0,1x0,1 | Cerrado   |         |         |         |         |

OI: oído izquierdo. OD: oído derecho. TTO: tratamiento. MC: mitomicina C. Amp: miringotomía incisional con amputación del mango del martillo. No amp.: miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo. SF: Solución Salina. (3x3): 3 unidades rosen de ancho x 3 unidades de alto. Cerrada: cicatrización de la perforación timpánica.

Los datos de la tabla del grupo B se representaron en una gráfica (Figura 15) que presenta los días de las revisiones en el eje horizontal y el número de ratas con tímpanos perforados en el eje vertical. En esta gráfica observamos que todas las perforaciones tratadas con solución salina se cerraron antes de los 10 primeros días, mientras que las perforaciones tratadas con mitomicina C fueron cerrándose progresivamente, completándose la totalidad antes de las 5 semanas. Los oídos tratados con mitomicina C y miringotomía incisional con amputación de los mangos de los martillos, presentaron una duración de las perforaciones timpánicas algo mayor que los oídos tratados con mitomicina C y miringotomía incisional sin amputación.

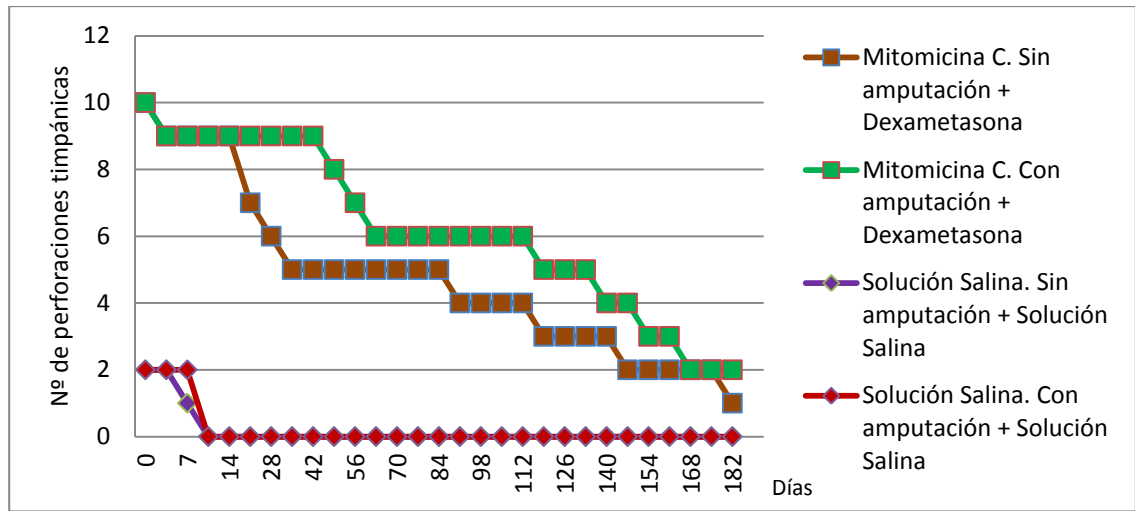


**Figura 15.** Gráfica de duración (días) de las perforaciones timpánicas en el grupo B. (Número de tímpanos perforados x Días de duración de las perforaciones).

(En azul claro brazo B1: mitomicina C + miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo. En azul oscuro brazo B2: mitomicina C + miringotomía incisional con amputación del mango del martillo. En verde claro brazo B3: Solución salina + miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo. En rosa brazo B4: Solución salina + miringotomía incisional con amputación del mango del martillo)

En la tabla de recogida de datos del grupo C (Anexo 2) se observan diferencias respecto a la tabla 3 en las columnas de las cuatro primeras revisiones (3 DÍAS, 7 DÍAS, 10 DÍAS y 14 DÍAS). En ellas además de reflejar las dimensiones de la perforación timpánica como en la tabla 3, en la tabla del grupo C se le añadió el término "... + Dx" en las primeras 10 ratas, significando la aplicación que se realizó con dexametasona en los oídos y en las ratas números 11 y 12 se le añadió el término "... + SF" habiendo sido tratados estos oídos con solución salina.

Los datos de la tabla del grupo C se han representado en la figura 16, una gráfica que muestra en el eje horizontal los días de las revisiones y en el vertical el número de ratas con persistencia de las perforaciones timpánicas. En esta figura observamos una marcada diferencia entre la duración de las perforaciones timpánicas tratadas con solución salina y las tratadas con mitomicina C. Se observa también una zona de estabilidad del cierre de las perforaciones entre las 8 semanas y los 3 meses en los oídos tratados con mitomicina C que a partir de esta última fecha van gradualmente cerrando, persistiendo tres tímpanos abiertos a los 6 meses, fecha de finalización del ensayo.



**Figura 16.** Gráfica de duración (días) de las perforaciones timpánicas en el grupo C . (Número de tímpanos perforados x Días de duración de las perforaciones).

(En marrón oscuro brazo C1: mitomicina C + miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo + dexametasona. En verde oscuro brazo C2: mitomicina C + miringotomía incisional con amputación del mango del martillo + dexametasona. En violeta brazo C3: Solución salina + miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo + solución salina. En rojo oscuro brazo C4: Solución salina + miringotomía incisional con amputación del mango del martillo + solución salina).

Al mismo tiempo esta información se ha guardado en un archivo en formato Word (Anexo 3), donde se ha recogido la fecha de realización de cada anestesia, el peso de la rata, la cantidad de anestesia utilizada, la descripción de la evolución de la perforación, así como las incidencias que tuvimos.

Se elaboró también una carpeta para recoger las imágenes fotografiadas (Anexo 4) de cada oído de cada rata y de cada grupo, detallándose la fecha de realización de cada una.

## 5.2 Peso

Se han utilizado 34 ratas Sprague Dawley con pesos iniciales entre 312.0 y 367.0 gramos con una media de 331.4 gramos.

No hubo diferencias en el peso de las ratas de los tres grupos experimentales (Tabla 4).

**Tabla 4** Pesos de las ratas por grupos. Datos expresados como media  $\pm$  desviación estándar

| Grupo | Peso medio en gramos |
|-------|----------------------|
| A     | 337.3 $\pm$ 14.56    |
| B     | 330.8 $\pm$ 9.62     |
| C     | 327.1 $\pm$ 8.46     |

### 5.3 Tiempo de duración de las perforaciones timpánicas

Dado que no se puede saber el día exacto en el que se han cerrado las perforaciones timpánicas, hemos establecido como fecha del cierre, la media entre el día en el que se observa la perforación cerrada y el último día que estaba abierta.

#### 5.3.1 Duración de las perforaciones timpánicas tratadas con Solución Salina (Tabla 5)

Las miringotomías tratadas con Solución Salina cicatrizaron a los 8.5 días menos un oído del brazo C3 que cicatrizó a los 5 días.

**Tabla 5** Resultados de permeabilidad de las miringotomías tratadas con Solución Salina en los brazos de los grupos A, B y C

| Brazos | Nº oídos | Tratamiento     | Permeabilidad (días) |
|--------|----------|-----------------|----------------------|
| A2     | 10       | Solución Salina | 8.5                  |
| B3     | 2        | Solución Salina | 8.5                  |
| B4     | 2        | Solución Salina | 8.5                  |
| C3     | 2        | Solución Salina | 8.5<br>5.0           |
| C4     | 2        | Solución Salina | 8.5                  |

Brazo A2: miringotomía incisional con amputación del mango del martillo + Solución Salina.

Brazo B3: Solución Salina + miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo.

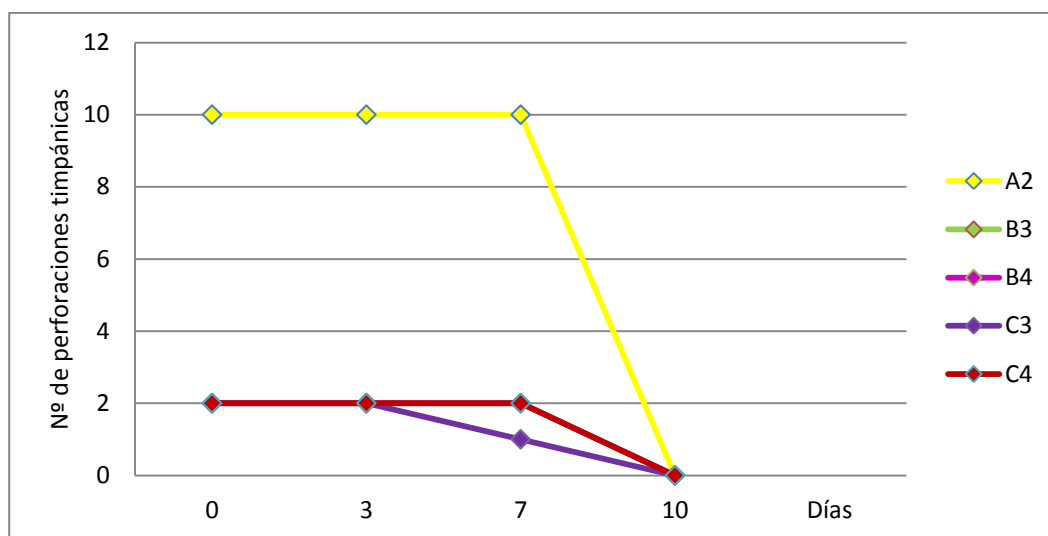
Brazo B4: Solución Salina + miringotomía incisional con amputación del mango del martillo.

Brazo C3: Solución Salina + miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo + Solución Salina.

Brazo C4: Solución Salina + miringotomía incisional con amputación del mango del martillo + Solución Salina.

En C3 un oído cicatrizó a los 8.5 días y otro a los 5 días.

Estos datos de la tabla 5 se reflejan en la gráfica de la figura 17, donde resalta la homogeneidad de los resultados. Todos los grupos tratados con solución salina presentaron el cierre de las perforaciones timpánicas antes de los 10 días, sin que observemos diferencia en la duración de las perforaciones cuando realizamos miringotomías con amputación del mango del martillo y sin amputación, así como tampoco vemos diferencia entre aplicar la solución salina antes o después de la miringotomía.



**Figura 17.** Gráfica de duración (días) de las perforaciones timpánicas tratadas con solución salina.

En amarillo brazo A2: miringotomía incisional con amputación del mango del martillo + Solución Salina.

En verde claro brazo B3: Solución Salina + miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo.

En rosa brazo B4: Solución Salina + miringotomía incisional con amputación del mango del martillo.

En violeta brazo C3: Solución Salina + miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo + Solución Salina.

En rojo oscuro brazo C4: Solución Salina + miringotomía incisional con amputación del mango del martillo + Solución Salina.

### 5.3.2 Duración de las perforaciones timpánicas tratadas con mitomicina C (Tabla 6)

En el brazo A1 se trataron los 10 tímpanos con miringotomía incisional y después se les aplicó mitomicina C. La duración media de las perforaciones timpánicas fue de 18.6 días con una desviación estándar de 13.4 días.

En el brazo B1 se trataron los 10 tímpanos con mitomicina C y se realizó posteriormente una miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo. La

duración media de las perforaciones timpánicas fue de 12.6 días con desviación estándar de 5.24 días.

En el brazo B2 se trataron los 10 tímpanos con mitomicina C y después se practicó miringotomía incisional con amputación del mango del martillo. La duración media de las perforaciones timpánicas fue de 17.5 días con desviación estándar de 8.33 días.

En el brazo C1 se trataron los 10 tímpanos con mitomicina C y después se practicó miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo. Se descartó una rata (número 2) por éxitus en el día 1. Hubo dos oídos que se eliminaron del estudio por otorrea, uno el día 21 y otro el día 119. Corresponden a las mismas ratas que presentaron otorrea en el brazo C2 (números 3 y 7). Teniendo una duración media de las perforaciones timpánicas de 95 días con desviación estándar de 62.08 días. Al finalizar el estudio quedó un oído perforado (Figura 18).

En el brazo C2 se trataron los 10 tímpanos con mitomicina C y después se practicó miringotomía incisional con amputación del mango del martillo. Se descartó una rata (número 2) por éxitus en el día 1. Hubo dos oídos que se eliminaron del estudio por otorrea, uno el día 63 y otro el día 119. Con una duración media de las perforaciones timpánicas de 130.5 días con desviación estándar de 50.55 días. A los 6 meses, al finalizar el estudio, permanecían dos oídos perforados (Figura 18).



**Figura 18.** Tímpanos perforados a los 6 meses. (Uno del brazo C1 y dos del brazo C2)

**Tabla 6** Resultados obtenidos de permeabilidad timpánica en miringotomías tratadas con mitomicina C en los brazos de los grupos A, B y C.

| Brazos | Tratamiento                    | Nº de ratas | Permeabilidad (días) | Miringotomías no cicatrizadas | Permeabilidad media (días) por brazos | Ratas descartadas     | Permeabilidad media (días) del grupo |
|--------|--------------------------------|-------------|----------------------|-------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| A1     | Mitomicina C                   | 8           | 12.0                 |                               | 18.6                                  |                       |                                      |
|        |                                | 2           | 45.5                 |                               |                                       |                       |                                      |
| B1     | Mitomicina C                   | 5           | 8.5                  |                               | 12.6                                  |                       | 15.1                                 |
|        |                                | 2           | 12.0                 |                               |                                       |                       |                                      |
|        |                                | 2           | 17.5                 |                               |                                       |                       |                                      |
|        |                                | 1           | 24.5                 |                               |                                       |                       |                                      |
| B2     | Mitomicina C                   | 2           | 8.5                  |                               | 17.5                                  |                       |                                      |
|        |                                | 3           | 12.0                 |                               |                                       |                       |                                      |
|        |                                | 2           | 17.5                 |                               |                                       |                       |                                      |
|        |                                | 1           | 24.5                 |                               |                                       |                       |                                      |
|        |                                | 2           | 31.5                 |                               |                                       |                       |                                      |
| C1     | Mitomicina C +<br>Dexametasona | 1           | 17.5                 | 1                             | 95.0                                  | 1 Éxitus<br>2 Otorrea | 112.7                                |
|        |                                | 1           | 24.5                 |                               |                                       |                       |                                      |
|        |                                | 1           | 31.5                 |                               |                                       |                       |                                      |
|        |                                | 1           | 87.5                 |                               |                                       |                       |                                      |
|        |                                | 1           | 143.5                |                               |                                       |                       |                                      |
|        |                                | 1           | 178.5                |                               |                                       |                       |                                      |
| C2     | Mitomicina C +<br>Dexametasona | 1           | 45.5                 | 2                             | 130.5                                 | 1 Éxitus<br>2 Otorrea |                                      |
|        |                                | 1           | 52.5                 |                               |                                       |                       |                                      |
|        |                                | 1           | 136.5                |                               |                                       |                       |                                      |
|        |                                | 1           | 150.5                |                               |                                       |                       |                                      |
|        |                                | 1           | 164.5                |                               |                                       |                       |                                      |

Brazo A1: Ratas tratadas con mitomicina C tras la miringotomía con amputación del mango del martillo.

Brazo B1: Ratas tratadas con mitomicina C previa a la miringotomía sin amputación del mango del martillo.

Brazo B2: Ratas tratadas con mitomicina C previa a la miringotomía con amputación del mango del martillo.

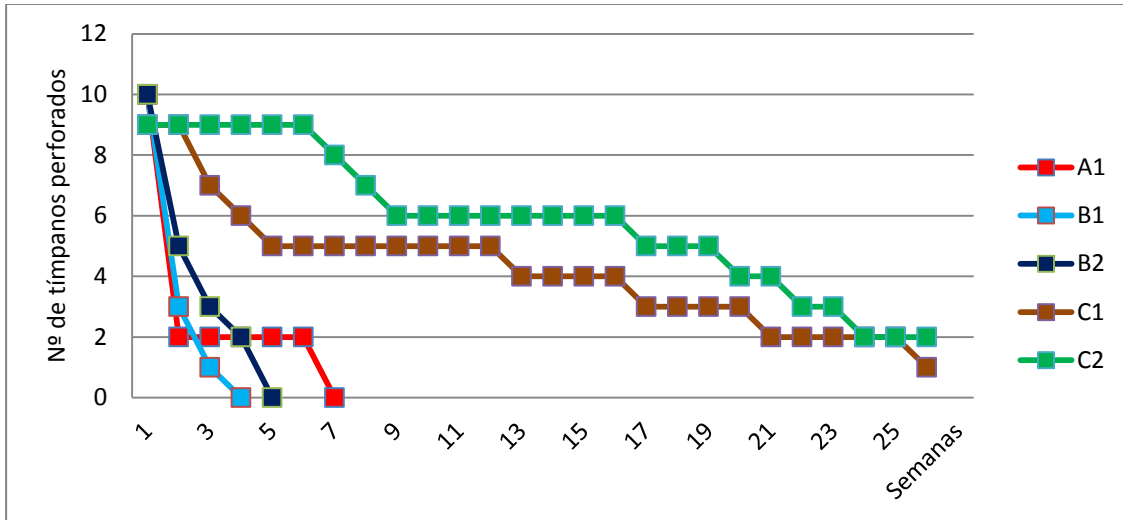
Brazo C1: Ratas tratadas con mitomicina C previa a la miringotomía sin amputación del mango del martillo + dexametasona.

Brazo C4: Ratas tratadas con mitomicina C previa a la miringotomía con amputación del mango del martillo + dexametasona.

Los resultados de esta tabla se representan en una gráfica (figura 19) en la que observamos como los tres primeros brazos (A1, B1 y B2) en los que utilizamos mitomicina C sola, no conseguimos mantener las perforaciones timpánicas durante 8 semanas, tiempo necesario para la cronificación de las mismas. Sin embargo en los



brazos C1 y C2, en los que los tímpanos han sido tratados con mitomicina C y dexametasona, se mantienen abiertas las perforaciones timpánicas más de estas 8 semanas necesarias para considerarlas cronificadas. En tres oídos las perforaciones timpánicas duraron más de 6 meses.



**Figura 19.** Gráfica de duración (semanas) de las perforaciones timpánicas tratadas con mitomicina C.

En rojo brazo A1: Ratas tratadas con mitomicina C tras la miringotomía con amputación del mango del martillo.

En azul claro brazo B1: Ratas tratadas con mitomicina C previa a la miringotomía sin amputación del mango del martillo.

En azul oscuro brazo B2: Ratas tratadas con mitomicina C previa a la miringotomía con amputación del mango del martillo.

En marrón oscuro brazo C1: Ratas tratadas con mitomicina C previa a la miringotomía sin amputación del mango del martillo + dexametasona.

En verde oscuro brazo C4: Ratas tratadas con mitomicina C previa a la miringotomía con amputación del mango del martillo + dexametasona.

## 5.4 Análisis Estadístico

En primer lugar hemos realizado un estudio de todas las posibles interacciones que se podían dar entre los distintos factores que hemos comparado, como son la lateralidad (la influencia de tratar el oído derecho o el izquierdo), la amputación (la realización de amputación o no amputación del mango del martillo), el tratamiento aplicado (Mitomicina C o Solución Salina) y el orden de aplicación (realizar primero la perforación timpánica y después la aplicación del tratamiento o empezar aplicando el tratamiento y finalmente realizar la perforación timpánica).

Se concluye que la lateralidad no presenta diferencias significativas para una  $p > 0.6$ .

Tras esto eliminamos dicho factor (lateralidad) y continuamos el estudio comparando el orden de aplicación del tratamiento. Para ello estudiamos el brazo A1 (Miringotomía incisional con amputación del mango del martillo y aplicación posterior de mitomicina C) con el brazo B2 (aplicación de mitomicina C y después realización de miringotomía incisional con amputación del mango del martillo). No obtenemos diferencias significativas entre ambos brazos con  $p > 0.8$ .

Después estudiamos los dos brazos del grupo A, comparamos el tratamiento con Mitomicina C frente al tratamiento con Solución Salina. Resultando una diferencia significativa para una  $p < 0.03$ .

Cuando comparamos los dos brazos de tratamiento con Mitomicina C del grupo B (aplicación de mitomicina C previa a la realización de miringotomía incisional sin amputación del mango del martillo: B1 o con amputación: B2) con los dos brazos de tratamiento con Solución Salina (B3 y B4) obtenemos una  $p$  igual a 0.08.

Sin embargo cuando se comparan los brazos C1 y C2 (aplicación de mitomicina C y realización posterior de miringotomía incisional sin amputación y con amputación del mango del martillo respectivamente, aplicando dexametasona en las revisiones) con los brazos C3 y C4 (aplicación de solución salina y posterior miringotomía incisional sin amputación y con amputación del mango del martillo, aplicando solución salina en las revisiones) para estudiar la diferencia que existe entre el tratamiento con Mitomicina C + Dexametasona frente a la Solución Salina, obtenemos una diferencia significativa con  $p < 0.006$ .

Cuando hemos comparado en este grupo C, los brazos C1 y C2 para ver las diferencias entre amputar y no amputar el mango del martillo hemos obtenido una diferencia no significativa con  $p > 0.3$ .

Hemos realizado un estudio entre los brazos C1, C2, B1 y B2 conjuntamente. En este hemos descartado la interacción de la lateralidad, obteniendo  $p > 0.8$ , también la interacción de la amputación con un valor  $p$  de 0.23, de forma que hemos evaluado la utilización de Dexametasona, obteniendo una diferencia significativa con  $p < 2 \times 10^{-7}$ .

### 5.5 Revisión a las 8 y 13 semanas

Una revisión de los datos a las 8 semanas muestra que en el grupo C quedan 17 oídos en el estudio, de los que 12 continúan perforados representando el 70.5 %.

En el brazo C1 de los 8 oídos que hay en el estudio a las 8 semanas, se mantienen 5 oídos perforados que representan el 62.5% (Tabla 7).

En el brazo C2 de los 9 oídos que hay en el estudio a las 8 semanas, se mantienen 7 oídos perforados que representan el 77.7%.

La revisión de los datos a las 13 semanas muestra que en el grupo C quedan 16 oídos en el estudio, porque en la semana 9 se eliminó un oído por otorrea, que corresponde al brazo C2. De esos 16 tímpanos quedan perforados 10, que suponen el 62.5 %.

En el brazo C1 de los 8 tímpanos que hay en el estudio, a las 13 semanas, se mantienen 4 tímpanos perforados que representan el 50% (Figura 20).

En el brazo C2 de los 8 tímpanos que hay en el estudio, a las 13 semanas, se mantienen 6 tímpanos perforados que representan el 75%.

**Tabla 7** Resultados obtenidos con Mitomicina C en el grupo C a las 8 y 13 semanas

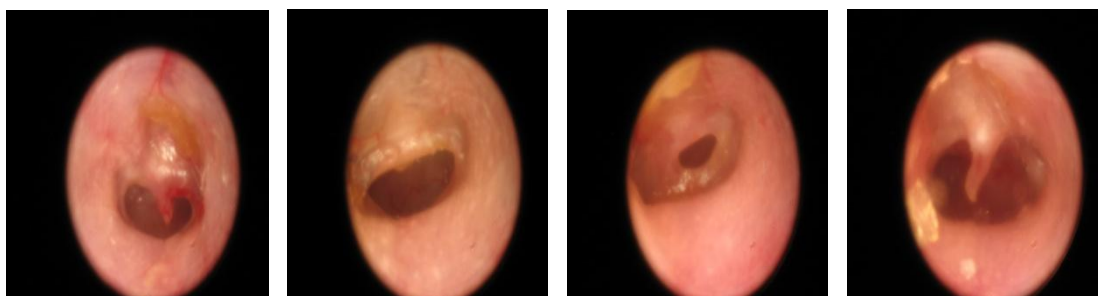
| Brazo | % Oídos con permeabilidad a las 8 semanas | % Oídos con permeabilidad timpánica a las 13 semanas |
|-------|---|--|
| C1    | 62.5 %                                    | 50 %   |
| C2    | 77.7 %                                    | 75 %   |

Brazo C1: Ratas tratadas con mitomicina C previa a la miringotomía sin amputación del mango del martillo + dexametasona.

Brazo C2: Ratas tratadas con mitomicina C previa a la miringotomía con amputación del mango del martillo + dexametasona.

A los 182 días, última revisión realizada, en el grupo C permanecían perforados 3 tímpanos. En el brazo C1 quedaba un tímpano perforado, habiéndose eliminado 2 oídos por otorrea y en el brazo C2 quedaban dos tímpanos perforados, habiéndose eliminado dos oídos por otorrea. Los tímpanos perforados en el grupo C al finalizar el estudio suponen el 21.4%.

En este grupo C se ha observado en 5 de las 9 ratas estudiadas, la aparición de una costra en los bordes de la perforación sin completarse el cierre. Las fechas de aparición fueron los días 49, 63, 70, 84 y 91, manteniéndose la costra desde su aparición, a pesar de que se retirara cada semana o cada dos semanas, sin que sirviera de inductor para el cierre de las perforaciones.



**Figura 20.** Representación de tímpanos perforados a los 3 meses de evolución.

## 5.6 Resumen de resultados.

1. Las miringotomías realizadas en ratas con aplicación de mitomicina C (0.4 mg/ml) permanecen permeables más tiempo que las tratadas con solución salina (0.9%).
2. La amputación o no amputación del mango del martillo, en las miringotomías realizadas en ratas y tratadas con mitomicina C (0.4 mg/ml), no influye en la duración de la permeabilidad de la perforación timpánica.
3. La duración de la permeabilidad de las miringotomías realizadas en ratas y tratadas previa o posteriormente con mitomicina C, no varía.

4. Las miringotomías realizadas en ratas, tratadas previamente con mitomicina C (0.4 mg/ml) y con dexametasona (4 mg/ml) los días 3, 7, 10 y 14, permanecen permeables más tiempo que las tratadas solo con mitomicina C (0.4 mg/ml).
5. Las miringotomías incisionales realizadas en ratas y tratadas previamente con mitomicina C (0.4 mg/ml) y con dexametasona (4mg/ml) los días 3, 7, 10 y 14 son un modelo murino de cronificación de perforación timpánica.

## **6 DISCUSIÓN**



Dado la relativamente poca información existente en la literatura con respecto a los modelos animales de perforaciones timpánicas crónicas, particularmente con tecnología no altamente sofisticada y disponibles en un laboratorio de investigación convencional, nos enfocamos intentar establecer un modelo animal de perforaciones timpánicas crónicas en ratas factible, robusto y asequible. Este modelo nos serviría de base para posteriores estudios sobre materiales de reconstrucción de las perforaciones realizados en nuestro grupo. Además este modelo es fundamental para realizar estudios preclínicos que puedan servir de base para desarrollar estudios en humanos sobre cronificación de miringotomías, evitando la utilización de drenajes transtimpánicos en los tratamientos de las otitis medias crónicas seromucosas.

Las perforaciones timpánicas en humanos se consideran crónicas cuando se muestran estables durante 3 meses<sup>70</sup>. En contraste y según el criterio establecido, en experimentación animal la cronificación de una perforación timpánica se establece cuando se mantiene entre 8 y 15 semanas<sup>71</sup>.

Desde la década de los 90 se han publicado numerosos estudios intentando establecer un modelo animal de cronicidad de las perforaciones timpánicas con distintos tipos de animales. Wang AY y col<sup>72</sup> realizaron una exhaustiva revisión en la literatura encontrando 37 trabajos, de los que sólo 23 lograron resultados positivos, consiguiendo la cronificación de la perforación timpánica, y en 14 de ellos solo consiguieron un retraso en la curación sin llegar a alcanzar una perforación crónica del tímpano. La especie animal más utilizada en estos estudios fue la chinchilla, seguida de la rata y el conejillo de indias.

Tanto la chinchilla como el conejillo de indias son animales caros y nada fáciles de manejar en el animalario. En nuestro trabajo hemos utilizado ratas Sprague Dawley que tienen los tímpanos con unas características histológicas muy parecidas a los tímpanos humanos<sup>6</sup>. Además son animales de uso frecuente en los animalarios, no agresivos, de fácil manejo en laboratorio, relativamente económicos y que toleran bien las múltiples anestias.

Para la anestesia de los animales utilizamos una asociación de ketamina-xilacina por vía intraperitoneal al igual que O'Reilly RC y col<sup>73</sup>, Jassir D y col<sup>52</sup>, Yucel OT<sup>49</sup> y Kaftan H y col<sup>60</sup>. Otros autores han utilizado Pentobarbital intraperitoneal<sup>63,74</sup>. Mientras que Estrem SA y col<sup>62</sup> han utilizado la vía inhalatoria con isofluorano.



Nuestro interés por elegir la mitomicina C en el desarrollo del modelo tiene su justificación, al ser una sustancia muy experimentada en las últimas décadas, con buen resultado en la cronicidad de las perforaciones timpánicas asociada a miringotomías láser. La mitomicina C es un agente citostático que tiene un efecto inhibitorio de la mitosis y la síntesis de proteínas y altera la replicación de los fibroblastos, con lo que retrasa la cicatrización de las heridas<sup>49</sup>.

Existe experiencia en la utilización de mitomicina C para la regeneración de perforaciones timpánicas, pero en los diferentes estudios hay poca uniformidad, y se caracterizan por una gran variabilidad en los métodos de aplicación, en los que se emplean distintas concentraciones de mitomicina C y diferentes tiempos de aplicación de este agente, por lo que resulta difícil su reproductibilidad y no hay protocolo claramente validado y utilizado de forma generalizada. Por otro lado, también son variables los animales que se han utilizado.

Tras un cuidadoso estudio de la literatura, decidimos emplear la dosis de 0.4 mg/ml de mitomicina C que es la que mejor resultado ofreció a Jassir D y col<sup>51</sup> tras comparar las dosis de 0.2 – 0.4 con la dosis de 2 mg/ml en un estudio realizado en conejillos de indias. En este estudio concluye que a las 8 semanas estaban cerradas todas las miringotomías que se realizaron con 2 mg/ml de mitomicina C, aumentando la otorrea y la toxicidad en el oído medio. A las 8 semanas permanecían abiertas el 11 % de las miringotomías tratadas con 0.2 mg/ml. La dosis de 0.4 mg/ml permitió la permeabilidad de las miringotomías en el 50 % a las 8 semanas y un 30 % a las 12 semanas.

En otro estudio sobre toxicidad publicado por Babu SC y col<sup>74</sup> se preconiza la utilización de gelfoam empapado en mitomicina C. En un estudio comparativo cuyos datos se resumen en la Tabla 8, estos autores compararon la aplicación directa de mitomicina C en oído medio de un grupo de animales y en otro grupo utilizaron gelfoam con mitomicina C. La evaluación comparativa de ambos grupos la realizaron mediante la prueba de respuesta auditiva de tronco cerebral, antes y después de la utilización de diferentes concentraciones de mitomicina C. Como puede verse en los resultados obtenidos, la aplicación realizada con gelfoam evitó completamente la toxicidad de la aplicación, por lo que está justificada su utilización.

**Tabla 8** Resumen de Resultados del trabajo de Babu Sc<sup>74</sup>

| Autor                                 | Tratamiento   | Resultados                                   |
|---------------------------------------|---|--|
| Babu SC <sup>74</sup><br><br>12 Ratas | Mitomicina C<br><br>Aplicación directa oído medio---<br><br>Aplicación con gelfoam----- | Toxicidad : > 0.20 mg/ml<br><br>No toxicidad |

En nuestra serie hemos aplicado la mitomicina C a una concentración de 0.4 mg/ml durante 10 minutos, tanto antes como después de las miringotomías. Jang CH y col<sup>75</sup> realizaron un estudio in vitro de los efectos de la mitomicina C sobre los fibroblastos de la membrana timpánica cuyos datos se exponen resumidos en la Tabla 9. Para ello realizaron cultivos de fibroblastos con mitomicina C a distintas concentraciones y con distintos tiempos de exposición. Evaluaron la respuesta por observación microscópica y por prueba de viabilidad celular, obteniendo los mejores resultados al aplicar la mitomicina C durante 10 minutos a una concentración de 0.4 mg/ml.

**Tabla 9** Resumen del trabajo de Jang CH<sup>75</sup>

| Autor                 | Tratamiento   | Resultados  |
|-----------------------|---|---|
| Jang CH <sup>75</sup> | Fibroblastos in vitro<br><br>+ Mitomicina C<br><br>0.4 mg/ml 10´<br><br>0.4 mg/ml 5´<br><br>0.2 mg/ml 10´ | Viabilidad de fibroblastos<br><br><br><br>42%<br><br>64%<br><br>57% |

El equipo de Strem SA y col<sup>62</sup> realizó un estudio en 60 ratas, haciéndoles miringotomías mediante un equipo láser y aplicación de mitomicina C a una concentración de 2 mg/ml. Estos investigadores realizaron varios grupos experimentales con distintos tiempos de aplicación de la mitomicina C (10 y 20

minutos) e incluso con dosis repetidas de mitomicina (dos dosis de 10 minutos separadas una semana y una dosis de 20 minutos y otra de 10 minutos separadas una semana). Tras el análisis de los datos concluyeron que no se amplía la tasa de permeabilidad utilizando más de 10 minutos la aplicación de la mitomicina C ni repitiendo las dosis.

En otro trabajo de Jassir y col<sup>52</sup> se estudia la seguridad y la eficacia de la mitomicina C a una concentración de 0.4 mg/ml, aplicada durante 10 minutos tras la realización de una miringotomía mediante un equipo láser. Los investigadores consiguieron mantener abiertas el 52.6% de las miringotomías a los 42 días y el 28.6 % a los 131 días. También realizaron el estudio de productos de distorsión de otoemisiones acústicas sin evidenciar ototoxicidad.

La duración de la permeabilidad de las miringotomías realizadas en este trabajo es superior al que hemos obtenido en nuestro estudio. Hay que considerar que aunque la concentración de mitomicina C y la duración de aplicación son las mismas, las miringotomías fueron realizadas mediante un equipo láser que podría influir en la duración de la permeabilidad.

En nuestro trabajo no se utilizó profilaxis antibiótica, resultando con otorrea cuatro oídos de dos ratas, en una rata un oído a las 3 semanas y el contralateral a las 9 semanas y en la segunda rata los dos oídos a las 17 semanas. Yucel OT<sup>49</sup> no aplica profilaxis antibiótica, obteniendo resultados similares a los nuestros, con dos oídos de los 40 estudiados con otorrea. Jassir D y col<sup>52</sup> tampoco mencionan la administración de una profilaxis antibiótica, reportando 5 casos de otorrea de 40 tímpanos tratados.

Otros autores que han utilizado profilaxis antibiótica, como O'Reilly RC y col<sup>73</sup> que empleó ampicilina a dosis de 150 mg/kg aplicado intramuscularmente durante 3 días, no describen casos de otorrea. Kaftan H y col<sup>60</sup> utilizaron trimeptoprim a dosis de 16 mg/ml y 80 mg/ml de sulfametoxazol por vía subcutánea a una dosis de 0.2 ml/kg, tampoco refieren casos de otorrea.

Dada la baja frecuencia de casos de otorrea, en nuestro estudio un 6.1 % de los oídos estudiados, y lo distantes del inicio del estudio, a las 3, 9 y 17 semanas, no parece justificado emplear profilaxis antibiótica en los ensayos clínicos sobre cronicidad de perforaciones timpánicas con mitomicina C en ratas.

En nuestro estudio hemos investigado el resultado de la aplicación de mitomicina C a un grupo de animales después de las perforaciones (grupo A) y en otro grupo de animales aplicamos la mitomicina C antes de las miringotomías, (grupo B), resultando una duración media en el primer grupo de 18.6 días superior a los 15.1 días en el segundo grupo, aunque esta diferencia no fue significativa.

Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Kaftan H y col<sup>60</sup>, que realizaron un ensayo con 12 ratas a las que les realizaron miringotomías y después les aplicaron mitomicina C a una concentración de 1 mg/ml durante 5 minutos, el resultado fue cierre de las perforaciones antes del día 35. En los oídos contralaterales aplicaron mitomicina C a una concentración de 2 mg/ml durante 10 minutos y después realizaron las miringotomías incisionales, permaneciendo abiertas el 42% de las perforaciones a los 35 días.

En este trabajo se aplican dos concentraciones y dos periodos de tiempo distintos. Si bien la diferencia de concentración no supone mayor permeabilidad según el trabajo desarrollado por Jassir D y col<sup>51</sup>, la diferencia de tiempo de exposición de la mitomicina C si puede influir, como demuestra en su estudio Jang CH y col<sup>75</sup>. Nosotros con iguales concentraciones y tiempos de aplicación de la mitomicina C obtenemos en el grupo de aplicación del citostático tras la miringotomía una duración mayor que en el grupo en el que la aplicación es previa a la miringotomía, pero la diferencia no es significativa.

En el trabajo de O'Reilly RC y col<sup>73</sup> trataron mediante miringotomías incisionales a 24 ratas y después les aplicaron mitomicina C a una concentración de 0.2 mg/ml durante 5 minutos en 40 oídos, aplicándoles a los 8 restantes solución salina. Las perforaciones de los controles se cerraron antes del día 14 mientras que las tratadas con mitomicina C curaron el día 14 un 32%, el día 25 un 75% y el día 44 un 92.5%.

La duración de la permeabilidad de las perforaciones timpánicas mayor de 6 semanas en un pequeño porcentaje de casos (7.5 %), se correlaciona más con nuestros resultados en el grupo en el que la aplicación de la mitomicina se hizo tras la miringotomía. No obstante en nuestro estudio el 80 % cerró en las dos primeras semanas, mientras que en este de O'Reilly solo curó el 32 % a los 14 días.

Dado que los resultados obtenidos no presentan una diferencia significativa entre los grupos de animales en los que se realizó la aplicación de la mitomicina C antes o

después de las miringotomías, adoptamos la técnica de poner la mitomicina C antes de la perforación porque esto además nos ha permitido comparar la influencia en la permeabilidad de las perforaciones timpánicas con amputación del mango del martillo y sin amputación.

Cuando realizamos primero la miringotomía, las maniobras de colocación y extracción del gelfoam empapado en mitomicina C producían un arrancamiento del mango del martillo con mucha frecuencia. Sin embargo la aplicación previa a la miringotomía, permitía la realización de una amputación del mango del martillo o su conservación según interesara.

La comparación entre perforaciones con amputación del mango del martillo con otras sin amputación se justifica porque existen trabajos en los que se han localizado células madre epiteliales en las regiones anulares y en la región del mango del martillo<sup>76</sup>.

En nuestro caso hemos obtenido en el grupo de animales en el que hemos realizado una perforación con amputación del mango del martillo (grupo B2), una duración media de las perforaciones timpánicas de 17.5 días, mientras que en el grupo de animales en el que no se realizó la amputación (grupo B1), la duración media fue de 12.6 días, no siendo una diferencia significativa. En el grupo C de animales tratados con mitomicina C antes de la perforación y dexametasona después de la misma, también se realizó un brazo C2 con amputación del mango del martillo con una duración media de 130.5 días y un brazo C1 sin amputación del mango del martillo con una duración media de 95 días cuya diferencia tampoco fue significativa. Por tanto en nuestras series de animales no hemos observado diferencias entre realizar amputación del mango del martillo y no realizarla.

En cuanto a los oídos tratados con solución salina, que han servido de controles, obtuvimos resultados similares a los publicados en la mayoría de los trabajos, una permeabilidad media de 8.3 días. Esta duración fue significativamente menor que la obtenida en los grupos de ratas tratadas con mitomicina C.

La asociación de dexametasona a la mitomicina C prolonga la tasa de permeabilidad de las miringotomías. Estos resultados coinciden con el estudio realizado en ratas por Kaftan H y col<sup>61</sup> en el que utiliza mitomicina C a una concentración de 2 mg/ml aplicada durante 10 minutos antes de la perforación timpánica. En las revisiones realizadas los días 3, 6, 9 y 14 desde el inicio del trabajo, aplica una solución de

dexametasona a una concentración de 4 mg/ml en los oídos de las ratas. Reporta unos resultados de 17.5 días de media en la permeabilidad de las miringotomías cuando utiliza solo mitomicina C y 32 días cuando asocia dexametasona a la mitomicina C.

En nuestro estudio hemos conseguido una permeabilidad media en los tímpanos tratados con miringotomías tras la aplicación de mitomicina C, grupo B de 15.1 días, mientras que en el grupo C con la aplicación de mitomicina C y dexametasona la permeabilidad media ha sido de 112.7 días. Similar a los resultados de Kaftan H y col<sup>61</sup> cuando hemos utilizado mitomicina C sola pero muy superior cuando hemos asociado dexametasona a la mitomicina C.

En nuestro protocolo hemos seguido el modelo de aplicación de la dexametasona de Kaftan H y col, aunque con pequeñas variaciones. Hemos utilizado la concentración de mitomicina C de 0,4 mg/ml justificado por los trabajos que hemos mencionado con anterioridad y hemos revisado los días 3, 7, 10 y 14 pues nos parece que está más equilibrada la distribución de las cuatro dosis de dexametasona entre los primeros 14 días. La diferencia de tiempo de permeabilidad de las perforaciones timpánicas obtenida entre el trabajo de Kaftan H y col y el nuestro, cuando hemos aplicado dexametasona, pensamos que se debe a la diferencia de concentración de la mitomicina C (Tabla 10).

La aplicación de dexametasona intratimpánica es segura en humanos, no afectando a la función de las células ciliadas externas del oído interno. Esto ha sido comprobado mediante otoemisiones otoacústicas por Yilmaz I y col<sup>77</sup>

Los grupos A y B (aplicación de mitomicina C después y antes de la miringotomía respectivamente) de nuestro trabajo no llegan, en duración de las perforaciones timpánicas, a las 8 semanas que se necesitan para establecer el criterio de cronicidad.

Sin embargo en el grupo C (aplicación de mitomicina C y dexametasona), a las 8 semanas, en el brazo C2 queda el 77.7% de los oídos perforados y en el brazo C1 un 62.5% de los tímpanos. De ahí que podamos establecer este método como modelo de cronificación de las perforaciones timpánicas en ratas.

Otro objetivo de nuestra investigación fue comprobar si el método que nos ha permitido conseguir el modelo animal de cronificación de perforaciones timpánicas, nos podría servir para tratar las otitis seromucosas sin necesidad de colocar un drenaje transtimpánico. Para ello revisamos los resultados obtenidos a las 13 semanas pues

sería el momento en el que podamos establecer cronificada una perforación timpánica en clínica médica.

**Tabla 10** Resultados de los ensayos con miringotomías incisionales y  $\pm$  aplicación de mitomicina C

| Autor                              | Tratamiento  | Resultados                                    |                                  |                                |
|------------------------------------|--|---|----------------------------------|--------------------------------|
| Kaftan H <sup>60</sup><br>12 Ratas | Incisional + Mitomicina C<br>1 mg/ml. 5´<br><br>Mitomicina C + Incisional<br>2 mg/ml. 10´  | 5 Semanas<br><br>0%<br><br>42%                |                                  |                                |
| O'Reilly <sup>73</sup><br>24 Ratas | Incisional + Mitomicina C<br><br>0.2 mg/ml 5´  | 2 Semanas<br><br>68%                          | 25 Días<br><br>25%               | 44 Días<br><br>7.5%            |
| Kaftan H <sup>61</sup><br>12 Ratas | Mitomicina C (2mg/ml) 10´ +<br>Incisional<br><br>Mitomicina C (2mg/ml) 10´ +<br>Incisional + Dex. 4 mg/ml                                  | 17.5 Días de media<br><br>32.0 Días de media  |                                  |                                |
| Nosotros<br>20 Ratas               | Mitomicina C (0.4 mg/ml) 10´ +<br>Miringotomía incisional<br><br>Mitomicina C (0.4mg/ml) 10´<br>+Miringotomía incisional + Dex.<br>4 mg/ml | 15.1 Días de media<br><br>112.7 Días de media | 0%<br><br>8 Semanas<br><br>70.5% | 0%<br><br>13 Sem.<br><br>62.5% |

Incisional: Miringotomía incisional.

Dex.: Dexametasona

En el grupo C de nuestro estudio, a las 13 semanas queda un 75% de los tímpanos perforados en el brazo C2 (con amputación del mango del martillo) y un 50% de los oídos perforados en el brazo C1 (sin amputación del mango del martillo). Por tanto

podría plantearse hacer un ensayo en humanos con este método para tratar la otitis media crónica seromucosa sin necesidad de colocar un drenaje transtimpánico.

Hay algún estudio realizado con mitomicina C como alternativa a los drenajes transtimpánicos pero casi siempre realizando las miringotomías con equipo láser. En 2004 D'ereditá R<sup>78</sup> realizó un ensayo con 15 niños a los que les aplicó en uno de los oídos mitomicina C antes de realizar una miringotomía con un láser de diodo y en los oídos contralaterales aplicó solución salina y después realizó la miringotomía con dicho láser. No obtuvo diferencias significativas entre ambos tratamientos, resultando un tiempo medio de curación de las perforaciones timpánicas de 3-4 meses. La evaluación se prolongó hasta los 2 años desde el comienzo del estudio, no teniendo complicaciones significativas.

En el estudio realizado por Hesham A y col<sup>64</sup> en humanos, comparan la aplicación previa de mitomicina C a la colocación de un drenaje transtimpánico, con la aplicación de solución salina previa a la colocación del drenaje. Concluyen que no hay diferencias significativas en la duración de la permanencia de los drenajes transtimpánicos entre los dos métodos.

La mayor duración de los drenajes transtimpánicos respecto a la miringotomía realizada tras la aplicación de mitomicina C, hace que no se observen diferencias entre la aplicación previa de solución salina y la de la mitomicina C.

Otros trabajos han intentado cronificar las perforaciones timpánicas en humanos comparando la colocación de drenajes transtimpánicos con las miringotomías con láser o asociándoles otras sustancias como la dexametasona.

Kuo CL y col<sup>79</sup> han realizado un trabajo en pacientes con carcinoma nasofaríngeo tratados con radioterapia que presentaban otitis media crónica seromucosa. Trataron a 27 pacientes (44 oídos) mediante miringotomía láser y la aplicación semanal durante 3 semanas de 0.5 ml de dexametasona a una concentración de 5 mg/ml. Consiguieron una perforación timpánica persistente en el 52.3 %, revisando los oídos un periodo medio de 37 semanas. En el 40.9 % desarrollaron una otitis media crónica seromucosa recidivante.

Los ensayos clínicos en humanos realizados por Youssef TF y col<sup>48</sup> utilizaron el láser de CO<sub>2</sub> para realizar una miringotomía sin colocación de tubos de drenaje, en el tratamiento de la otitis seromucosa. La duración de las perforaciones timpánicas



cuando se utilizó el láser de CO<sub>2</sub> solo fue de 23 días de media, mientras que con los drenajes transtimpánicos fue de 4 meses. Estos autores concluyen que este enfoque es un tratamiento alternativo al clásico de la colocación de drenajes transtimpánicos a corto plazo.

Hay múltiples trabajos realizados en ratas con miringotomías mediante láser solo o con mitomicina C, comparado con los de miringotomías incisionales. La mayor parte de los trabajos asocian mitomicina C con miringotomías realizadas mediante un equipo láser, dado que el tiempo de permeabilidad de las miringotomías es mayor que cuando se utiliza la técnica incisional.

Poyrazoglu E y col<sup>50</sup> utilizaron los equipos láser para realizar miringotomías con intención de cronificar las perforaciones timpánicas en ratas. La mayor parte de las perforaciones realizadas con láser de CO<sub>2</sub> permanecieron abiertas entre dos y siete semanas, sin pasar de 50 días, mientras que las realizadas mediante incisión con bisturí frío se cerraron entre el día 3 y el día 15. La duración de la permeabilidad de las perforaciones realizadas mediante láser de CO<sub>2</sub> fue significativamente más larga que la realizada mediante una incisión clásica.

Sin embargo en otro trabajo realizado por Castagno y col<sup>53</sup> en el que se comparan la duración de las perforaciones timpánicas en ratas mediante miringotomía incisional con la miringotomía realizada mediante un equipo láser, se obtuvieron resultados sin diferencias entre ambas técnicas, con cicatrización antes de 10 días.

Yucel OT<sup>49</sup> ha utilizado la combinación de miringotomía láser y la aplicación de mitomicina C a las concentraciones de 1 y 2 mg/ml, obteniendo como resultado una tasa de permeabilidad media de 5.8 y 6.0 semanas respectivamente, mientras que cuando se utiliza solo el láser sin mitomicina C la permeabilidad media fue de 1.5 semanas.

Estrem y col<sup>63</sup> realizan miringotomías con un equipo láser en 20 tímpanos de ratas, tras la aplicación de mitomicina C a una concentración de 2 mg/ml y 15 minutos de duración. Obtienen una permeabilidad media de 9.5 semanas, similar a la permeabilidad conseguida en otros estudios en los que se aplica mitomicina C tras la miringotomía realizada con un equipo láser.

Los resultados de estos estudios se resumen en la Tabla 11 y, como era de esperar, son diferentes a los obtenidos en nuestro estudio que muestran, usando solo mitomicina C

después y antes de la miringotomía 18.6 días de permeabilidad media en el grupo A y en el grupo B de 15.07 días respectivamente.

Pero no en todos los laboratorios hay disponibilidad de estos caros equipos láser, por lo que resulta obligado investigar otras técnicas de similar eficacia pero más asequibles y factibles para un laboratorio de investigación sin tecnología muy sofisticada.

Por tal motivo en nuestro estudio nos enfocamos a la puesta en marcha de una técnica protocolizada, sin necesidad de equipo láser, e investigamos asociaciones de la mitomicina C con la dexametasona, de forma que se prolongara la duración de las miringotomías, consiguiendo unas medias en duración de perforaciones timpánicas de 112.7 días en el grupo C, comparables con los trabajos de láser comentados.

**Tabla 11** Resultados de miringotomías láser y aplicación de ± mitomicina C o dexametasona

| Autor   | Tratamiento  | Resultados (Permeabilidad)                       |                       |
|---|--|--|-----------------------|
| Déreditá R <sup>78</sup><br>(15 Niños)            | Mit. C + Láser diodo<br>Solución salina + Láser                                | 3-4 meses de media (No diferencia significativa) |                       |
| Jassir <sup>51</sup><br>(40 Conejillos de Indias) | Láser + Mit. C<br>0.2 mg/ml<br>0.4 mg/ml<br>2.0 mg/ml                          | 8 semanas<br>11%<br>50%<br>0%                    | 12 semanas<br><br>30% |
| Strem SA <sup>62</sup><br>(60 Ratas)              | Láser + Mit.C (2mg/ml)<br>10´<br>20´<br>10´----semana 10´<br>20´----semana 10´ | Mejor resultado con 10´                          |                       |
| Jassir <sup>52</sup><br>(20 Cobayas)              | Láser + Mit. C<br>( 0.4 mg/ml. 10´ )   | 6 semanas<br>52.6%                               | 19 semanas<br>28.6%   |
| Kuo CI <sup>79</sup><br>(44 Oídos OMS)            | Láser + Dex. (5mg/ml)  | 37 semanas<br>52.3%                              |                       |
| Poyrazoglu E y col <sup>50</sup> (34 Ratas)       | Láser CO <sub>2</sub> (34 Oídos)<br>Incisionales (34 Oídos)                    | 2-7 semanas<br>3-15 días                         |                       |

| Autor                                      | Tratamiento  | Resultados (Permeabilidad)  |
|--|--|---|
| Castagno y col <sup>53</sup><br>(34 Ratas) | Láser Argón (34 Oídos)<br>Incisionales (34 Oídos)  | < 10 días en ambos  |
| Yucel <sup>49</sup><br>(40 Oídos)          | Láser CO <sub>2</sub> + Mit. C (2mg/ml) (10 Oídos)<br>Láser CO <sub>2</sub> + Mit. C (1 mg/ml) (10 Oídos)<br>Láser CO <sub>2</sub> solo (10 Oídos) | 6 semanas<br>5.8 semanas<br>1.5 semanas                                 |
| Youssef <sup>48</sup><br>(86 Pacientes)    | Láser CO <sub>2</sub><br>Drenajes transtimpánicos  | 23 días<br>120 días   |
| Estrem <sup>63</sup><br>(120 Oídos)        | Láser KTP<br>+<br>Mit. C 10 minutos<br>Mit. C 20 minutos<br>Mit. C 10 y 10 minutos<br>Mit. C 20 y 10 minutos<br>Solución Salina                    | 6.5 semanas<br>5.5 semanas<br>6.5 semanas<br>8.5 semanas<br>1.5 semanas |

Mit. : mitomicina C. Dex.: dexametasona. Láser: miringotomías con láser. Incisionales: miringotomías incisionales

La disminución de la fibrosis que es una propiedad de la mitomicina C, se usa habitualmente en las intervenciones quirúrgicas en las que se esperan grandes fibrosis como complicación postquirúrgica. Cincik H y col<sup>82</sup> estudiaron 70 ratas tras dividir las en tres grupos, un primer grupo de 30 ratas a las que les aplicaron mitomicina C (0,4 mg/ml), otro grupo de 30 ratas que trataron con 5 fluorouracilo (50 mg/ml) y un grupo control de 10 ratas tratado con solución salina. Realizaron una comparativa de la fibrosis timpánica entre los tres grupos, concluyendo que el grupo control mostraba una fibrosis moderada y los otros dos grupos una fibrosis leve. Encuentran una diferencia significativa entre los grupos tratados con mitomicina C y 5 fluorouracilo con respecto al grupo control, no hallando diferencia significativa entre el grupo de mitomicina C y el de 5 fluorouracilo.

La mitomicina C se ha utilizado en patologías de especialidades como otorrinolaringología y oftalmología.

La utilización de mitomicina C en el tratamiento de los queloides de oído a una concentración de 1 mg/ml, ha conseguido prevenir las recurrencias y dar un resultado estético aceptable<sup>80</sup>. También se ha utilizado para reducir la incidencia de sinequias en la cirugía de los senos paranasales. Se ha usado a una concentración de 1 mg/ml, aplicándolo tópicamente tras la cirugía y con ello se consigue una reducción de la formación de sinequias<sup>81</sup>.

En oftalmología se ha utilizado la mitomicina C en las recidivas de la trabeculectomía para mejorar la presión intraocular<sup>83</sup>.

Se han utilizado otras sustancias para generar cronicidad en las perforaciones timpánicas en animales.

El 5-fluorouracilo ha sido utilizado por Cincik H y col<sup>54</sup>, realizando una miringotomía incisional y comparando la aplicación de 5-fluorouracilo a dosis de 50 mg/ml y 10 mg/ml con la aplicación de una solución salina. La máxima permeabilidad la consiguen con dosis de 50 mg/ml, cerrando todas las perforaciones antes del día 25, con lo que no se consigue la cronicidad. La dosis de 10 mg/ml obtiene unos resultados superponibles a los de la solución salina.

NaderPour M y col<sup>55</sup> compararon la cronicidad del 5-fluorouracilo a dosis de 50 mg/ml con una solución de mitomicina C a dosis de 4 mg/ml en perforaciones de membrana timpánica de ratas. Consiguen una permeabilidad de las perforaciones timpánicas de 37 días con la mitomicina C, 16 días con el 5-fluorouracilo y 12 días con la solución salina, siendo la diferencia significativa entre la mitomicina C y las otras sustancias, 5-fluorouracilo y solución salina.

Halofuginona tópica es otra sustancia que se ha probado en la cronicidad de las perforaciones timpánicas en ratas. Ozdemir T y col<sup>56</sup> compararon halofuginona en gel con un gel de solución salina obteniendo una permeabilidad de las perforaciones timpánicas de 21.43 días de media con la halofuginona y 7.50 días con la solución salina, siendo la diferencia significativa. Pero no pudiendo establecerla como modelo de cronicidad de perforaciones timpánicas en ratas.

Se ha estudiado la aplicación de colchicina<sup>57</sup> a distintas concentraciones, observando ototoxicidad cuando se aplica en oído medio a una concentración superior a 0.1%. En ese mismo estudio aplicaron colchicina a concentración de 0.01 % en ratas, con

resultados positivos en la prolongación de la duración de las perforaciones siendo superiores a 2.14 semanas, con diferencia significativa respecto a los controles tratados con solución salina. No obstante no se aproxima a las 8 semanas que se precisan para establecer cronificada una perforación timpánica en animales.

La utilización de corticoides (hidrocortisona) en gotas diariamente durante 10 días para la cronificación de las perforaciones timpánicas en ratas, fue utilizada por Rahman<sup>35</sup>, tras la miringotomía con láser. En un estudio realizado por Spandow O y col<sup>58</sup> se aplicó hidrocortisona tópica durante 10 días tras haber realizado miringotomías incisionales, comparándolas con la aplicación de una solución salina. Obtuvieron como resultado una permeabilidad timpánica mayor de 50 días en todos los oídos y una persistencia de 3 meses de las perforaciones en un tercio de los tímpanos. En los oídos controles se observó un aumento de la duración de la permeabilidad, atribuido a la absorción sistémica de la hidrocortisona aplicada en los oídos contralaterales. Con la hidrocortisona se precisan anestias durante los primeros 10 días para aplicarla, lo que aumenta el riesgo de complicaciones en las ratas.

Otra sustancia utilizada en la cronicidad de las perforaciones timpánicas ha sido el glutaraldehído al 2%, ensayado en perros por Truy E y col<sup>59</sup>, obteniendo unos resultados de un 57% de permeabilidad de las perforaciones tratadas, a las 15 semanas. Habiendo una diferencia significativa en la duración de las perforaciones timpánicas entre los oídos no tratados y los tratados con glutaraldehído al 2%.

El glutaraldehído no se ha probado en otros animales y los perros no son animales fáciles de conseguir ni de mantener para la investigación.

También se han utilizado chinchillas en un estudio realizado por Amoils y col<sup>84</sup> sin aplicar sustancias químicas en las perforaciones. Realizaron microcolgajos con los fragmentos timpánicos perforados. Consiguieron con este sistema mantener las perforaciones timpánicas abiertas en un 84 % de los casos a las 8 semanas de haber realizado la perforación. Esto además de no poder reproducirse en las ratas técnicamente, presenta un riesgo elevado de generación de colesteatomas. Además la chinchilla no es un animal fácil de conseguir en todos los países.

Emami N y col<sup>85</sup> han intentado reproducir el ensayo de Amoils y col<sup>84</sup> no consiguiendo los resultados descritos. La media del tiempo de cicatrización de las perforaciones timpánicas fue de 4.8 semanas (rango de 4 a 6 semanas).

En definitiva, tras analizar los resultados de todos estos grupos, consideramos que los datos de nuestra serie se comparan favorablemente con la mayoría de ellos y que pueden ser considerados como una alternativa factible, segura y apropiada para el desarrollo de modelos preclínicos de perforación timpánica crónica en ratas.



## **7 CONCLUSIONES**





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

1. Hemos logrado establecer un modelo murino de perforaciones timpánicas crónicas aplicando mitomicina C (0.4 mg/ml durante 10') previamente a la miringotomía incisional y asociando dexametasona (4 mg/ml). Este modelo realizado en ratas Sprague Dawley es robusto, reproducible y muy práctico para la investigación de novedades terapéuticas en esta patología.
2. La amputación del mango del martillo y el orden de aplicación de la mitomicina C, antes o después de la perforación timpánica, no influyen en la duración de la permeabilidad de la miringotomía incisional en rata.
3. La asociación de dexametasona a la mitomicina C es un componente clave para la eficacia del modelo.
4. Este modelo murino de cronificación de perforación timpánica mantiene una duración de las miringotomías superior a 3 meses, lo que justificaría su empleo en los estudios preclínicos de nuevas terapias en el tratamiento de las otitis seromucosas, sin la utilización de los drenajes transtimpánicos.



## **8 REFERENCIAS**



- 1.- Tran Ba Huy P. Otitis media crónica. Historia natural y formas clínicas. EMC (Elsevier SAS, París), Otorrinolaringología, 20-095-A-10, 2005.
- 2.- Kaftan H, Noack M, Friedrich N, Völzke H, Hosemann W. Prevalence of chronic tympanic membrane perforation in the adult population. HNO. 2008 Feb;56(2):145-50.
- 3.- Delas B, Dehesdin D. Anatomie de l'oreille externe. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-010-A-10, 2008.
- 4.- Thomassin J M, Dessi P, Danvin J B, Forman C. Anatomie de l'oreille moyenne. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Oto-rhino-laryngologie, 20-015-A-10, 2008.
5. - Hütterbrink KB. The fixation theory of middle ear muscle function. Laryngol Rhinol Otol (Stuttg). 1988 Aug;67(8):404-11.
- 6.- Santa Maria PL, Redmond SL, Atlas MD, Ghassemifar R. Histology of the healing tympanic membrane following perforation in rats. Laryngoscope. 2010 Oct; 120(10):2061-70.
- 7.- Lim DJ. Human tympanic membrane. An ultrastructural observation. Acta Otolaryngol. 1970 Sept;70(3):176-86.
- 8.- Funnell WR, Laszlo CA. A critical review of experimental observations on ear-drum structure and function. ORL J. Otorhinolaryngol Relat Spec. 1982;44(4):181-205.
- 9.- Schmidt SH, Hellström S. Tympanic-membrane structure-new views. A comparative study. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 1991;53(1):32-6.
- 10.- Smith M, Darrat I, Seidman M. Otologic complications of cotton swab use: one institution's experience. Laryngoscope. 2012 Feb;122(2):409-11.
- 11.- Lou ZC, Tang Y M, Yang J. A prospective study evaluating spontaneous healing of aetiology, size and type-different groups of traumatic tympanic membrane perforation. Clin Otolaryngol. 2011 Oct;36(5):450-60.
- 12.- Browning GG, Gatehouse S. The prevalence of middle ear disease in the adult British population. Clin Otolaryngol Allied Sci. 1992 Aug;17(4):317-21.
- 13.- 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. 2011 Oct;36(5):450-60.

- 14.- Salihoqlu M, Hardal U, Cincik H. Prevalence of chronic otitis media in the young male population in Turkey. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg.* 2010 Nov-Dec;20(6):273-6.
- 15.- Yaman H, Guclu E, Yilmaz S, Ozturk O. Myringosclerosis after tympanostomy tube insertion: relation with tube retention time and gender. *Auris, nasus, larynx.* 2010 Dec;37(6):676-9
- 16.- Zollner F. The principles of plastic surgery of the sound-conducting apparatus. *J Laryngol Otol.* 1955 Oct;69(10):637-52.
- 17.- Wullstein H. Theory and practice of tympanoplasty. *Laryngoscope.* 1956 Aug;66(8):1076-93.
- 18.- Heermann H. Tympanoplasty with fascial tissue taken from the temporal muscle after straightening the anterior wall of the auditory meatus. *HNO.* 1961 Feb;9:136-7.
- 19.- Atkins J. Temporalis fascia used for closure of attic cavities and perforations of the tympanic membrane. *J Laryngol Otol.* 1964 Feb;78:124-7.
- 20.- Decroix G, Deguine C. La greffe de fascia temporal. *Compte rendu congrès Francais ORL.* Paris: Arnette. 1964.
- 21.- Kartush JM, Michaelides EM, Becvarovski Z, LaRouere MJ. Over-under tympanoplasty. *Laryngoscope.* 2002 May;112(5):802-7.
- 22.- Goodhill V, Harris I, Brockman SJ. Tympanoplasty with perichondral graft. A preliminary report. *Arch Otolaryngol.* 1964 Feb;79:131-7.
- 23.- Thomassin JM, Facon F, Gabert K. The effectiveness of otoendoscopy in myringoplasty using adipose graft. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 2004 Dec; 121(6):346-9.
- 24.- Saliba I, Woods O. Hyaluronic acid fat graft myringoplasty: a minimally invasive technique. *Laryngoscope.* 2011 Feb;121(2):375-80.
- 25.- Mürbe D, Zahnert T, Bornitz M, Hüttenbrink KB. Acoustic properties of different cartilage reconstruction techniques of the tympanic membrane. *Laryngoscope* 2002 Oct;112(10):1769-76.
- 26.- Eavey RD. Inlay tympanoplasty: cartilage butterfly technique. *Laryngoscope.* 1998 May;108(5):657-61.

- 27.- Tek A, Karaman M, Uslu C, Habeşoğlu T, Kılıçarslan Y, Durmuş R, Esen S, Egeli E. Audiological and graft take results of cartilage reinforcement tympanoplasty (a new technique) versus fascia. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2012 Apr;269(4):1117-26.
- 28.- Niklasson A, Tano K. The Gelfoam<sup>R</sup> plug: an alternative treatment for small eardrum perforations. *Laryngoscope.* 2011 Apr;121(4):782-4.
29. - Marquet JF. Twelve years' experience with homograft tympanoplasty. *Otolaryngol Clin North Am.* 1977 Oct;10(3):581-93.
- 30.- Insausti CL, Alcaraz A, Garcia-Vizcaino EM, Mrowiec A, López-Martínez MC, Blanquer M, et al. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society.* 2010 Jul-Aug;18(4):368-77.
- 31.- Moraleda Jiménez JM. La terapia celular en enfermedades no hematológicas: ¿sueño o realidad? *Revista de Hematología Mexicana.* 2011;12(4):239-41.
- 32.- Blanquer M, Pérez-Espejo MA, Martínez-Lage JF, Iniesta F, Martínez S, Moraleda JM. A surgical technique of spinal cord cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Methods.* 2010 Aug 30;191(2):255-7.
- 33.- Insausti CL, Blanquer M, Majado MJ, Insausti A, Moraleda JM. Utilidad terapéutica potencial de las células madre de la membrana amniótica. *Revista de Hematología mexicana.* 2011;11(4):276-86.
- 34.- 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.
- 35.-Rahman A, Olivius P, Dirckx J, Von Unge M, Hultcrantz M. Stem cells and enhanced healing of chronic tympanic membrane perforation. *Acta oto-laryngologica.* 2008 Apr;128(4):352-9.
- 36.- Manach Y. Histoire naturelle de l'otite séromuqueuse. *Méd Mal Infect* 1996;26:49-52.
- 37.- Tran Ba Huy P. Otitis media crónica. Historia natural y formas clínicas. EMC (Elsevier SAS, París). Otorrinolaringología, 20-095-A-10, 2005.



- 38.- Mogi G. Immunologic studies on the ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol (suppl)*. 1992; 157:4-87.
- 39.- Gok U, Bulut Y, Keles E, Yalcin S, Doymaz MZ. Bacteriological and PCR analysis of clinical material aspirated from otitis media with effusions. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2001 Jul 30;60(1):49-54.
- 40.- Fria TJ, Cantekin EI, Eichler JA. Hearing acuity of children with otitis media with effusion. *Arch Otolaryngol*. 1985 Jan;111(1):10-6.
- 41.- Grace Ar, Pfeleiderer AG. Dysequilibrium and otitis media with effusion: what is the association? *J Laryngol Otol*. 1990 Sep;104(9):682-4.
- 42.- Beery QC, Bluestone CD, Cantekin EI. Otologic history, audiometry and tympanometry as a case finding procedure for school screening. *Laryngoscope*. 1975 Dec;85(12 pt 1):1976-85.
- 43.- Jerger J. Clinical experience with impedance audiometry. *Arch Otolaryngol*. 1970 Oct;92(4):311-24.
- 44.- Dix MR, Hallpike CS. The peep-show technique for pure tone audiometry in young children. *Proc R Soc Med*. 1948 Jan;41(1):15.
- 45.- Lambert E, Roy S. Otitis media and ear tubes. *Pediatr Clin North Am*. 2013 Aug; 60(4):809-26.
- 46.- Tavin ME, Gordon M, Ruben RJ. Hearing results with the use of different tympanostomy tubes: a prospective study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1988 Feb; 15(1):39-50.
- 47.- Kay DJ, Nelson M, Rosenfeld RM. Meta-analysis of tympanostomy tube sequelae. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001 Apr;124(4):374-80.
- 48.- Youssef TF, Ahmed MR. Laser-assisted myringotomy versus conventional myringotomy with ventilation tube insertion in treatment of otitis media with effusion: Long-term follow-up. *Interv Med Appl Sci*. 2013 Mar;5(1):16-20.
- 49.- 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

- 50.- Poyrazoglu E, Cincik H, Gungor A, Gurpinar B, Yildirim S, Candan H. The effects of incisional myringotomy and CO<sub>2</sub> laser myringotomy on rat tympanic membranes. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2004 Jun;68(6):811-5.
- 51.- 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 Nov;129(5):471-4.
- 52.- Jassir D, Buchman CA, Gomez-Marin O. Safety and efficacy of topical mitomycin C in myringotomy patency. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001 Apr;124(4):368-73.
- 53.- Castagno LA, Lavinsky L. Tympanic membrane healing in myringotomies performed with argon laser or microknife: an experimental study in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006 Nov-Dec;72(6):794-9.
- 54.- Cincik H, Güngör A, Sağlam O, Cekin E, Yildirim S, Poyrazoglu E. Effective dose of 5-fluorouracil for myringotomy in rats. *Med Sci Monit* 2005 Sept;11(9): BR330-4.
- 55.- 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;76(1):9-13.
- 56.- Ozdemir T, Cincik H, Dogru S, Cekin IE, Ulubil SA, Gungor A. Efficacy of topical halofuginone in myringotomy patency. *Eur Arch otorhinolaryngol*. 2010 Nov;267(11):1701-4.
- 57.- 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.
- 58.- Spandow O, Hellström S. Animal model for persistent tympanic membrane perforations. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1993 Jun;102(6):467-72.
- 59.- Truy E., Disant F., Morgon A. Chronic tympanic membrane perforation: an animal model. *Am J Otol*. 1995 Mar;16(2):222-5.
- 60.- Kaftan H, Hosemann W. Topical application of mitomycin C before versus after myringotomy: an experimental study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2006;68(2): 73-6

- 61.- Kaftan H, Hosemann W. Topical application of mitomycin C in combination with dexamethasone: effective delay of myringotomy closure. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006;68(4):185-8
- 62.- Estrem SA, Batra PS. Preventing myringotomy closure with topical mitomycin C in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999 Jun;120(6):794-8
- 63.- Estrem SA, Baker TJ. Preapplication of mitomycin C for enhanced patency of myringotomy. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000 Mar;122(3):346-8.
- 64.- Hesham A, Hussien A, Hussein A. Topical mitomycin C application before myringotomy and ventilation tube insertion: does it affect the final outcome? *Ear Nose Throat J.* 2012 Aug;91(8):E1-4.
- 65.- Baumans V. The welfare of laboratory mice. En: Kaliste E, editora. *The welfare of Laboratory Animals.* Dordrecht: Springer; 2007. 119-52.
- 66.- BOE (2005) Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *BOE* 252 (21 Octubre 2005): 34367-91. 2005.
- 67.- BOE (2007) Ley 32/2007 para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. *BOE* 268 (8 Noviembre 2007): 45914-20. 2007.
- 68.- 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.
- 69.- ULAM. Guidelines for Anesthesia and Analgesia of Rats. University of Michigan, 2005.
- 70.- Kaftan H, Noack M, Friedrich N, Völzke H, Hosemann W. Prevalence of chronic tympanic membrane perforation in the adult population. *HNO.* 2008 Feb;56(2):145-50.
- 71.- Santa Maria PL, Atlas MD, Ghassemifar R. Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society. 2007 Jul-Aug;15(4):450-8.
- 72.- Wang AY, Shen Y, Wang JT, Friedland PL, Atlas MD, Dilley RJ. Animal models of chronic tympanic membrane perforation: a “time-out” to review evidence and standardize design. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2014 Dec;78(12):2048-55.

- 73.- O'Reilly RC, Goldman SA, Widner SA, Cass SP. Creating a stable tympanic membrane perforation using mitomycin C. *Otolaryngol Head and Neck Surg.* 2001 Jan; 124(1):40-5.
- 74.- Babu SC, Kartush JM, Patni A. Otologic effects of topical mitomycin C: phase I-evaluation of ototoxicity. *Otol Neurotol.* 2005Mar;26(2):140-4.
- 75.- Jang CH, Song CH, Pak SC. Effect of exposure to mitomycin C on cultured tympanic membrane fibroblasts. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2003 Feb;67(2):173-6.
- 76.- Wang WQ, Wang ZM, Tian J. Epidermal stem cells in the tympanic membrane. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 2004 Dec;39(12):712-6.
- 77.- Yilmaz I, Yilmazer C, Erkan AN, Aslan SG, Ozluoglu LN. Intratympanic dexamethasone injection effects on transient-evoked otoacoustic emission. *Am J Otolaryngol.* 2005 Mar-Apr;26(2):113-7.
- 78.- D'ereditá R. Contact diode laser myringotomy and mitomycin C in children. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004 Jun;130(6):742-6.
- 79.- Kuo CI, Wang MC, Chu CH, Shiao AS. New therapeutic strategy for treating otitis media with effusion in postirradiated nasopharyngeal carcinoma patients. *J Chin Med Assoc.* 2012 Jul;75(7):329-34.
- 80.- Chi SG, Kim JY, Lee WJ, Lee SJ, Kim do W, Sohn MY, Kim GW, Kim MB, Kim BS. Ear Keloids as a primary candidate for the application of mitomycin C after shave excision: in vivo and in vitro study. *Dermatol Surg.* 2011 Feb;37(2):168-75.
- 81.- Yamaoka WY, Gregório LC. The use of Mitomycin-C to reduce synechia in middle meatus in sinus surgery: preliminary results. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2012 Oct; 78(5):44-50.
- 82.- Cincik H, Güngör A, Cekin E, Saglam O, Yildirim S, Poyrazoglu E, Candan H. Effects of topical application of mitomycin-C and 5-fluorouracil on myringotomy in rats. *Otol Neurotol.* 2005 May;26(3):351-4.
- 83.- Susanna R Jr, De Moraes CG, Alencar LM, Ritch R. Nd:YAG laser goniopuncture for late bleb failure after trabeculectomy with adjunctive mitomycin C. *JAMA Ophthalmol.* 2014 Mar;132(3):286-90.

- 84.- Amoils CP, Jackler RK, Milczuk H, Kelly KE, Cao K. An animal model of chronic tympanic membrane perforation. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992 Jan;106(1):47-55.
- 85.- Emami N, Schloss MD, Daniel SJ. Chronic tympanic membrane perforation in an animal model. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2014 Aug;78(8):1250-2.

## **9 ANEXOS**



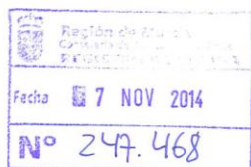
## ANEXO 1



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





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 N° **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 3

### DIARIO A

#### RATA n° 1.

Primera anestesia el día 19-9-14. Marco con n° 1 en la cola. Día 0.

La rata pesa 347 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Después se realiza una perforación timpánica en ambos oídos que afecta a cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen (es la medida de un despegador de rosen pequeño, número 5 de la caja de timpanoplastia, que mide 0,8 mm de diámetro). Se realiza la amputación de ambos mangos de martillo, extrayendo los fragmentos fracturados con una micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C reconstituida (5ml de agua bidestilada en frasco de 2 mg. de mitomicina C, quedando una concentración de 0,4 mg/ml) durante 10 minutos en OI y un espongostan con solución salina durante 10 minutos en el OD. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 22-9-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI tiene una perforación de 3 medidas de Rosen de ancho por 2 medias de alto. El OD presenta una perforación de 2x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 26-9-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI mantiene una perforación de 3x 1,5 unidades rosen. El OD prácticamente está cerrado, tiene una costra grande y queda una mínima perforación anteroinferior que supone la décima parte de un rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 29-9-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml pero no llega a dormirse bien y se tiene que poner 0,1 ml más.

El OI tiene una perforación de 2 x 1 unidades rosen. En OD el tímpano está íntegro, sin perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 3-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml y le cuesta dormirse.

El OI presenta una perforación de 1,5 x 1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OI.

Sexta anestesia el día 10-10-14. Día 21.

Se anestesia con 0,4 ml.

El OI tiene una perforación de 1,5x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OI.

Séptima anestesia el día 17-10-14. Día 28.

Se anestesia con 0,4 ml.

El OI tiene una perforación de 1x0,5 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OI.

Octava anestesia el día 24-10-14. Día 35.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

El OI presenta una perforación de 1x0,5 unidades rosen.

Se fotografía el OI.

Novena anestesia el día 31-10-14. Día 42.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

Continúa la perforación del OI de 0,5x0,5 unidades rosen.

Se fotografía el OI.

Décima anestesia el día 7-11-14. Día 49.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

El OI presenta perforación cerrada.

Se realiza fotografía de OI.

## RATA n° 2

Primera anestesia 19-9-14. Día 0.

La rata pesa 312 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Después se realiza una perforación timpánica en ambos oídos que afecta a cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. Se realiza la amputación de ambos mangos de martillo, extrayendo los fragmentos fracturados con una micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos en OI y un espongostan con solución salina durante 10 minutos en el OD. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 22-9-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. En el OI persiste la perforación de 3 x 3 unidades rosen. En el OD presenta una perforación de 2x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 26-9-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

En el OI hay una perforación de 3 x 2 unidades rosen. En el OD queda una perforación puntiforme que es la décima parte de un Rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 29-9-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El control de los tímpanos refleja en OI una perforación de 1,5 x1 unidades rosen. En OD el tímpano está íntegro, sin perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 3-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla.

Los tímpanos presentan el OD persiste cerrado, íntegro y el OI está cerrado .

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

RATA nº 3Primera anestesia. 19-9-14. Día 0

La rata pesa 345 gramos y tiene 8 semanas.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Después se realiza una perforación timpánica en ambos oídos que afecta a cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. Se realiza la amputación de ambos mangos de martillo, extrayendo los fragmentos fracturados con una micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos en OI y un espongostan con solución salina durante 10 minutos en el OD. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 22-9-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI mantiene la perforación de 3 x 3 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 3 x 2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 26-9-14. Día 6.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI tiene una perforación de 3 x 2 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 2 x 1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 29-9-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla de ketamina y xilacina.

El control de los tímpanos refleja en OI una perforación de 3 x 2 unidades rosen. En OD el tímpano está íntegro, sin perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 3-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.



El OI mantiene la perforación de 2 x 1,5 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OI.

Sexta anestesia el día 10-10-14. Día 21.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

El OI mantiene una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OI.

Séptima anestesia el día 17-10-14. Día 28.

Se anestesia con 0,4 ml.

El OI presenta una perforación de 1,5x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OI.

Octava anestesia el día 24-10-14. Día 35.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

El OI mantiene una perforación de 1x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OI.

Novena anestesia el día 31-10-14. Día 42.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

El OI presenta una perforación de 1x0,5 unidades rosen.

Se fotografía el OI.

Décima anestesia el día 7-11-14. Día 49.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

El OI presenta tímpano cerrado.

Se fotografía el OI.

RATA nº 4

Primera anestesia el día 19-9-14. Día 0.

La rata pesa 329 gramos y tiene 8 semanas.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Después se realiza una perforación timpánica en ambos oídos que afecta a cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. Se realiza la amputación de ambos mangos de martillo, extrayendo los fragmentos fracturados con una micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos en OI y un espongostan con solución salina durante 10 minutos en el OD. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 22-9-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI presenta una perforación de 3 x2,5 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 26-9-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI mantiene una perforación de 3x1,5 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 2 x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 29-9-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla de ketamina y xilacina.

El OI tiene una perforación de 3x 1,5 unidades rosen. El OD el tímpano está íntegro, sin perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 3-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

Los tímpanos se encuentran cerrados tanto el derecho como el izquierdo.

Se realiza fotografía solo del oído izquierdo.

RATA n° 5

Primera anestesia. 19-9-14. Día 0.

La rata pesa 367 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Después se realiza una perforación timpánica en ambos oídos que afecta a cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. Se realiza la amputación de ambos mangos de martillo, extrayendo los fragmentos fracturados con una micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos en OI y un espongostan con solución salina durante 10 minutos en el OD. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 22-9-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta una perforación de 3x2 unidades rosen. El OD tiene una perforación de 3 x 2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 26-9-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI mantiene una perforación de 3 x 2 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 2,5 x 1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 29-9-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla de ketamina y xilacina.

El control de los tímpanos refleja en OI una perforación de 1,5 x 1,5 unidades rosen. En el OD el tímpano está íntegro, sin perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 3-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

Los tímpanos se encuentran cerrados tanto el derecho como el izquierdo.

Se realiza fotografía solo del oído izquierdo.

RATA nº 6

Primera anestesia. 19-9-14. Día 0.

La rata pesa 330 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Después se realiza una perforación timpánica en ambos oídos que afecta a cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. Se

realiza la amputación de ambos mangos de martillo, extrayendo los fragmentos fracturados con una micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos en OI y un espongostan con solución salina durante 10 minutos en el OD. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

#### Segunda anestesia el día 22-9-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI mantiene una perforación de 3x3 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 3x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Tercera anestesia el día 26-9-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta una perforación de 3 x 2,5 unidades rosen. El OD tiene una perforación de 2 x 1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Cuarta anestesia el día 29-9-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla de ketamina y xilacina.

El control de los tímpanos refleja en OI una perforación de 2,5x 2 unidades rosen. En OD el tímpano está íntegro, sin perforación, con costras.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Quinta anestesia el día 3-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

El tímpano derecho sigue cerrado y el OI está cerrado.

Se realiza fotografía solo del oído izquierdo.

RATA n° 7Primera anestesia. 19-9-14. Día 0.

La rata pesa 346 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Después se realiza una perforación timpánica en ambos oídos que afecta a cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. Se realiza la amputación de ambos mangos de martillo, extrayendo los fragmentos fracturados con una micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos en OI y un espongostan con solución salina durante 10 minutos en el OD. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 22-9-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI presenta una perforación de 3x3 unidades rosen. El OD tiene una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 26-9-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI mantiene una perforación de 3x2 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 2x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 29-9-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla de ketamina y xilacina.

El control de los tímpanos refleja en OI una perforación de 1x1 unidades rosen. En OD el tímpano está íntegro, sin perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 3-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

Los tímpanos se encuentran cerrados tanto el derecho como el izquierdo.

Se realiza fotografía solo del oído izquierdo.

RATA n° 8Primera anestesia. 19-9-14. Día 0.

La rata pesa 340 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Después se realiza una perforación timpánica en ambos oídos que afecta a cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. Se realiza la amputación de ambos mangos de martillo, extrayendo los fragmentos fracturados con una micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos en OI y un espongostan con solución salina durante 10 minutos en el OD. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 22-9-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI presenta una perforación de 3x2,5 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 2 x 1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 26-9-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta la perforación de 3 x 2 unidades rosen. El OD tiene una perforación de 1 x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 29-9-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla de ketamina y xilacina.

El control de los tímpanos refleja en OI una perforación de 2 x 1,5 unidades rosen. En OD el tímpano está íntegro, con costras, sin perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 3-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

Los tímpanos se encuentran cerrados tanto el derecho como el izquierdo.

Se realiza fotografía solo del oído izquierdo.

RATA nº 9Primera anestesia. 19-9-14. Día 0.

La rata pesa 335 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.



Después se realiza una perforación timpánica en ambos oídos que afecta a cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. Se realiza la amputación de ambos mangos de martillo, extrayendo los fragmentos fracturados con una micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos en OI y un espongostan con solución salina durante 10 minutos en el OD. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

#### Segunda anestesia el día 22-9-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI presenta una perforación de 3x3 unidades rosen. El OD tiene una perforación de 3 x 2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Tercera anestesia el día 26-9-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta una perforación de 3 x 2 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Cuarta anestesia el día 29-9-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla de ketamina y xilacina.

El control de los tímpanos refleja en OI una perforación de 0,5x0,5 unidades rosen. En OD el tímpano está íntegro, sin perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Quinta anestesia el día 3-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

Los tímpanos se encuentran cerrados tanto el derecho como el izquierdo.

Se realiza fotografía solo del oído izquierdo.

### RATA nº 10

#### Primera anestesia. 19-9-14. Día 0.

La rata pesa 322 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Después se realiza una perforación timpánica en ambos oídos que afecta a cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. Se realiza la amputación de ambos mangos de martillo, extrayendo los fragmentos fracturados con una micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos en OI y un espongostan con solución salina durante 10 minutos en el OD. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

#### Segunda anestesia el día 22-9-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI presenta una perforación de 3 x 3 unidades rosen. El OD tiene una perforación de 2x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Tercera anestesia el día 26-9-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI mantiene una perforación teniendo de 3 x 2 unidades rosen. El OD presenta una perforación anteroinferior de 0,5x0,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 29-9-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla de ketamina y xilacina.

El control de los tímpanos refleja en OI una perforación de 2x1 unidades rosen. En OD el tímpano está íntegro, sin perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 3-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de mezcla.

Los tímpanos se encuentran cerrados tanto el derecho como el izquierdo.

Se realiza fotografía solo del oído izquierdo.

## DIARIO B

RATA nº 1.

Primera anestesia el día 3-10-14. Marco con nº 1 en la cola. Día 0

Pesa 327 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OD en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OI se

realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 6-10-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI presenta una perforación de 3 x 3 unidades rosen. El OD presenta una perforación prácticamente igual de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 10-10-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI tiene una perforación de 3x3 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 13-10-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI mantiene una perforación de 3x2,5 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 1x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 17-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI tiene una perforación de 2x1 unidades rosen. El OD presenta el tímpano íntegro sin perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Sexta anestesia el día 24-10-14. Día 21.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio el tímpano del OI, persistiendo una perforación de 0,5x0,5 unidades rosen.

Se realiza fotografía del tímpano de OI.

Séptima anestesia el día 31-10-14. Día 28.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta un tímpano íntegro.

Se realiza fotografía del OI.

RATA n° 2.

Primera anestesia el día 3-10-14. Marco con n° 2 en la cola. Día 0.

Pesa 334 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OI en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OD se realiza la misma perforación, 3x3 rosen pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 6-10-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta una perforación de 3x3 unidades rosen. El OD tiene una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 10-10-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI mantiene una perforación de 3x2 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 13-10-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. Tanto el OI como el OD están cerrados sin costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

RATA nº 3.

Primera anestesia el día 3-10-14. Marco con nº 3 en la cola. Día 0.

Pesa 321 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OD en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OI se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 6-10-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI mantiene una perforación de 3 x3 unidades rosen. El OD presenta una perforación prácticamente igual de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 10-10-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta una perforación de 3x2,5 unidades rosen. El OD tiene una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 13-10-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI tiene una perforación de 3x2 unidades rosen. El OD está cerrado.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 17-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del oído izquierdo.

Sexta anestesia el día 24-10-14. Día 21.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI tiene una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del oído izquierdo.

Séptima anestesia el día 31-10-14. Día 28.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta una perforación puntiforme, es la décima parte de un rosen.

Se realiza fotografía del oído izquierdo.

Octava anestesia el día 7-11-14. Día 35.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta un tímpano íntegro.

Se realiza fotografía del oído izquierdo.

RATA n° 4.

Primera anestesia el día 3-10-14. Marco con n° 4 en la cola. Día 0.

Pesa 316 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OI en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OD se realiza la misma perforación, 3x3 rosen pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 6-10-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI presenta una perforación de 3x3 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 3x3 unidades rosen.



Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 10-10-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI tiene una perforación de 2x2 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 2x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 13-10-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI tiene una perforación de 0,5x0,5 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 0,3x0,3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 17-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos y ambos están cerrados, sin perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

RATA nº 5.

Primera anestesia el día 3-10-14. Marco con nº 5 en la cola. Día 0.

Pesa 335 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OD en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OI se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 6-10-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI presenta una perforación de 3 x 3 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 3x2,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 10-10-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI tiene una perforación de 2,5x 2 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 2x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 13-10-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI mantiene una perforación de 2,5x2 unidades rosen. El OD tiene la perforación cerrada.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 17-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realizan fotografía del OI.

Sexta anestesia el día 24-10-14. Día 21.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación del tímpano del OI. Está cerrada la perforación.

Se realiza fotografía del OI.

#### RATA nº 6.

##### Primera anestesia el día 3-10-14. Marco con nº 6 en la cola. Día 0.

Pesa 324 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OI en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OD se realiza la misma perforación, 3x3 rosen pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato. Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

##### Segunda anestesia el día 6-10-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta una perforación de 3x3 unidades rosen. El OD tiene una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

##### Tercera anestesia el día 10-10-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI muestra una perforación de 3x3 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 13-10-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI tiene una perforación de 3x3 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 1,5 x 1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 17-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

En el OI persiste una perforación de 3x3 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 0,5x0,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Sexta anestesia el día 24-10-14. Día 21.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI tiene una perforación de 0,5x0,5 unidades rosen. El OD está cerrado.

Se realizan fotografías de los tímpanos.

Séptima anestesia el día 31-10-14. Día 28.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI está cerrado.

Se realiza fotografía del OI.

RATA n° 7.

Primera anestesia el día 3-10-14. Marco con n° 7 en la cola. Día 0.

Pesa 334 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OD en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OI se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que extraigo con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

#### Segunda anestesia el día 6-10-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI presenta una perforación de 3x3 unidades rosen. El OD tiene una perforación de 3x2,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Tercera anestesia el día 10-10-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI muestra una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 2x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Cuarta anestesia el día 13-10-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI tiene una perforación de 1,5x1 unidades rosen. El OD está cerrado sin costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Quinta anestesia el día 17-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI está cerrado con costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

### RATA n° 8.

Primera anestesia el día 3-10-14. Marco con n° 8 en la cola. Día 0.

Pesa 349 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OI en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OD se realiza la misma perforación, 3x3 rosen pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 6-10-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI presenta una perforación de 3x3 unidades rosen. El OD presenta una perforación igual de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 10-10-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI muestra una perforación de 2x2 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 2x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 13-10-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta una perforación de 1,5 x 1,5 unidades rosen. El tímpano del OD está cerrado.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 17-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI tiene una perforación de 0,5x0,5 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OI.

Sexta anestesia el día 24-10-14. Día 21.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI está cerrado.

Se realiza fotografía del OI.

### RATA nº 9

Primera anestesia el día 3-10-14. Marco con nº 9 en la cola. Día 0.

Pesa 320 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OD en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OI se

realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que extraigo con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

#### Segunda anestesia el día 6-10-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI presenta una perforación de 3x2,5 unidades rosen. El OD muestra una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Tercera anestesia el día 10-10-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI tiene una perforación de 3x2 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 1,5x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Cuarta anestesia el día 13-10-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI muestra una perforación de 1,5x1 unidades rosen. El OD está cerrado.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Quinta anestesia el día 17-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI está cerrado.

Se realiza fotografía del OI.

#### RATA nº 10.

Primera anestesia el día 3-10-14. Marco con nº 10 en la cola. Día 0



Pesa 345 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OI en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OD se realiza la misma perforación, 3x3 rosen pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

#### Segunda anestesia el día 6-10-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI presenta una perforación de 3x2 unidades rosen. El OD tiene una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Tercera anestesia el día 10-10-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI muestra una perforación de 2,5x2 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Cuarta anestesia el día 13-10-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

En el OI persiste una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 2,5x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Quinta anestesia el día 17-10-14. Día 14.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI muestra una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen. El OD tiene una perforación de 2,5x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Sexta anestesia el día 24-10-14. Día 21.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

En el OI está cerrada la perforación. El OD presenta una perforación de 2x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Séptima anestesia el día 31-10-14. Día 28

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OD presenta una perforación de 1,5x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía de OD.

Octava anestesia el día 7-11-14. Día 35

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OD está cerrado sin costra.

Se realiza fotografía de OD.

RATA nº 11.

Primera anestesia el día 3-10-14. Marco con nº 11 en la cola. Día 0

Pesa 328 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan con suero fisiológico durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OD en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OI se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

#### Segunda anestesia el día 6-10-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos. El OI presenta una perforación de 3x2 unidades rosen. El OD muestra una perforación de 2x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Tercera anestesia el día 10-10-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI muestra una perforación de 2x1 unidades rosen. El OD presenta una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Cuarta anestesia el día 13-10-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos, estando cerrados los dos.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

RATA n° 12Primera anestesia el día 3-10-14. Marco con n° 12 en la cola. Día 0

Pesa 337 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan con suero fisiológico durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OI en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OD se realiza la misma perforación, 3x3 rosen pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 6-10-14. Día 3.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI presenta una perforación de 2x2 unidades rosen. El OD muestra una perforación de 2x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Tercera anestesia el día 10-10-14. Día 7.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

El OI tiene una perforación de 2x1,5 unidades rosen. El OD presenta una perforación puntiforme de 0,1x0,1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Cuarta anestesia el día 13-10-14. Día 10.

Se anestesia con 0,4 ml de la mezcla de ketamina y xilacina.

Se comprueba con el microscopio la situación de los tímpanos, estando cerrados los dos.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

## DIARIO C

### RATA nº 1.

#### Primera anestesia el día 24-10-14. Marco con nº 1 en la cola. Día 0

Pesa 342 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OD en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OI se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

#### Segunda anestesia el día 27-10-14. Día 3

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Tercera anestesia el día 31-10-14. Día 7

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos oídos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Cuarta anestesia el día 3-11-14. Día 10

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Quinta anestesia el día 7-11-14. Día 14

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Sexta anestesia el día 14-11-14. Día 21

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Séptima anestesia el día 21-11-14. Día 28

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Octava anestesia el día 28-11-14. Día 35

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Novena anestesia el día 05-12-14. Día 42

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Décima anestesia el día 12-12-14. Día 49

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 1x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo primera anestesia el día 19-12-14. Día 56

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 1x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo segunda anestesia el día 26-12-14. Día 63

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 0,5x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo tercera anestesia el día 2-1-15. Día 70

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y observo en OI una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 0,5x0,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo cuarta anestesia el día 9-1-15. Día 77

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x1 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 0,5x0,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo quinta anestesia el día 16-1-15. Día 84

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.



Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x1 unidades rosen, seca y en el OD una perforación muy pequeña de 1/3 x 1/3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo sexta anestesia el día 23-1-15. Día 91

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x1 unidades rosen, seca y el OD tiene cerrada la perforación con costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo séptima anestesia el día 30-1-15. Día 98

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x1 unidades rosen, seca y el OD continúa cerrado con costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo octava anestesia el día 6-2-15. Día 105

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x1 unidades rosen, seca y el OD cerrado sin costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo novena anestesia el día 13-2-15. Día 112

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OI observando una perforación de 2x1 unidades rosen, seca.

Se realiza fotografía del OI.

Vigésima anestesia el día 20-2-15. Día 119

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OI observando una perforación de 2x1 unidades rosen, seca.

Se realiza fotografía del OI.

Vigésima primera anestesia el día 27-2-15. Día 126

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OI observando una perforación de 2x1 unidades rosen, seca.

Se realiza fotografía del OI.

Vigésima segunda anestesia el día 6-3-15. Día 133

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OI observando una perforación de 2x1 unidades rosen, seca.

Se realiza fotografía del OI.

Vigésima tercera anestesia el día 13-3-15. Día 140

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OI observando la perforación cerrada.

Se realiza fotografía del OI.

RATA nº 2.Primera anestesia el día 24-10-14. Marco con nº 1 en la cola. Día 0

Pesa 333 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OI en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OD se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

La rata aparece muerta al día siguiente.

### RATA nº 3.

Primera anestesia el día 24-10-14. Marco con nº 1 en la cola. Día 0

Pesa 316 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OD en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OI se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 27-10-14. Día 3

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x3 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Tercera anestesia el día 31-10-14. Día 7

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x3 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Cuarta anestesia el día 3-11-14. Día 10

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x3 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Quinta anestesia el día 7-11-14. Día 14

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x3 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen. Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Sexta anestesia el día 14-11-14. Día 21

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Séptima anestesia el día 21-11-14. Día 28

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Octava anestesia el día 28-11-14. Día 35

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Novena anestesia el día 05-12-14. Día 42

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décima anestesia el día 12-12-14. Día 49

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo primera anestesia el día 19-12-14. Día 56

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo segunda anestesia el día 26-12-14. Día 63

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2x1,5 unidades rosen y en el OD una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo tercera anestesia el día 2-1-15. Día 70

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2x1,5 unidades rosen y en el OD una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo cuarta anestesia el día 9-1-15. Día 77

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2x1,5 unidades rosen y en el OD una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo quinta anestesia el día 16-1-15. Día 84

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2x1,5 unidades rosen y en el OD una perforación de 2x1 unidades rosen, con costra alrededor.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo sexta anestesia el día 23-1-15. Día 91

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1,5x1 unidades rosen y en el OD una perforación de 2x1 rosen, con costra alrededor que se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo séptima anestesia el día 30-1-15. Día 98

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1,5x1 unidades rosen y en el OD una perforación de 2x1 unidades rosen, con costra alrededor que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo octava anestesia el día 6-2-15. Día 105

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1,5x1 unidades rosen, con discreta humedad y en el OD una perforación de 2x1 unidades rosen, con pequeña costra en el borde de la perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo novena anestesia el día 13-2-15. Día 112

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1,5x1 unidades rosen, con discreta humedad y en el OD una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima anestesia el día 20-2-15. Día 119

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observan ambos tímpanos con otorrea en oído medio, por lo que se excluye la rata del estudio.

RATA n° 4.Primera anestesia el día 24-10-14. Marco con n° 1 en la cola. Día 0

Pesa 326 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OI en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OD se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que extraigo con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

En el OI se desepiteliza totalmente el mango del martillo aunque se respeta.



Segunda anestesia el día 27-10-14. Día 3

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x3 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Tercera anestesia el día 31-10-14. Día 7

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OD una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OI una perforación de 3x3 unidades rosen, con el mango del martillo necrótico (fue el que se quedó desepitelizado en el momento de la perforación).

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Cuarta anestesia el día 3-11-14. Día 10

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OD una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OI una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Quinta anestesia el día 7-11-14. Día 14

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OD una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OI una perforación de 3x3 unidades rosen. Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Sexta anestesia el día 14-11-14. Día 21

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OD una perforación de 2x1 unidades rosen y en el OI una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Séptima anestesia el día 21-11-14. Día 28

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Octava anestesia el día 28-11-14. Día 35

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Novena anestesia el día 05-12-14. Día 42

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décima anestesia el día 12-12-14. Día 49

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo primera anestesia el día 19-12-14. Día 56

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo segunda anestesia el día 26-12-14. Día 63

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo tercera anestesia el día 2-1-15. Día 70

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo cuarta anestesia el día 9-1-15. Día 77

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo quinta anestesia el día 16-1-15. Día 84

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo sexta anestesia el día 23-1-15. Día 91

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen con costra que se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con costra en el fondo que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo séptima anestesia el día 30-1-15. Día 98

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x1,5 unidades rosen, seca, con costra que no se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con costra que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo octava anestesia el día 6-2-15. Día 105

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x1,5 unidades rosen, seca, con costra que se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con una costra que no se retira.

Se realizan fotografías.

Décimo novena anestesia el día 13-2-15. Día 112

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x1,5 unidades rosen, seca, con escasa costra y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con una costra que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima anestesia el día 20-2-15. Día 119

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x1,5 unidades rosen, seca, con pequeña costra que no se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con pequeña costra que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima primera anestesia el día 27-2-15. Día 126

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x1,5 unidades rosen, seca, con costra que se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con pequeña costra que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima segunda anestesia el día 6-3-15. Día 133

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x1,5 unidades rosen, seca, con costra que no se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con pequeña costra que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima tercera anestesia el día 13-3-15. Día 140

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x1,5 unidades rosen, seca, con costra que se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con pequeña costra que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima cuarta anestesia el día 20-3-15. Día 147

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x1,5 unidades rosen, seca, sin costra y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con pequeña costra que se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima quinta anestesia el día 27-3-15. Día 154

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x1,5 unidades rosen, seca, sin costra y en el OD se ha cerrado la perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima sexta anestesia el día 3-4-15. Día 161

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI observando una perforación de 2x1,5 unidades rosen, seca, con pequeña costra.

Se realiza fotografía del OI.

Vigésima séptima anestesia el día 10-4-15. Día 168

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI observando una perforación de 2x1,5 unidades rosen, seca, con pequeña costra posterior.

Se realiza fotografía del OI.

#### Vigésima octava anestesia el día 17-4-15. Día 175

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI observando una perforación de 2x1 unidades rosen, seca, con pequeña costra posterior que se retira.

Se realiza fotografía del OI.

#### Vigésima novena anestesia el día 24-4-15. Día 182

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI observando cerrada la perforación con costra.

Se realiza fotografía del OI.

#### RATA n° 5.

#### Primera anestesia el día 24-10-14. Marco con n° 1 en la cola. Día 0

Pesa 320 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongotan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongotanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OD en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OI se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

#### Segunda anestesia el día 27-10-14. Día 3

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y observo en OI una perforación de 3x3 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Tercera anestesia el día 31-10-14. Día 7

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x3 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Cuarta anestesia el día 3-11-14. Día 10

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x3 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.



Quinta anestesia el día 7-11-14. Día 14

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x3 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Sexta anestesia el día 14-11-14. Día 21

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OD una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OI una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Séptima anestesia el día 21-11-14. Día 28

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1,5x1 unidades rosen y en el OD una perforación de 2,5x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Octava anestesia el día 28-11-14. Día 35

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1,5x1 unidades rosen y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Novena anestesia el día 05-12-14. Día 42

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décima anestesia el día 12-12-14. Día 49

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo primera anestesia el día 19-12-14. Día 56

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo segunda anestesia el día 26-12-14. Día 63

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, con una costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo tercera anestesia el día 2-1-15. Día 70

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, persistiendo la costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo cuarta anestesia el día 9-1-15. Día 77

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, sin costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo quinta anestesia el día 16-1-15. Día 84

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 rosen, seca y en el OD una perforación de 2,5x1,5 rosen, seca, sin costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo sexta anestesia el día 23-1-15. Día 91

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen, seca, con costra que se retira y en el OD una perforación de 2,5x1,5 rosen, seca.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo séptima anestesia el día 30-1-15. Día 98

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen, seca, con costra parcial que no se retira y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, seca.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo octava anestesia el día 6-2-15. Día 105

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen, seca, con costra que no se retira y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, seca.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo novena anestesia el día 13-2-15. Día 112

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen, seca, con costra y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, seca.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima anestesia el día 20-2-15. Día 119

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen, seca, con costra que se retira y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, seca.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima primera anestesia el día 27-2-15. Día 126

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen, seca y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen, seca.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima segunda anestesia el día 6-3-15. Día 133

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen, con costra que se retira y en el OD una perforación de 2,5x1,5 rosen con costra que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima tercera anestesia el día 13-3-15. Día 140

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 rosen, seca y en el OD una perforación de 2,5x1,5 rosen con costra que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima cuarta anestesia el día 20-3-15. Día 147

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x0,5 unidades rosen, seca, sin costra y en el OD la perforación cerrada.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima quinta anestesia el día 27-3-15. Día 154

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI presentando una perforación de 1x0,5 unidades rosen, seca, sin costra.

Se realiza fotografía del OI.

Vigésima sexta anestesia el día 3-4-15. Día 161

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI presentando una perforación de 1x0,5 unidades rosen, seca, sin costra.

Se realiza fotografía del OI.

Vigésima séptima anestesia el día 10-4-15. Día 168

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI observando cerrada la perforación, con costra.

Se realiza fotografía del OI.

RATA n° 6.Primera anestesia el día 24-10-14. Marco con n° 1 en la cola. Día 0

Pesa 319 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OI en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OD se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 27-10-14. Día 3

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x3 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Tercera anestesia el día 31-10-14. Día 7

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OD una perforación de 3x2 unidades rosen, seca y en el OI una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Cuarta anestesia el día 3-11-14. Día 10

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OD una perforación de 3x2 unidades rosen, seca y en el OI una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Quinta anestesia el día 7-11-14. Día 14

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OD una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OI una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Sexta anestesia el día 14-11-14. Día 21

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OD una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OI una perforación de 3x3 unidades rosen. Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Séptima anestesia el día 21-11-14. Día 28

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x3 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Octava anestesia el día 28-11-14. Día 35

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Novena anestesia el día 05-12-14. Día 42

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décima anestesia el día 12-12-14. Día 49

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.



Décimo primera anestesia el día 19-12-14. Día 56

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra y en el OD una perforación de 2,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo segunda anestesia el día 26-12-14. Día 63

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo tercera anestesia el día 2-1-15. Día 70

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo cuarta anestesia el día 9-1-15. Día 77

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Décimo sexta anestesia el día 23-1-15. Día 91

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra que se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con costra que se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Décimo séptima anestesia el día 30-1-15. Día 98

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, ahora sin costra y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con costra parcial que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Décimo octava anestesia el día 6-2-15. Día 105

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra posterior y en oído medio y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con costra parcial que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Décimo novena anestesia el día 13-2-15. Día 112

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra alrededor y en el oído medio y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con una costra que casi cierra la perforación en su totalidad.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Vigésima anestesia el día 20-2-15. Día 119

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con pequeña costra que no se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con costra que se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima primera anestesia el día 27-2-15. Día 126

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra que se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, seca.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima segunda anestesia el día 6-3-15. Día 133

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra que no se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, seca con costra que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima tercera anestesia el día 13-3-15. Día 140

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra que se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, seca con costra que no se retira.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima cuarta anestesia el día 20-3-15. Día 147

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra que se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, sin costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima quinta anestesia el día 27-3-15. Día 154

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, sin costra y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, sin costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima sexta anestesia el día 3-4-15. Día 161

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra que se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, sin costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima séptima anestesia el día 10-4-15. Día 168

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, sin costra y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, sin costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima octava anestesia el día 17-4-15. Día 175

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con costra que se retira y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, sin costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Vigésima novena anestesia el día 24-4-15. Día 182

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2,5 unidades rosen, seca, con mínima costra y en el OD una perforación de 1,5x1,5 unidades rosen, con pequeña costra.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

RATA nº 7.

Primera anestesia el día 24-10-14. Marco con nº 1 en la cola. Día 0

Pesa 335 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OD en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OI se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 27-10-14. Día 3

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Tercera anestesia el día 31-10-14. Día 7

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Cuarta anestesia el día 3-11-14. Día 10

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Quinta anestesia el día 7-11-14. Día 14

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Sexta anestesia el día 14-11-14. Día 21

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2,5x2 unidades rosen, seca y en el OD cerrada la perforación, con otorrea.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Séptima anestesia el día 21-11-14. Día 28

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI observando una perforación de 2,5x2 unidades rosen, seca.

Se realiza fotografía del OI.

Octava anestesia el día 28-11-14. Día 35

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI y se observa una perforación de 2,5x2 unidades rosen, seca.

Se realiza fotografía del OI.

Novena anestesia el día 05-12-14. Día 42

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI y se observa una perforación de 2x2 unidades rosen, seca.

Se realiza fotografía del OI.

Décima anestesia el día 12-12-14. Día 49

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI y se observa una perforación de 2x1,5 unidades rosen, seca.

Se realiza fotografía del OI.

Décimo primera anestesia el día 19-12-14. Día 56

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI y se observa una perforación de 2x0,5 unidades rosen, seca.

Se realiza fotografía del OI.

Décimo segunda anestesia el día 26-12-14. Día 63

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI y se observa otorrea que cubre la totalidad de la perforación.

Se realiza fotografía del OI. Queda eliminada del ensayo.

RATA n° 8.Primera anestesia el día 24-10-14. Marco con n° 1 en la cola. Día 0

Pesa 326 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OI en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OD se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.



Segunda anestesia el día 27-10-14. Día 3

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en el OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Tercera anestesia el día 31-10-14. Día 7

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Cuarta anestesia el día 3-11-14. Día 10

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Quinta anestesia el día 7-11-14. Día 14

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Sexta anestesia el día 14-11-14. Día 21

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI dos perforaciones de 1x1 y 0,5x0,5 unidades rosen, porque se ha tabicado la perforación y en el OD una perforación de 2x1,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Séptima anestesia el día 21-11-14. Día 28

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación puntiforme de 0,1x0,1 unidades rosen y en el OD una perforación de 1,5x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Octava anestesia el día 28-11-14. Día 35

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación cerrada y en el OD una perforación de 1x0,5 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Novena anestesia el día 05-12-14. Día 42

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OD y se observa una perforación de 0,5x0,5 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OD.

Décima anestesia el día 12-12-14. Día 49

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OD y se observa la perforación cerrada.

Se realiza fotografía del OD.

RATA n° 9.Primera anestesia el día 24-10-14. Marco con n° 1 en la cola. Día 0

Pesa 314 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OD en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OI se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 27-10-14. Día 3

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Tercera anestesia el día 31-10-14. Día 7

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Cuarta anestesia el día 3-11-14. Día 10

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Quinta anestesia el día 7-11-14. Día 14

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Sexta anestesia el día 14-11-14. Día 21

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2x1 unidades rosen y en el OD cerrada la perforación.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Séptima anestesia el día 21-11-14. Día 28

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OI.

Octava anestesia el día 28-11-14. Día 35

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI y se observa una perforación de 1,5x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OI.

Novena anestesia el día 05-12-14. Día 42

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI y se observa una perforación de 1,5x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OI.

Décima anestesia el día 12-12-14. Día 49

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI y se observa una perforación de 1x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OI.

Décimo primera anestesia el día 19-12-14. Día 56

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI observando cerrado el tímpano.

Se realiza fotografía del OI.

RATA n° 10.Primera anestesia el día 24-10-14. Marco con n° 1 en la cola. Día 0

Pesa 330 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan empapado con mitomicina C con una concentración de 0,4 mg/ml durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OI en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OD se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 27-10-14. Día 3

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Tercera anestesia el día 31-10-14. Día 7

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Cuarta anestesia el día 3-11-14. Día 10

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Quinta anestesia el día 7-11-14. Día 14

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de una ampolla de dexametasona de 4 mg. con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Sexta anestesia el día 14-11-14. Día 21

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 0,5x0,5 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

#### Séptima anestesia el día 21-11-14. Día 28

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa el OI con la perforación cerrada y en el OD una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Octava anestesia el día 28-11-14. Día 35

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD observando una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OD.

Novena anestesia el día 05-12-14. Día 42

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OD.

Décima anestesia el día 12-12-14. Día 49

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OD.

Décimo primera anestesia el día 19-12-14. Día 56

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OD.

Décimo segunda anestesia el día 26-12-14. Día 63

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realiza fotografía del OD.



Décimo tercera anestesia el día 2-1-15. Día 70

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen con costra.

Se realiza fotografía del OD.

Décimo cuarta anestesia el día 9-1-15. Día 77

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen con costra.

Se realiza fotografía del OD.

Décimo quinta anestesia el día 16-1-15. Día 84

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen con costra.

Se realiza fotografía del OD.

Décimo sexta anestesia el día 23-1-15. Día 91

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen con una costra que no se retira.

Se realiza fotografía del OD.

Décimo séptima anestesia el día 30-1-15. Día 98

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen con costra que se retira.

Se realiza fotografía del OD.

Décimo octava anestesia el día 6-2-15. Día 105

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen, seca, con costra que no se retira.

Se realiza fotografía del OD.

Décimo novena anestesia el día 13-2-15. Día 112

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen, seca, con costra que se retira.

Se realiza fotografía del OD.

Vigésima anestesia el día 20-2-15. Día 119

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen, seca.

Se realiza fotografía del OD.

Vigésima primera anestesia el día 27-2-15. Día 126

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen, seca.

Se realiza fotografía del OD.

Vigésima segunda anestesia el día 6-3-15. Día 133

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen, seca, se retira costra.

Se realiza fotografía del OD.

Vigésima tercera anestesia el día 13-3-15. Día 140

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD y se observa una perforación de 2x1 unidades rosen, seca.

Se realiza fotografía del OD.

Vigésima cuarta anestesia el día 20-3-15. Día 147

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el tímpano del OD observando una perforación de 2x1 unidades rosen, seca, con costra que se retira.

Se realiza fotografía del OD.

Vigésima quinta anestesia el día 27-3-15. Día 154

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OD presentando una perforación de 2x1 unidades rosen, seca, con pequeña costra en caja timpánica.

Se realiza fotografía del OD.

Vigésima sexta anestesia el día 3-4-15. Día 161

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OD presentando una perforación de 1,5x1 unidades rosen, seca, con pequeña costra.

Se realiza fotografía del OD.

Vigésima séptima anestesia el día 10-4-15. Día 168

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OD presentando una perforación de 1,5x1 unidades rosen, seca, con pequeña costra que se retira.

Se realiza fotografía del OD.

Vigésima octava anestesia el día 17-4-15. Día 175

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OD presentando una perforación de 1,5x1 unidades rosen, seca, con pequeña costra que se retira.

Se realiza fotografía del OD.

Vigésima novena anestesia el día 24-4-15. Día 182

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OD presentando una perforación de 1,5x1 unidades rosen, seca, con mínima costra que no se retira.

Se realiza fotografía del OD.

RATA nº 11.Primera anestesia el día 24-10-14. Marco con nº 1 en la cola. Día 0

Pesa 338 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan con suero fisiológico durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OD en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OI se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

#### Segunda anestesia el día 27-10-14. Día 3

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x2 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x2 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de solución salina con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

#### Tercera anestesia el día 31-10-14. Día 7

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 1x1 unidades rosen y el OD está cerrado.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de solución salina con un aspirador en el oído externo y medio de OI.

#### Cuarta anestesia el día 3-11-14. Día 10

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisa el OI y se observa la perforación cerrada.

Se realiza fotografía de OI.

RATA n° 12.Primera anestesia el día 24-10-14. Marco con n° 1 en la cola. Día 0

Pesa 327 gramos y tiene 8 semanas de edad.

Se anestesia con 0,7 ml de una solución de ketamina y xilacina, donde hay doble cantidad de la primera que de la segunda. Se aplica la anestesia intraperitoneal. Dura toda la intervención.

Se realizan fotografías de los tímpanos íntegros.

Se coloca espongostan con suero fisiológico durante 10 minutos, en cada uno de los tímpanos. Extrayendo los espongostanes mediante micropinza de pico de pato, sin aspirar.

Después se realiza una perforación timpánica en OI en cuadrantes anteriores y posteriores, respetando el mango del martillo, de 3x3 unidades rosen. En el OD se realiza la misma perforación, 3x3 rosen, pero amputando el mango del martillo, que se extrae con micropinza de pico de pato.

Se realizan fotografías de los tímpanos perforados.

No sangra nada ni se tiene que usar el aspirador.

Segunda anestesia el día 27-10-14. Día 3

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 3x3 unidades rosen y en el OD una perforación de 3x3 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

Se aplica 0,1 ml de solución salina con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Tercera anestesia el día 31-10-14. Día 7

Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en OI una perforación de 2x1 unidades rosen y en el OD una perforación de 2x1 unidades rosen.

Se realizan fotografías de ambos tímpanos.

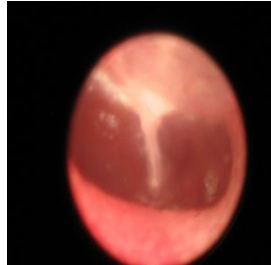
Se aplica 0,1 ml de solución salina con un aspirador de oído, en ambos oídos medios y externos.

Cuarta anestesia el día 3-11-14. Día 10

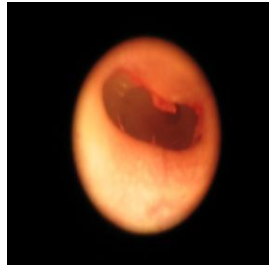
Se anestesia con solución de ketamina y xilacina (0,4 ml), con doble cantidad de la primera que de la segunda. Dura toda la intervención.

Se revisan los tímpanos y se observa en ambos oídos las perforaciones cerradas.

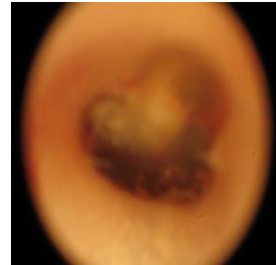
## ANEXO 4

FOTOGRAFÍAS ARATA 1

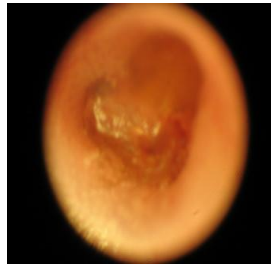
OD 19-9-14 (Integro)



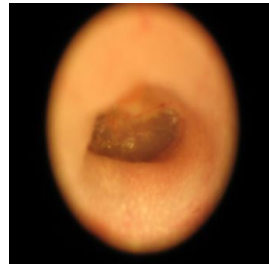
OD 19-9-14



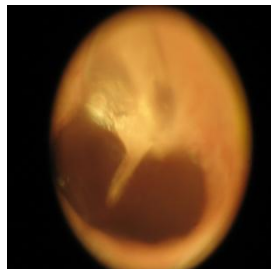
OD 22-9-14



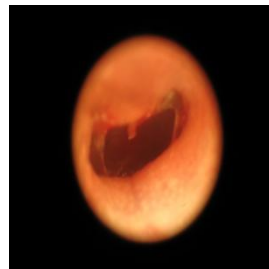
OD 26-9-14



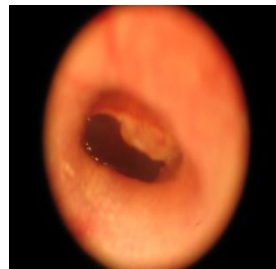
OD 29-9-14



OI 19-9-14 (Integro)



OI 19-9-14



OI 22-9-14



OI 26-9-14



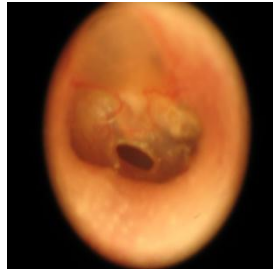
OI 29-9-14



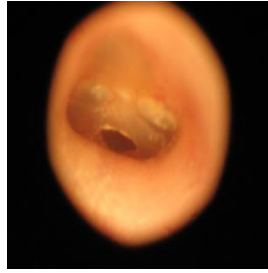
OI 3-10-14



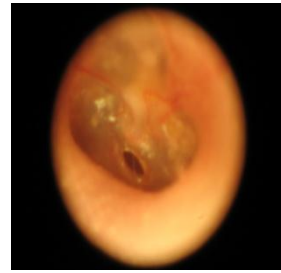




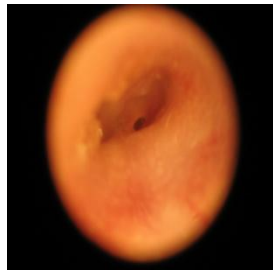
OI 10-10-14



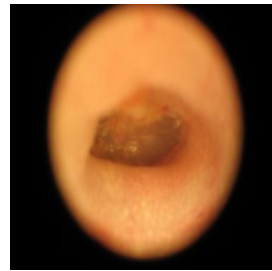
OI 17-10-14



OI 24-10-14

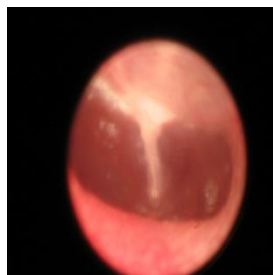


OI 31-10-14

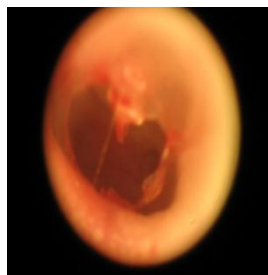


OI 7-11-14

RATA 2



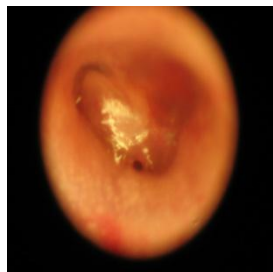
OD 19-9-14(Integro)



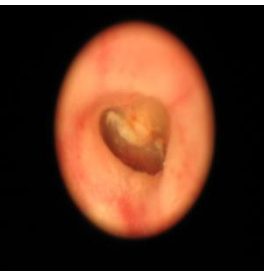
OD 19-9-14



OD 22-9-14

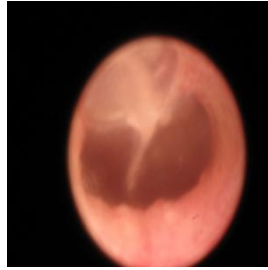


OD 26-9-14

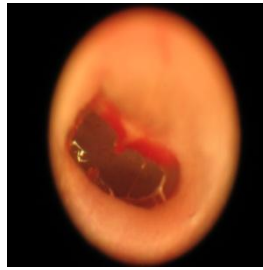


OD 29-9-14

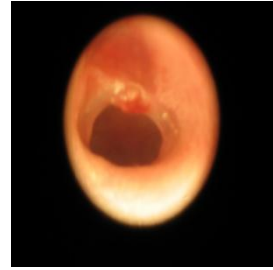




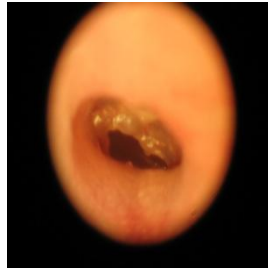
OI 19-9-14(Integro)



OI 19-9-14



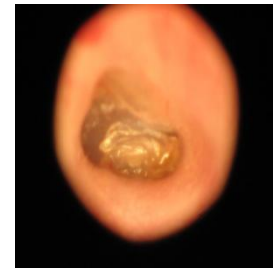
OI 22-9-14



OI 26-9-14

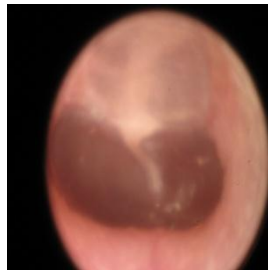


OI 29-9-14

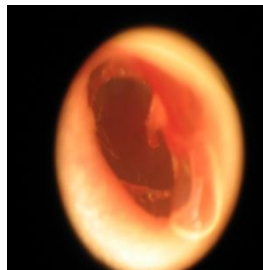


OI 3-10-14

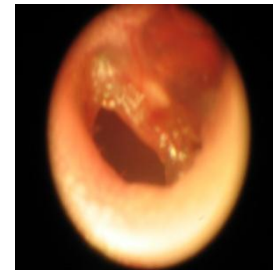
RATA 3



OD 19-9-14(Integro)



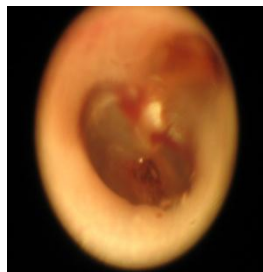
OD 19-9-14



OD 22-9-14

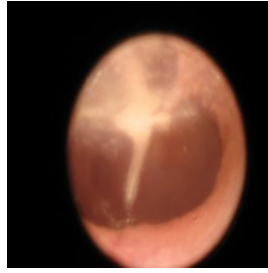


OD 26-9-14

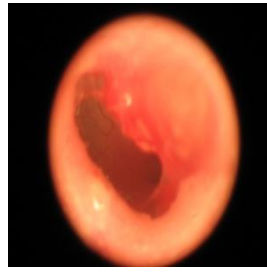


OD 29-9-14

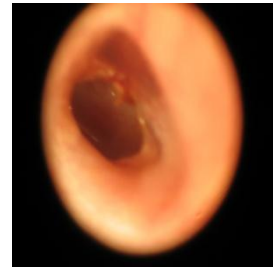




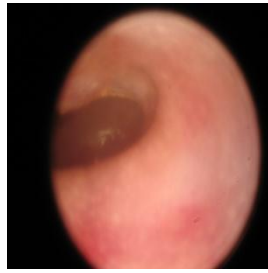
OI 19-9-14(Integro)



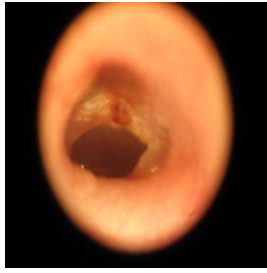
OI 19-9-14



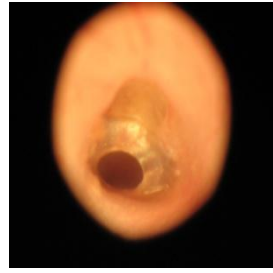
OI 22-9-14



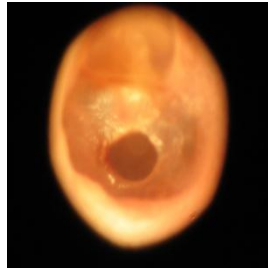
OI 26-9-14



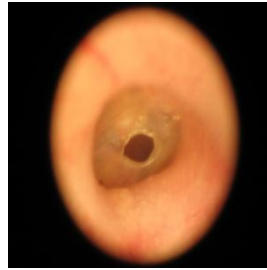
OI 29-9-14



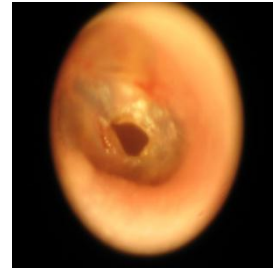
OI 3-10-14



OI 10-10-14



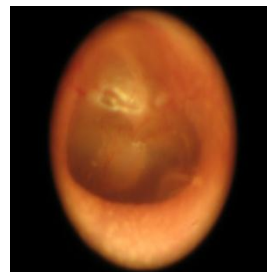
OI 17-10-14



OI 24-10-14

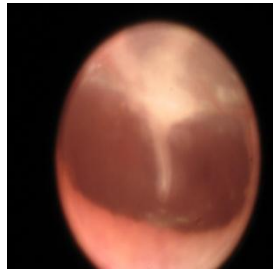


OI 31-10-14

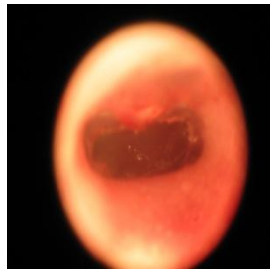


OI 7-11-14



RATA 4

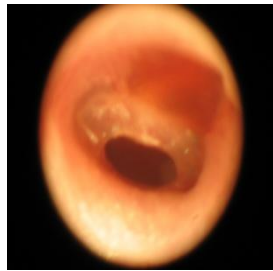
OD 19-9-14(Integro)



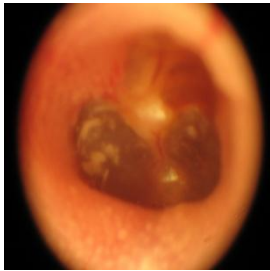
OD 19-9-14



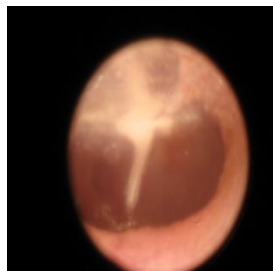
OD 22-9-14



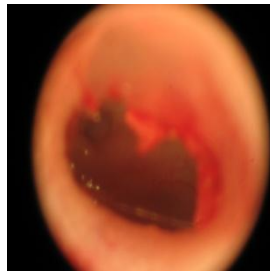
OD 26-9-14



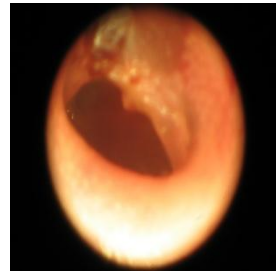
OD 29-9-14



OI 19-9-14(Integro)



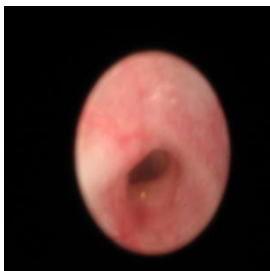
OI 19-9-14



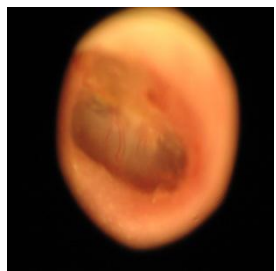
OI 22-9-14



OI 26-9-14



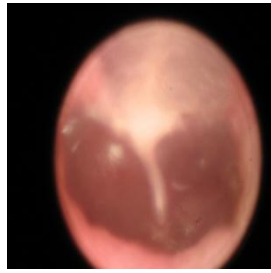
OI 29-9-14



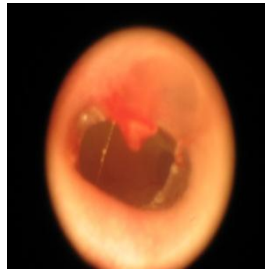
OI 3-10-14



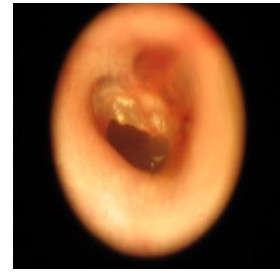


RATA 5

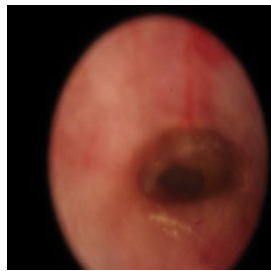
OD 19-9-14(Integro)



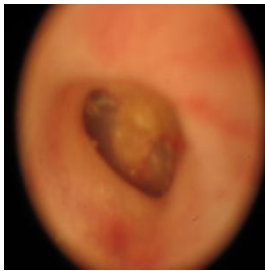
OD 19-9-14



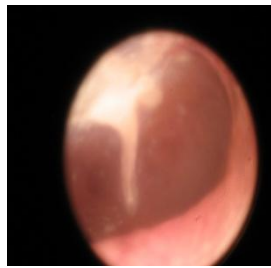
OD 22-9-14



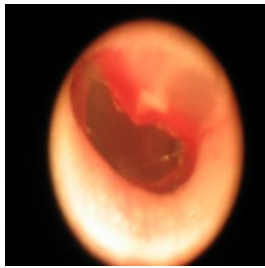
OD 26-9-14



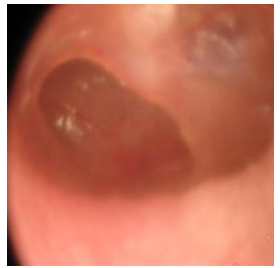
OD 29-9-14



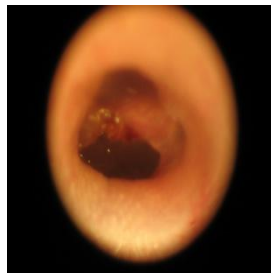
OI 19-9-14(Integro)



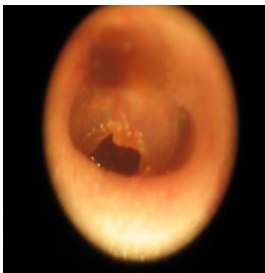
OI 19-9-14



OI 22-9-14



OI 26-9-14

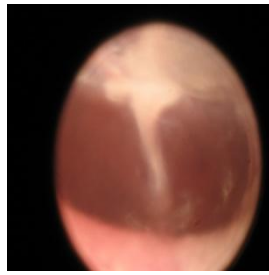


OI 29-9-14

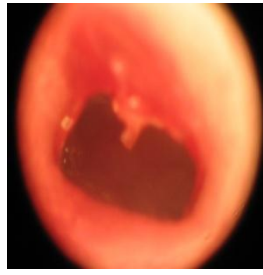


OI 3-10-14

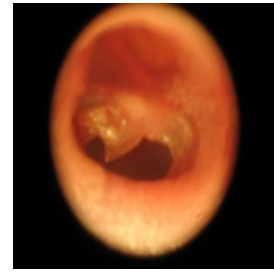


RATA 6

OD 19-9-14(Integro)



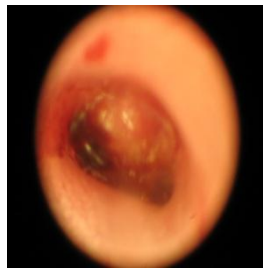
OD 19-9-14



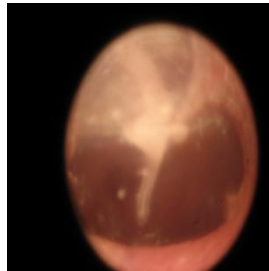
OD 22-9-14



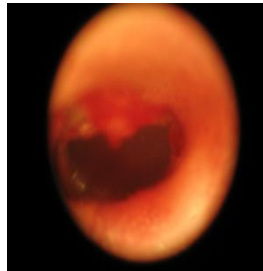
OD 26-9-14



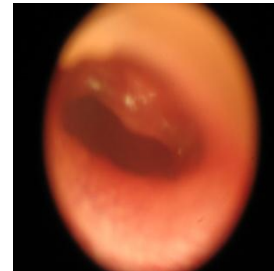
OD 29-9-14



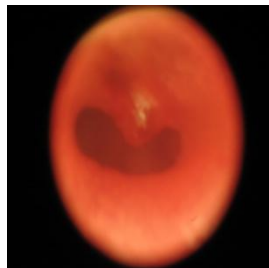
OI 19-9-14(Integro)



OI 19-9-14



OI 22-9-14



OI 26-9-14

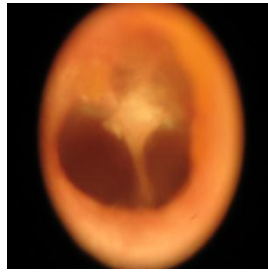


OI 29-9-14



OI 3-10-14



RATA 7

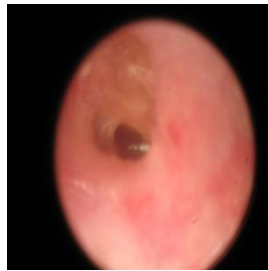
OD 19-9-14(Integro)



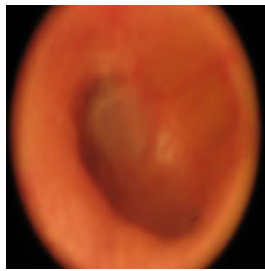
OD 19-9-14



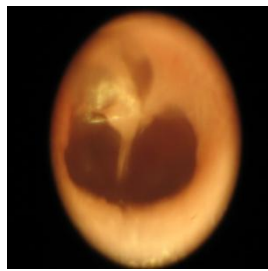
OD 22-9-14



OD 26-9-14



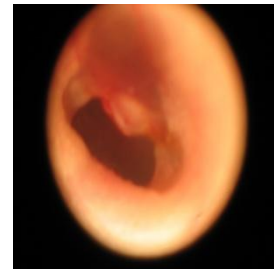
OD 29-9-14



OI 19-9-14(Integro)



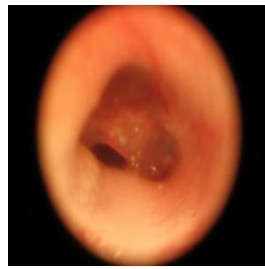
OI 19-9-14



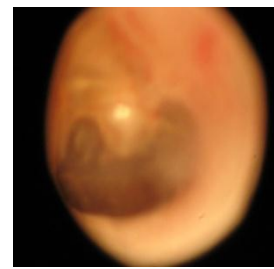
OI 22-9-14



OI 26-9-14

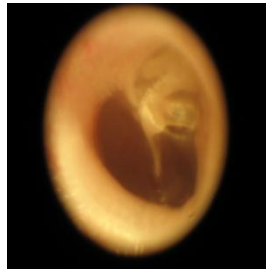


OI 29-9-14

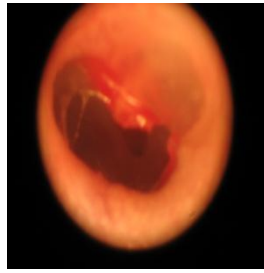


OI 3-10-14

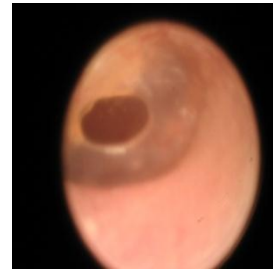


RATA 8

OD 19-9-14(Integro)



OD 19-9-14



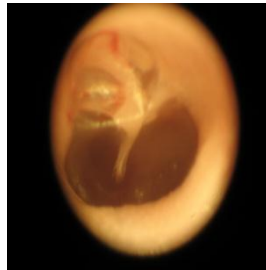
OD 22-9-14



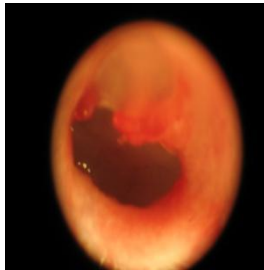
OD 26-9-14



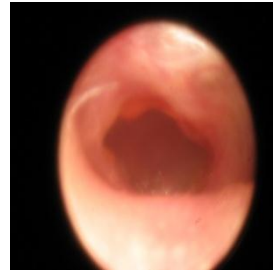
OD 29-9-14



OI 19-9-14(Integro)



OI 19-9-14



OI 22-9-14



OI 26-9-14



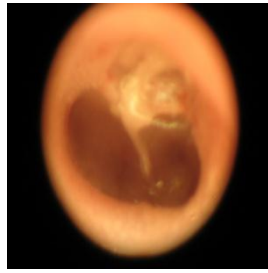
OI 29-9-14



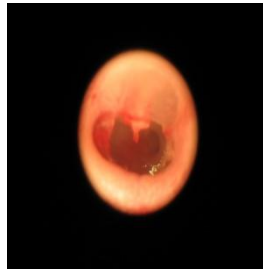
OI 3-10-14



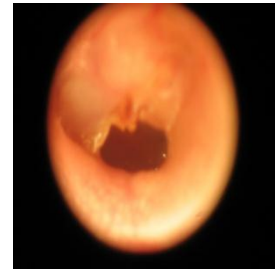


RATA 9

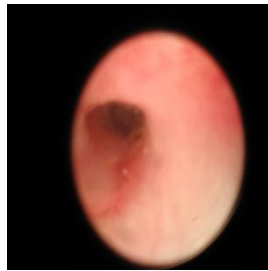
OD 19-9-14(Integro)



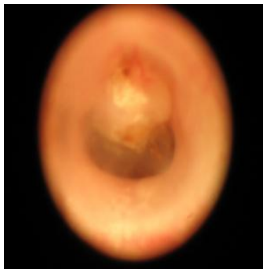
OD 19-9-14



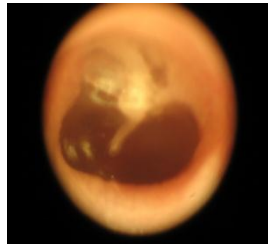
OD 22-9-14



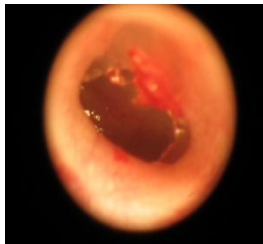
OD 26-9-14



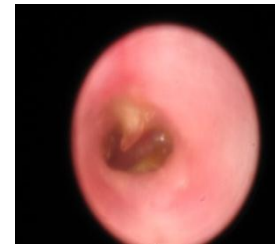
OD 29-9-14



OI 19-9-14 (Integro)



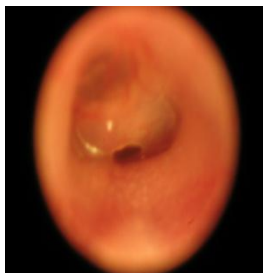
OI 19-9-14



OI 22-9-14



OI 26-9-14

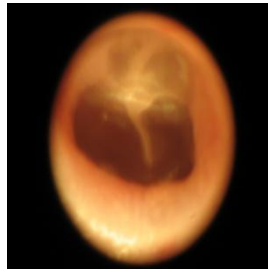


OI 29-9-14

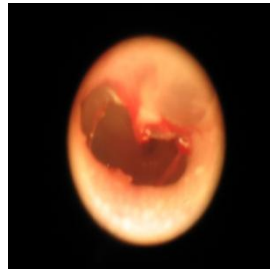


OI 3-10-14

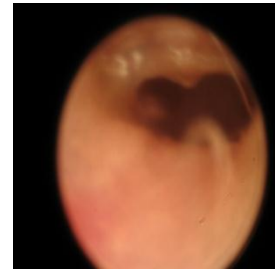


RATA 10

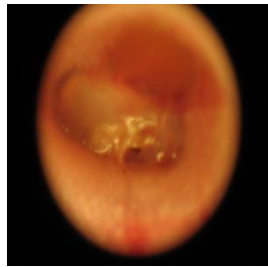
OD 19-9-14(Integro)



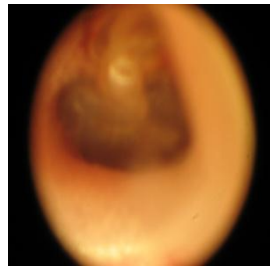
OD 19-9-14



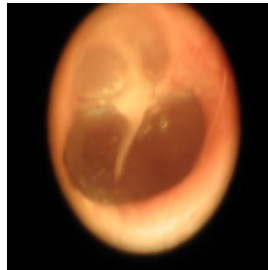
OD 22-9-14



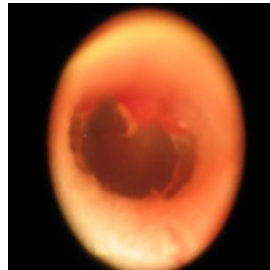
OD 26-9-14



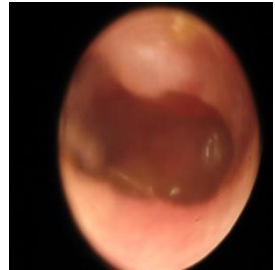
OD 29-9-14



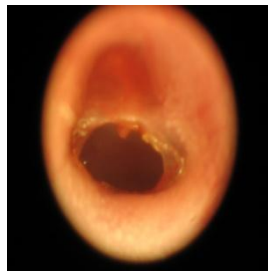
OI 19-9-14(Integro)



OI 19-9-14



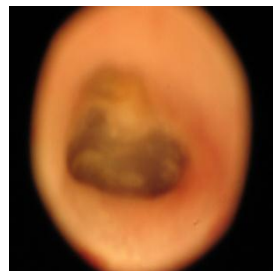
OI 22-9-14



OI 26-9-14

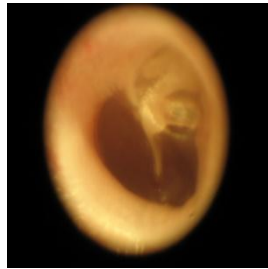


OI 29-9-14

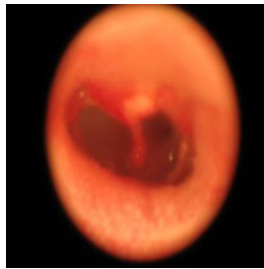


OI 3-10-14

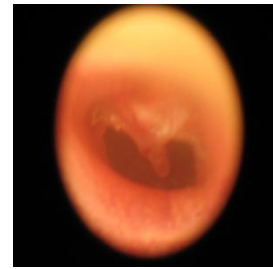


FOTOGRAFÍAS BRATA 1

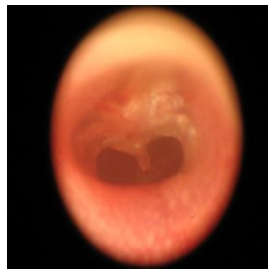
OD 3-10-14(Integro)



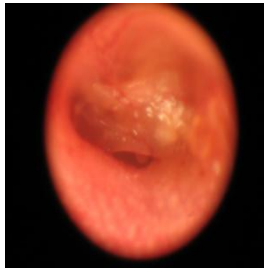
OD 3-10-14



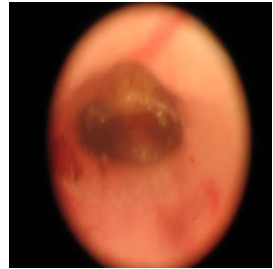
OD 6-10-14



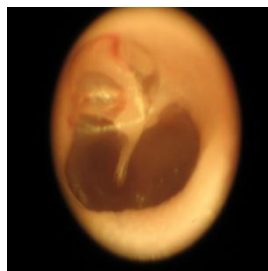
OD 10-10-14



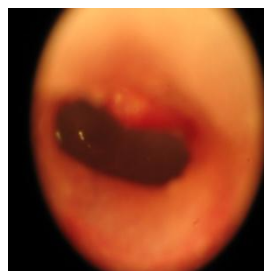
OD 13-10-14



OD 17-10-14



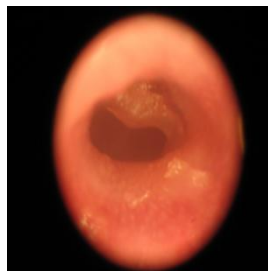
OI 3-10-14(Integro)



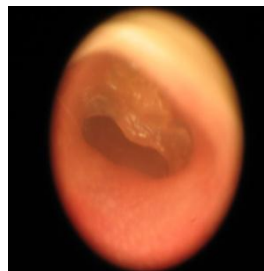
OI 3-10-14



OI 6-10-14



OI 10-10-14



OI 13-10-14

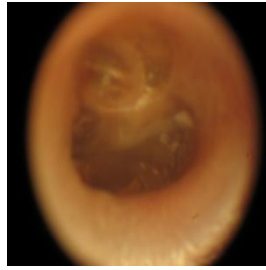


OI 17-10-14



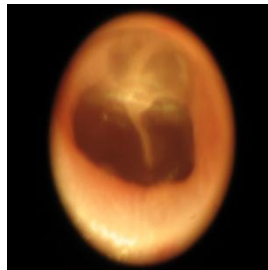


OI 24-10-14

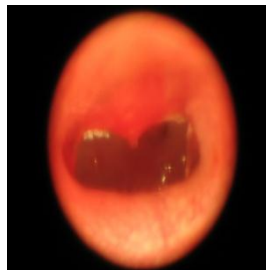


OI 31-10-14

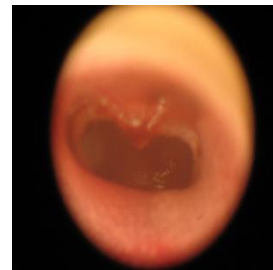
RATA 2



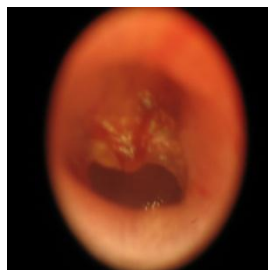
OD 3-10-14 (Integro)



OD 3-10-14



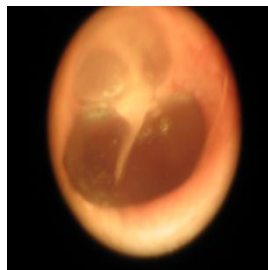
OD 6-10-14



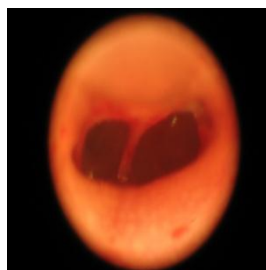
OD 10-10-14



OD 13-10-14



OI 3-10-14(Integro)



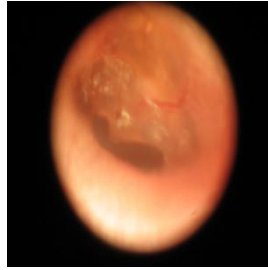
OI 3-10-14



OI 6-10-14





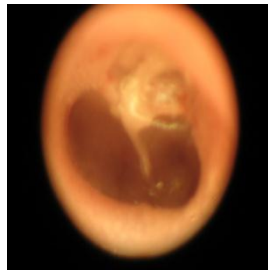


OI 10-10-14



OI 13-10-14

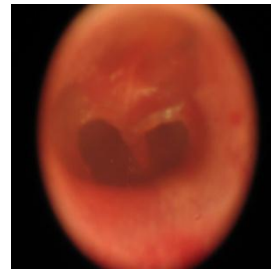
RATA 3



OD 3-10-14(Integro)



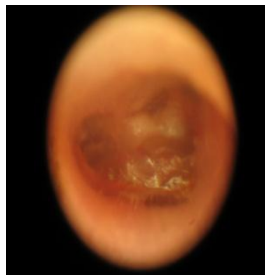
OD 3-10-14



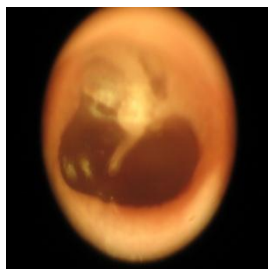
OD 6-10-14



OD 10-10-14



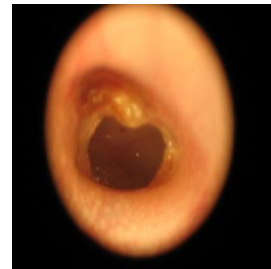
OD 13-10-14



OI 3-10-14(Integro)

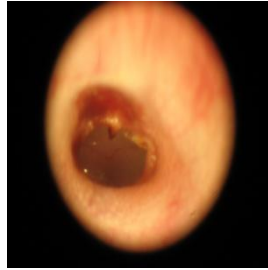


OI 3-10-14



OI 6-10-14

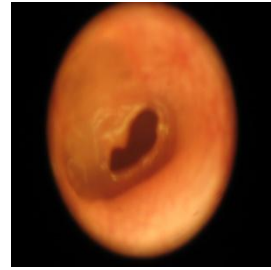




OI 10-10-14



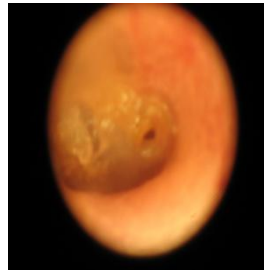
OI 13-10-14



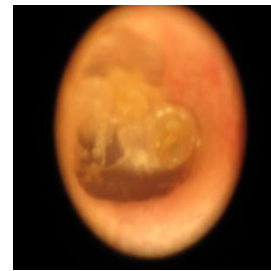
OI 17-10-14



OI 24-10-14

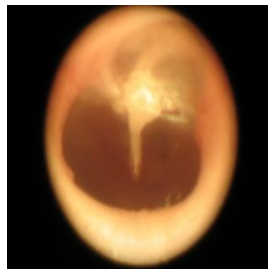


OI 31-10-14

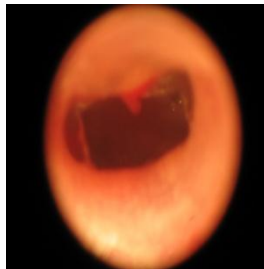


OI 7-11-14

RATA 4



OD 3-10-14 (Integro)



OD 3-10-14



OD 6-10-14



OD 10-10-14

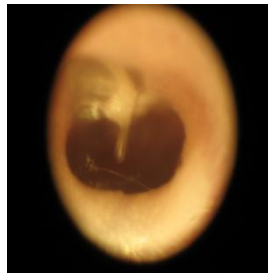


OD 13-10-14

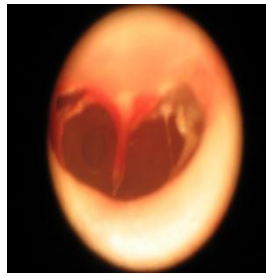


OD 17-10-14

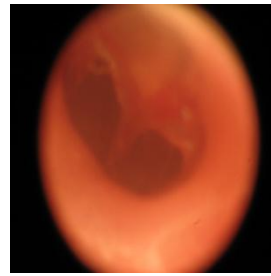




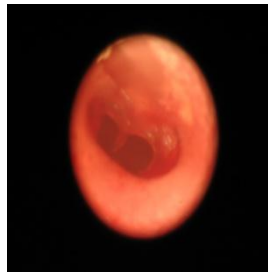
OI 3-10-14 (Integro)



OI 3-10-14



OI 6-10-14



OI 10-10-14

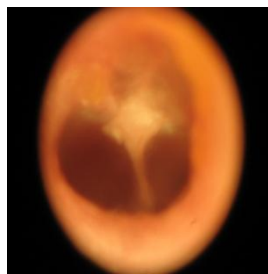


OI 13-10-14



OI 17-10-14

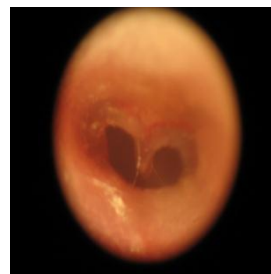
RATA 5



OD 3-10-14(Integro)



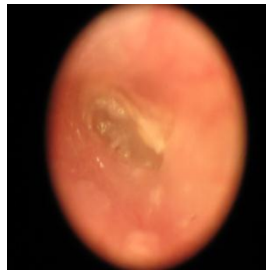
OD 3-10-14



OD 6-10-14

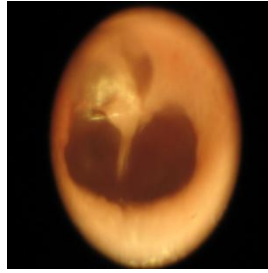


OD 10-10-14



OD 13-10-14





OI 3-10-14(Integro)



OI 3-10-14



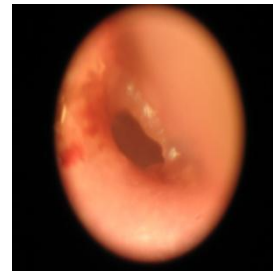
OI 6-10-14



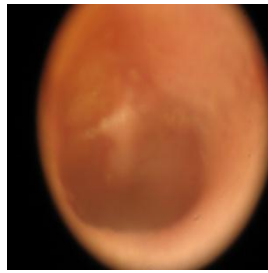
OI 10-10-14



OI 13-10-14

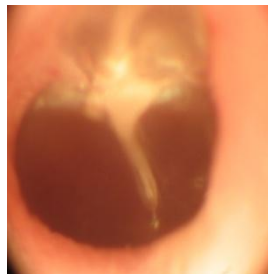


OI 17-10-14



OI 24-10-14

RATA 6



OD 3-10-14(Integro)



OD 3-10-14



OD 6-10-14



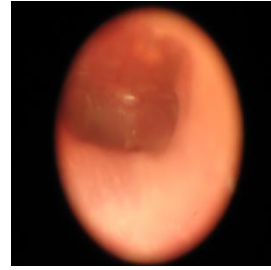




OD 10-10-14



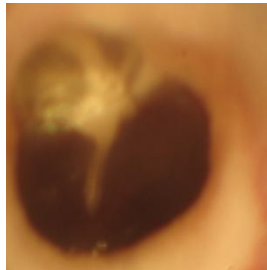
OD 13-10-14



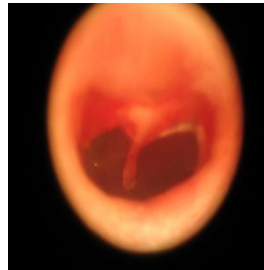
OD 17-10-14



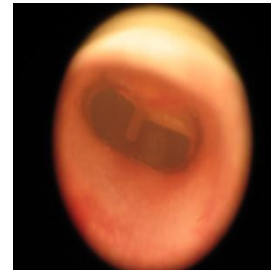
OD 24-10-14



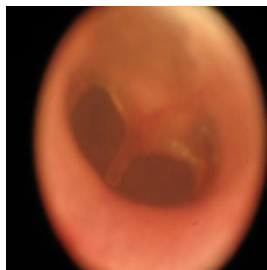
OI 3-10-14(Integro)



OI 3-10-14



OI 6-10-14



OI 10-10-14



OI 13-10-14



OI 17-10-14

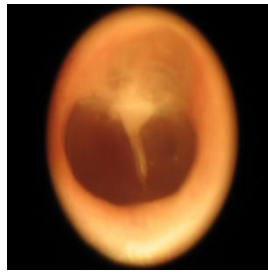


OI 24-10-14

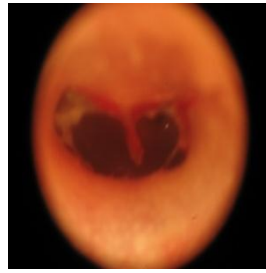


OI 31-10-14

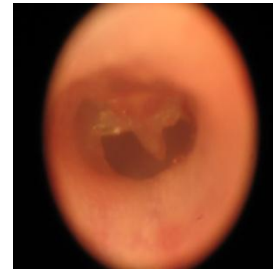


RATA 7

OD 3-10-14(Integro)



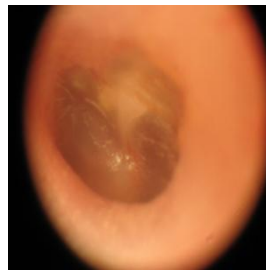
OD 3-10-14



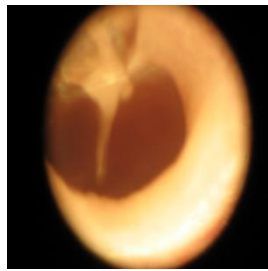
OD 6-10-14



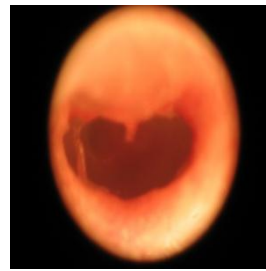
OD 10-10-14



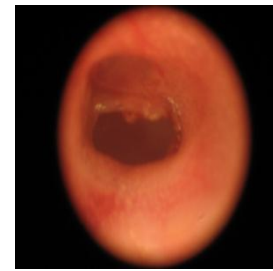
OD 13-10-14



OI 3-10-14(Integro)



OI 3-10-14



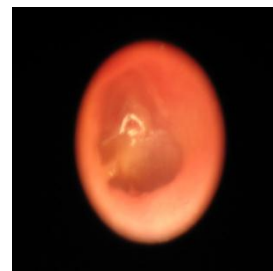
OI 6-10-14



OI 10-10-14

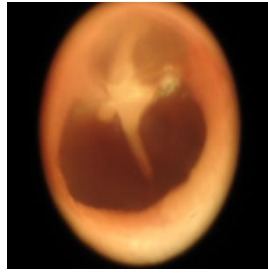


OI 13-10-14

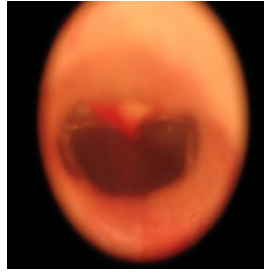


OI 17-10-14

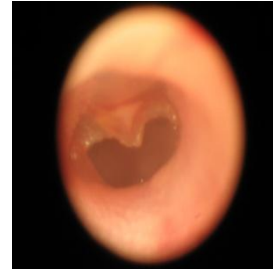


RATA 8

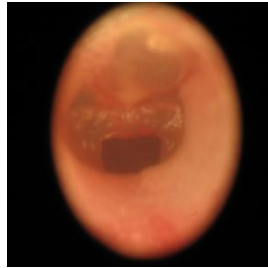
OD 3-10-14(Integro)



OD 3-10-14



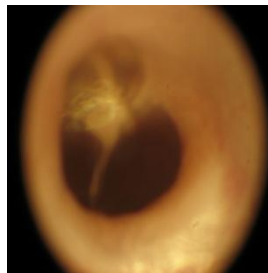
OD 6-10-14



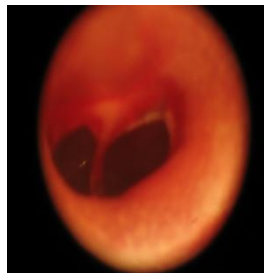
OD 10-10-14



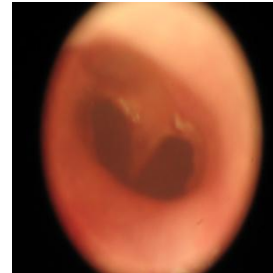
OD 13-10-14



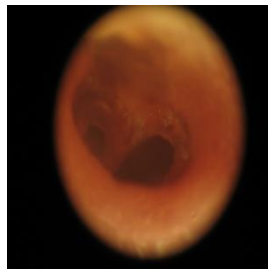
OI 3-10-14(Integro)



OI 3-10-14



OI 6-10-14



OI 10-10-14



OI 13-10-14

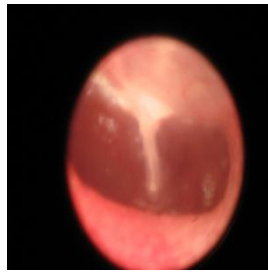


OI 17-10-14

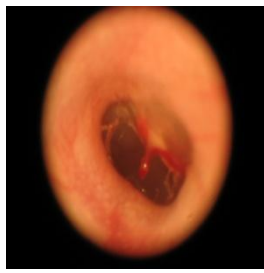


OI 24-10-14

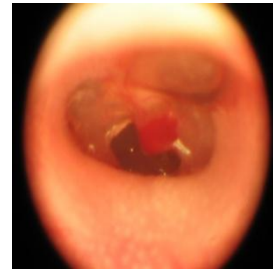


RATA 9

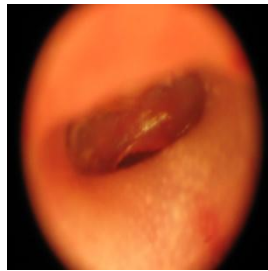
OD 3-10-14 (Integro)



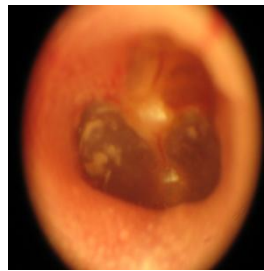
OD 3-10-14



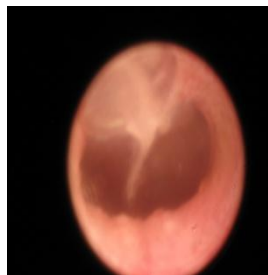
OD 6-10-14



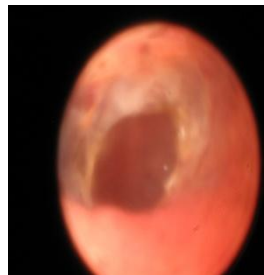
OD 10-10-14



OD 13-10-14



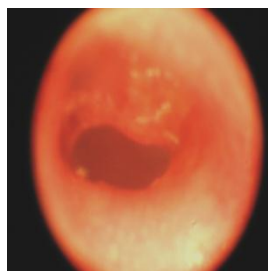
OI 3-10-14 (Integro)



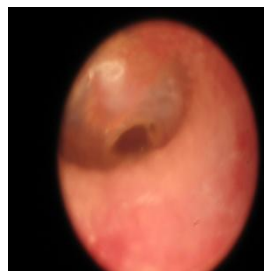
OI 3-10-14



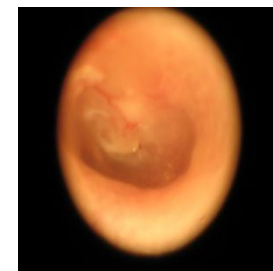
OI 6-10-14



OI 10-10-14



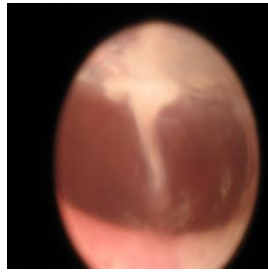
OI 13-10-14



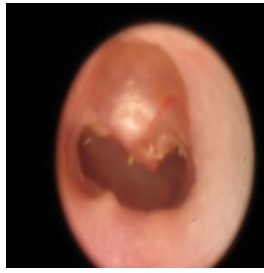
OI 17-10-14



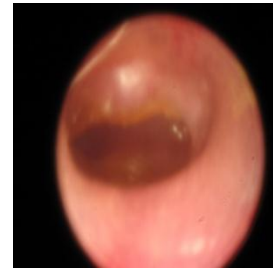


RATA 10

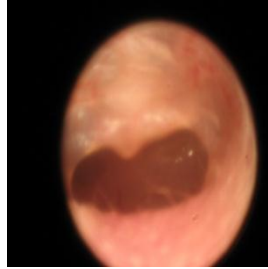
OD 3-10-14 (Integro)



OD 3-10-14



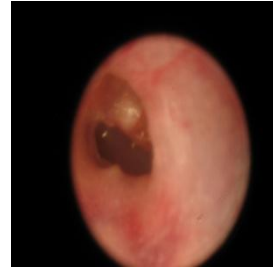
OD 6-10-14



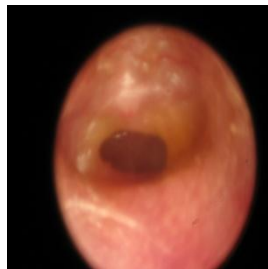
OD 10-10-14



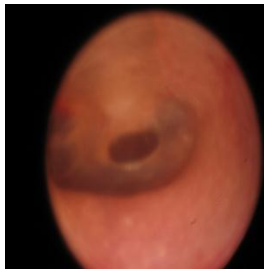
OD 13-10-14



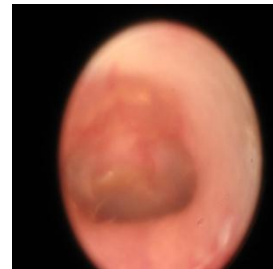
OD 17-10-14



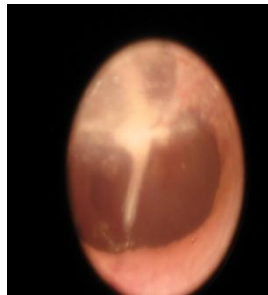
OD 24-10-14



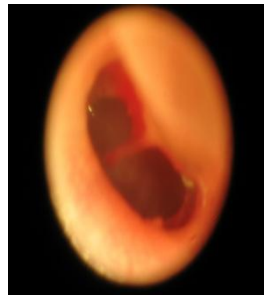
OD 31-10-14



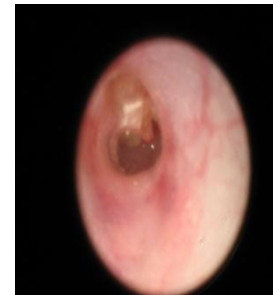
OD 7-11-14



OI 3-10-14 (Integro)



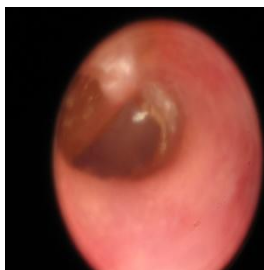
OI 3-10-14



OI 6-10-14



OI 10-10-14

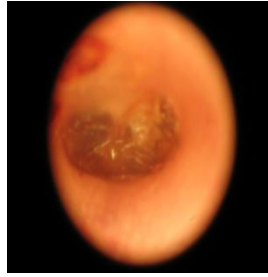


OI 13-10-14



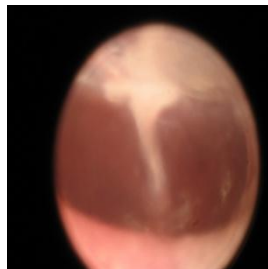
OI 17-10-14



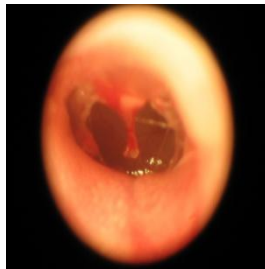


OI 24-10-14

RATA 11



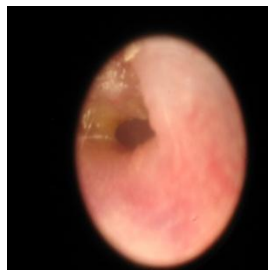
OD 3-10-14 (Integro)



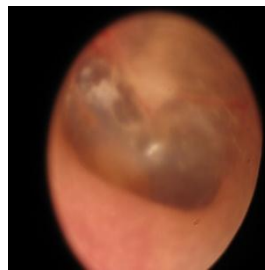
OD 3-10-14



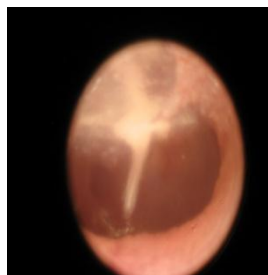
OD 6-10-14



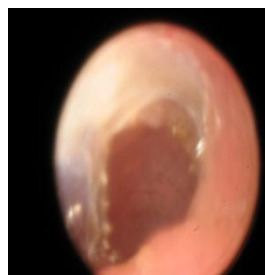
OD 10-10-14



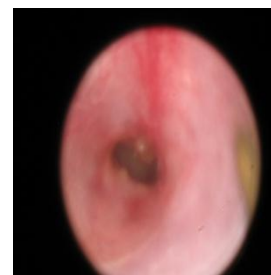
OD 13-10-14



OI 3-10-14 (Integro)

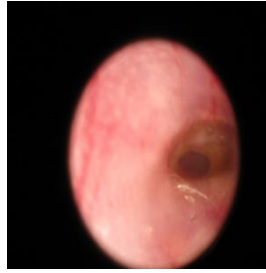


OI 3-10-14



OI 6-10-14



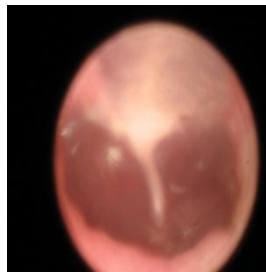


OI 10-10-14

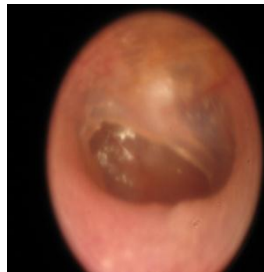


OI 13-10-14

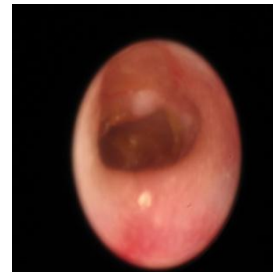
RATA 12



OD 3-10-14 (Integro)



OD 3-10-14



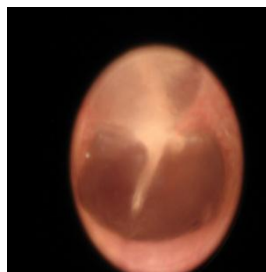
OD 6-10-14



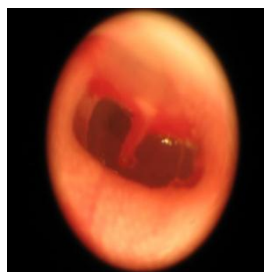
OD 10-10-14



OD 13-10-14



OI 3-10-14 (Integro)



OI 3-10-14

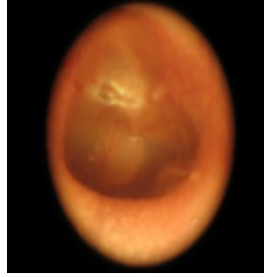


OI 6-10-14





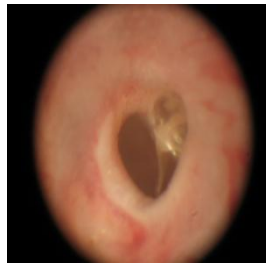
OI 10-10-14



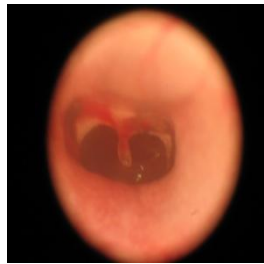
OI 13-10-14

FOTOGRAFÍAS C

RATA 1



OD 24-10-14 (íntegro)



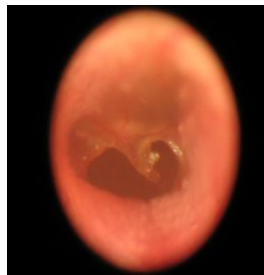
OD 24-10-14



OD 27-10-14



OD 31-10-14



OD 3-11-14



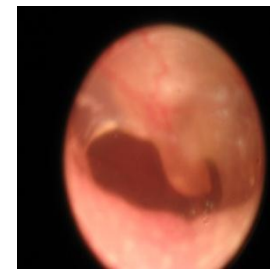
OD 7-11-14



OD 14-11-14



OD 21-11-14



OD 28-11-14







OD 5-12-14



OD 12-12-14



OD 19-12-14



OD 26-12-14



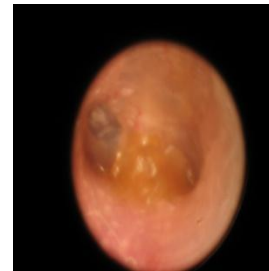
OD 2-1-15



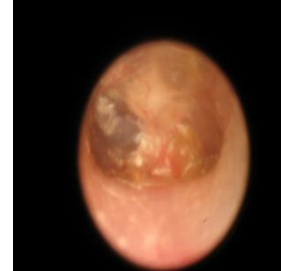
OD 9-1-15



OD 16-1-15



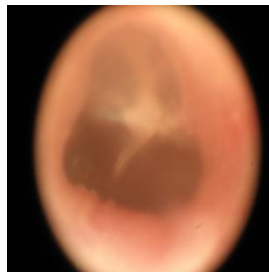
OD 23-1-15



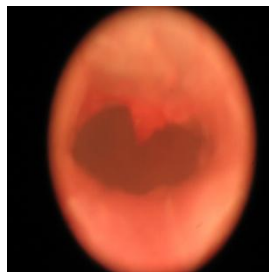
OD 30-1-15



OD 6-2-15



OI 24-10-14 (íntegro)

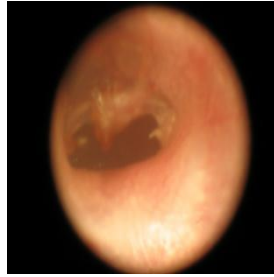


OI 24-10-14



OI 27-10-14





OI 31-10-14



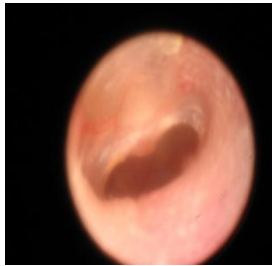
OI 3-11-14



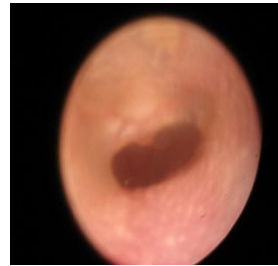
OI 7-11-14



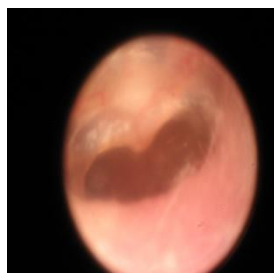
OI 14-11-14



OI 21-11-14



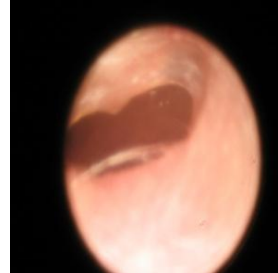
OI 28-11-14



OI 5-12-14



OI 12-12-14



OI 19-12-14



OI 26-12-14



OI 2-1-15



OI 9-1-15



OI 16-1-15

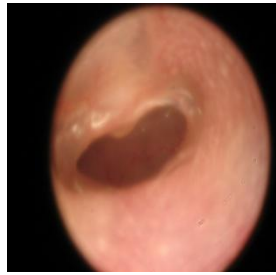


OI 23-1-15

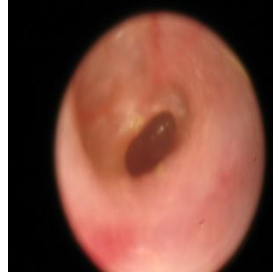


OI 30-1-15





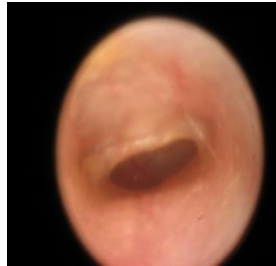
OI 6-2-15



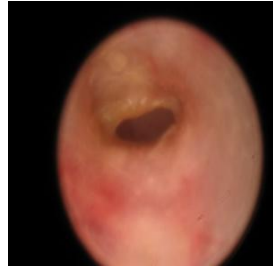
OI 13-2-15



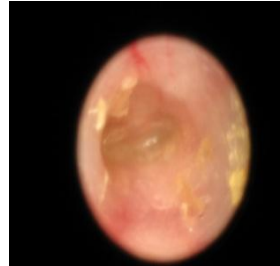
OI 20-2-15



OI 27-2-15



OI 6-3-15



OI 13-3-15

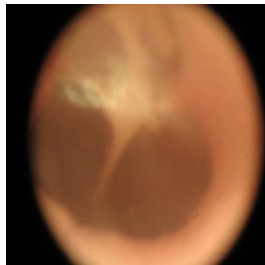
RATA 2



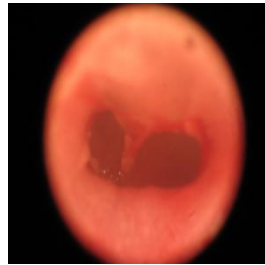
OD 24-10-14(Integro)



OD 24-10-14



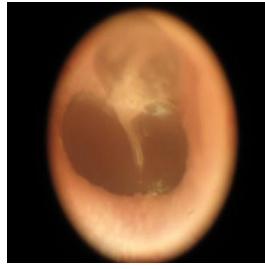
OI 24-10-14(Integro)



OI 24-10-14



## RATA 3



OD 24-10-14(Integro)



OD 24-10-14



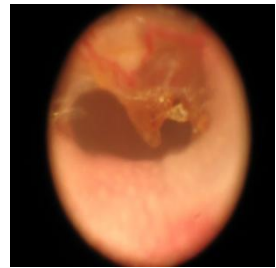
OD 27-10-14



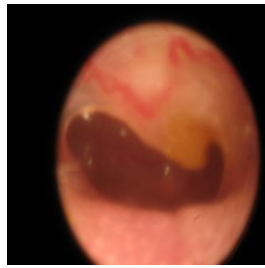
OD 31-10-14



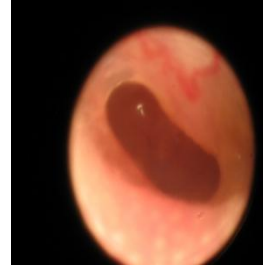
OD 3-11-14



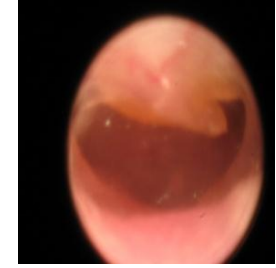
OD 7-11-14



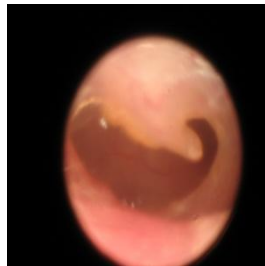
OD 14-11-14



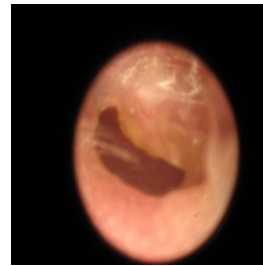
OD 21-11-14



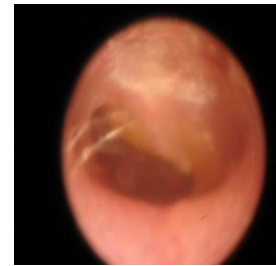
OD 28-11-14



OD 5-12-14



OD 12-12-14



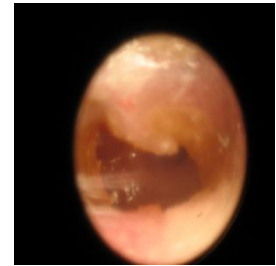
OD 19-12-14



OD 26-12-14



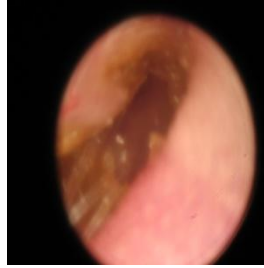
OD 2-1-15



OD 9-1-15







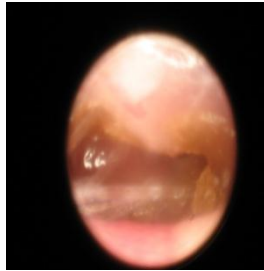
OD 16-1-15



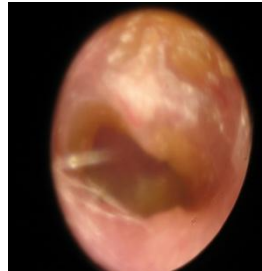
OD 23-1-15



OD 30-1-15



OD 6-2-15



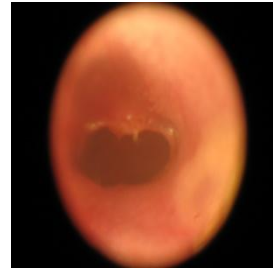
OD 13-2-15



OI 24-10-14(Integro)



OI 24-10-14



OI 27-10-14



OI 31-10-14



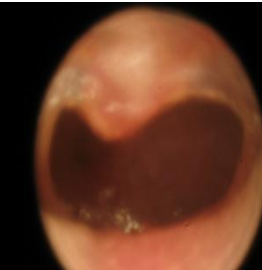
OI 3-11-14



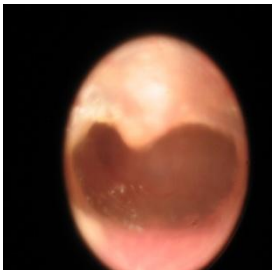
OI 7-11-14



OI 14-11-14

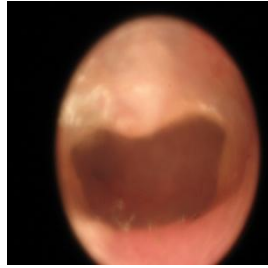


OI 21-11-14

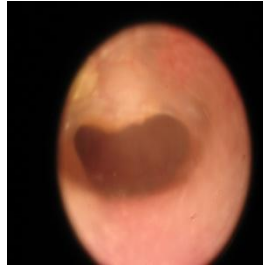


OI 28-11-14

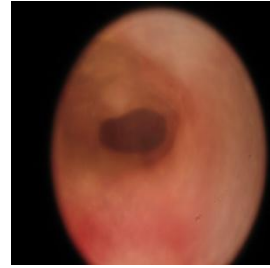




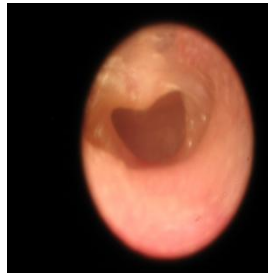
OI 5-12-14



OI 12-12-14



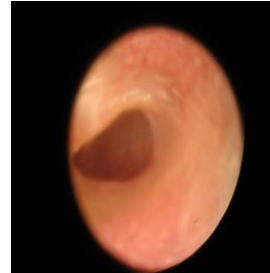
OI 19-12-14



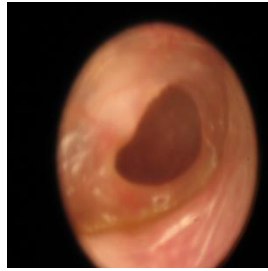
OI 26-12-14



OI 2-1-15



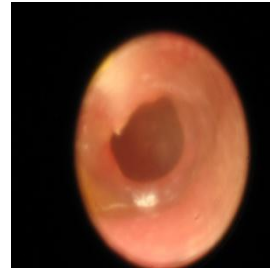
OI 9-1-15



OI 16-1-15



OI 23-1-15



OI 30-1-15



OI 6-2-15



OI 13-2-15



## RATA 4



OD 24-10-14(Integro)



OD 24-10-14



OD 27-10-14



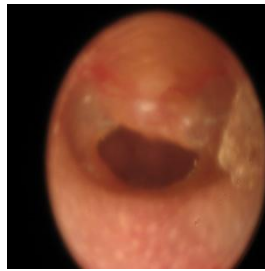
OD 31-10-14



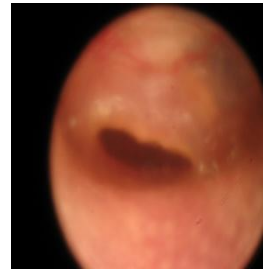
OD 3-11-14



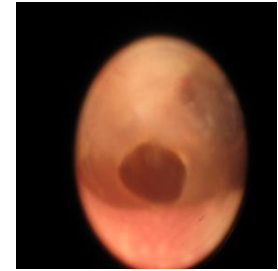
OD 7-11-14



OD 14-11-14



OD 21-11-14



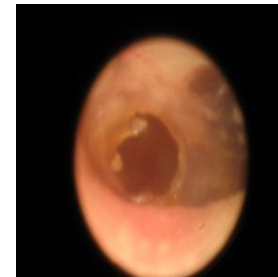
OD 28-11-14



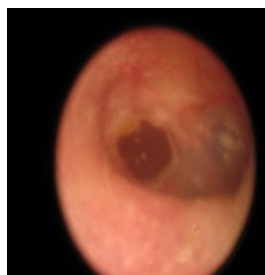
OD 5-12-14



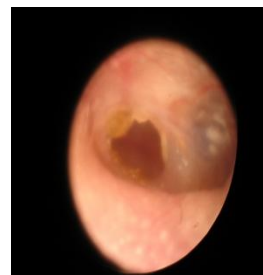
OD 12-12-14



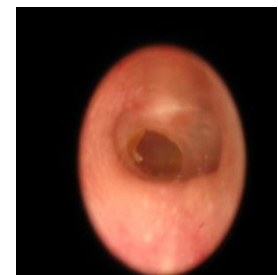
OD 19-12-14



OD 26-12-14

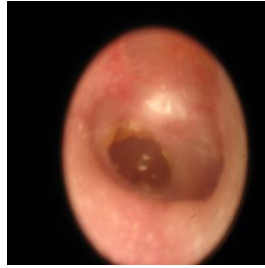


OD 2-1-15



OD 9-1-15

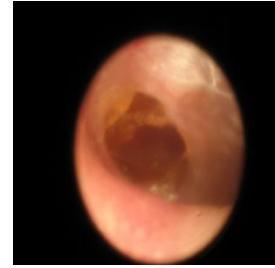




OD 16-1-15



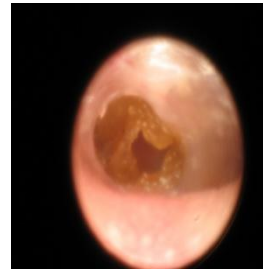
OD 23-1-15



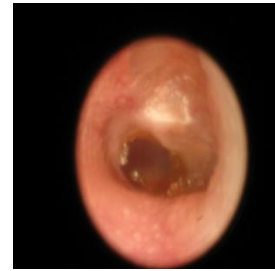
OD 30-1-15



OD 6-2-15



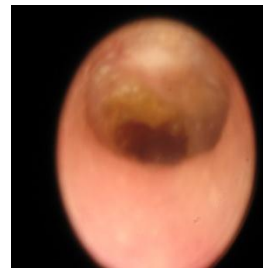
OD 13-2-15



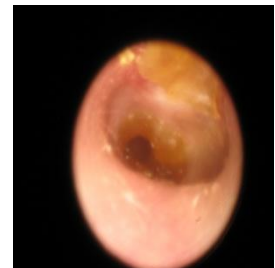
OD 20-2-15



OD 27-2-15



OD 6-3-15



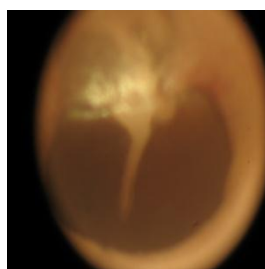
OD 13-3-15



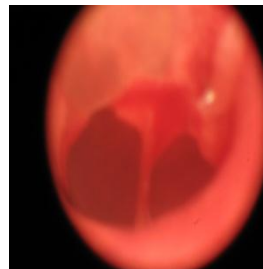
OD 20-3-15



OD 27-3-15



OI 24-10-14(Integro)



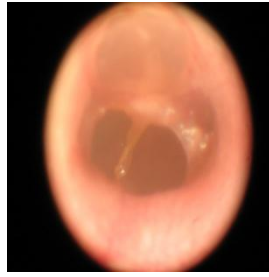
OI 24-10-14



OI 27-10-14







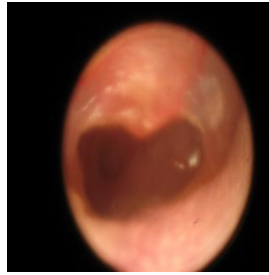
OI 31-10-14



OI 3-11-14



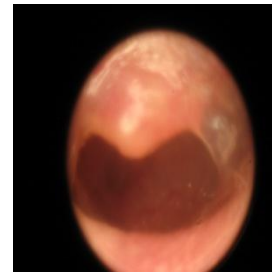
OI 7-11-14



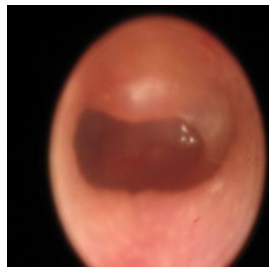
OI 14-11-14



OI 21-11-14



OI 28-11-14



OI 5-12-14



OI 12-12-14



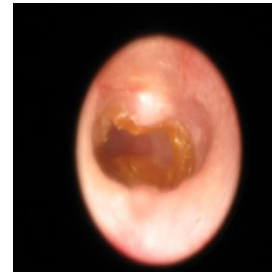
OI 19-12-14



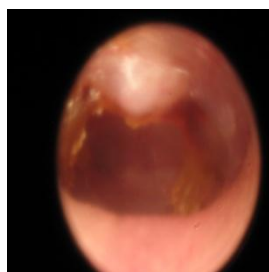
OI 26-12-14



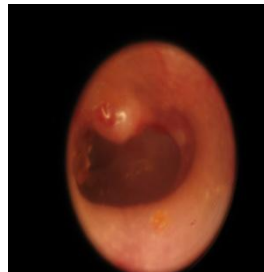
OI 2-1-15



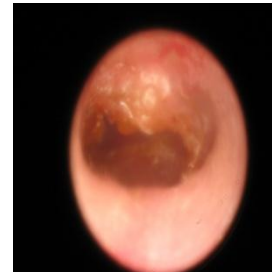
OI 9-1-15



OI 16-1-15

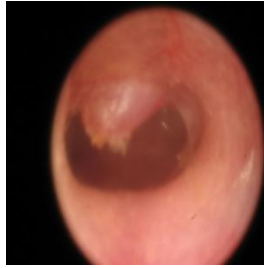


OI 23-1-15



OI 30-1-15

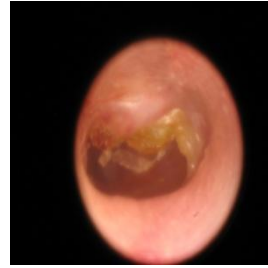




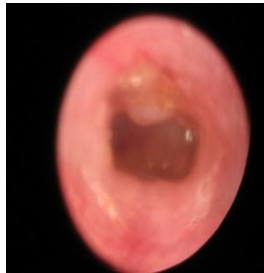
OI 6-2-15



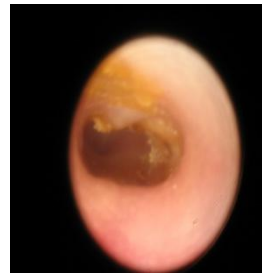
OI 13-2-15



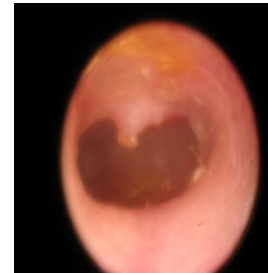
OI 20-2-15



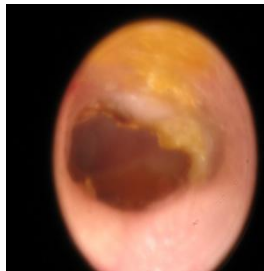
OI 27-2-15



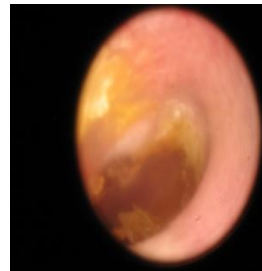
OI 6-3-15



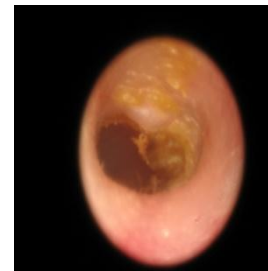
OI 13-3-15



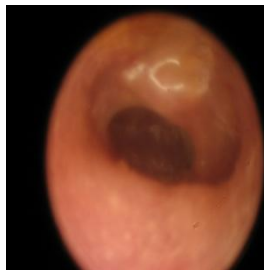
OI 20-3-15



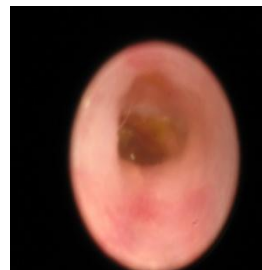
OI 27-3-15



OI 3-4-15



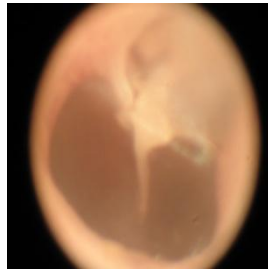
OI 17-4-15



OI 24-4-15



## RATA 5



OD 24-10-14 (Integro)



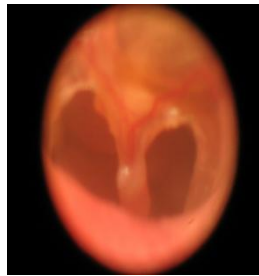
OD 24-10-14



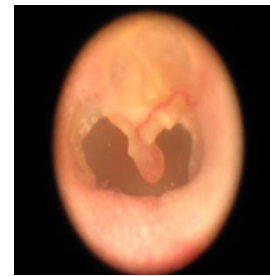
OD 27-10-14



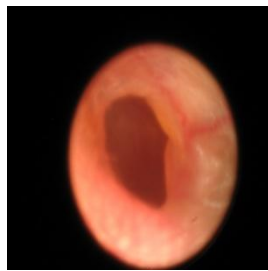
OD 31-10-14



OD 3-11-14



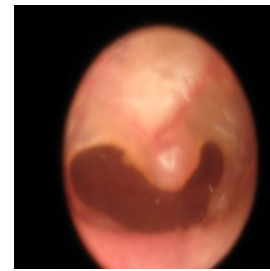
OD 7-11-14



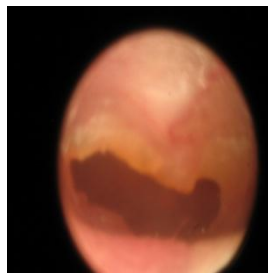
OD 14-11-14



OD 21-11-14



OD 28-11-14



OD 5-12-14



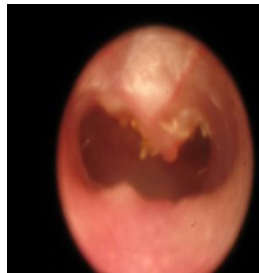
OD 12-12-14



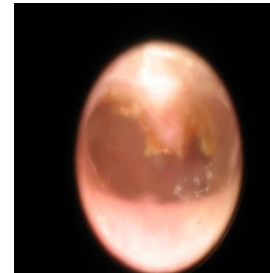
OD 19-12-14



OD 26-12-14



OD 2-1-15

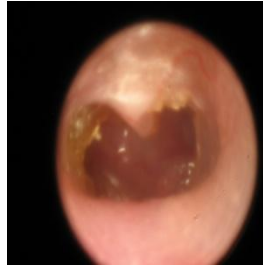


OD 9-1-15

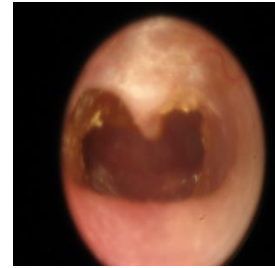




OD 16-1-15



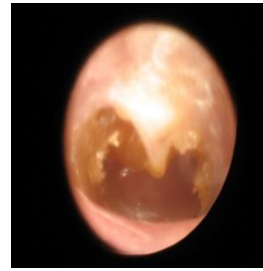
OD 23-1-15



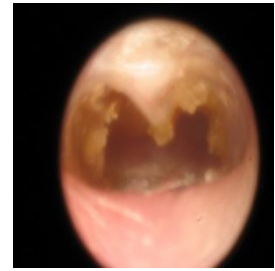
OD 30-1-15



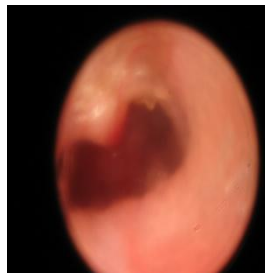
OD 6-2-15



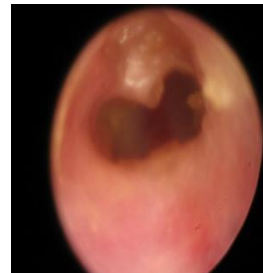
OD 13-2-15



OD 20-2-15



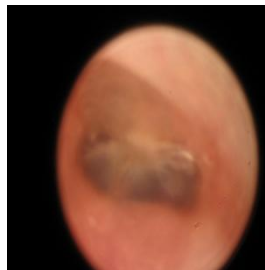
OD 27-2-15



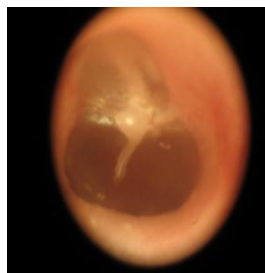
OD 6-3-15



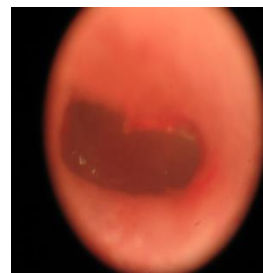
OD 13-3-15



OD 20-3-15



OI 24-10-14(Integro)



OI 24-10-14



OI 27-10-14







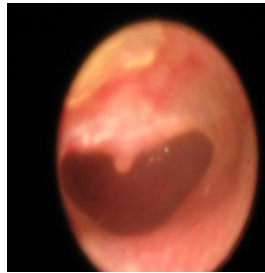
OI 31-10-14



OI 3-11-14



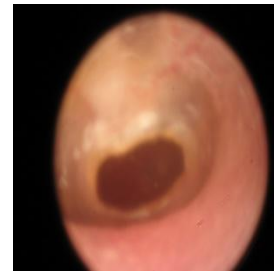
OI 7-11-14



OI 14-11-14



OI 21-11-14



OI 28-11-14



OI 5-12-14



OI 12-12-14



OI 19-12-14



OI 26-12-14



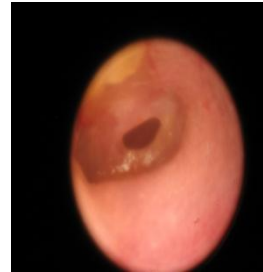
OI 2-1-15



OI 9-1-15



OI 16-1-15



OI 23-1-15

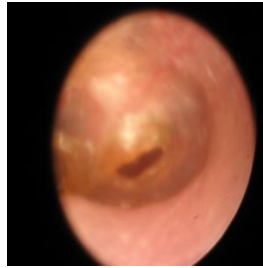


OI 30-1-15





OI 6-2-15



OI 13-2-15



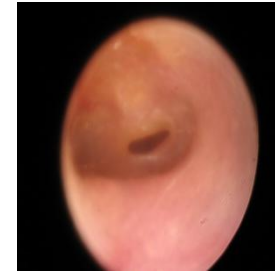
OI 20-2-15



OI 27-2-15



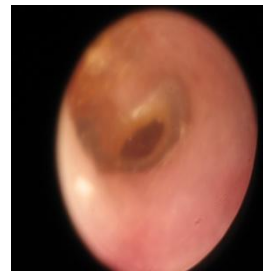
OI 6-3-15



OI 13-3-15



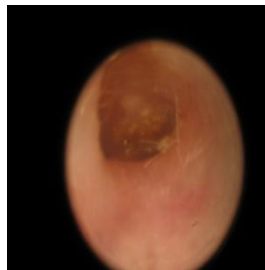
OI 20-3-15



OI 27-3-15



OI 3-4-15



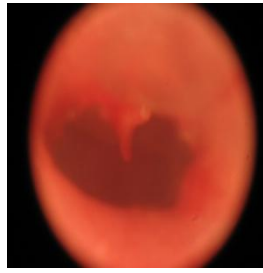
OI 10-4-15



## RATA 6



OD 24-10-14(Integro)



OD 24-10-14



OD 27-10-14



OD 31-10-14



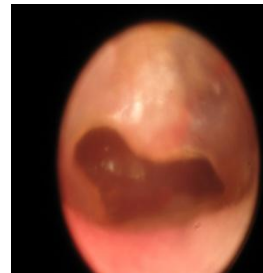
OD 3-11-14



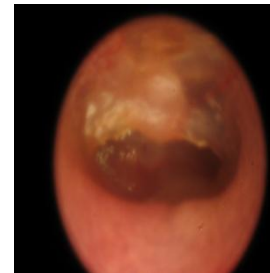
OD 7-11-14



OD 14-11-14



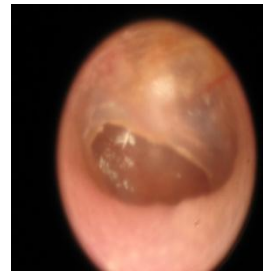
OD 21-11-14



OD 28-11-14



OD 5-12-14



OD 12-12-14



OD 19-12-14



OD 26-12-14



OD 2-1-15



OD 9-1-15

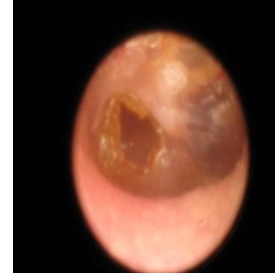




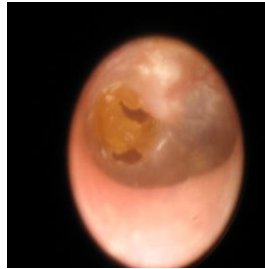
OD 16-1-15



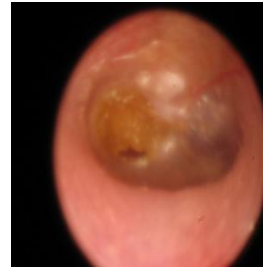
OD 23-1-15



OD 30-1-15



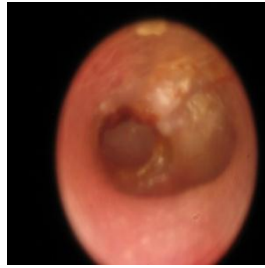
OD 6-2-15



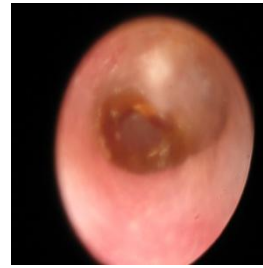
OD 13-2-15



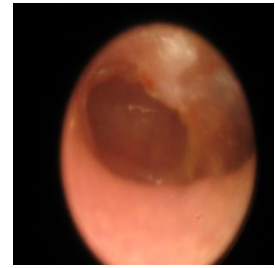
OD 20-2-15



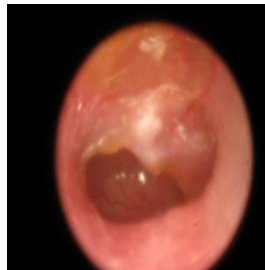
OD 27-2-15



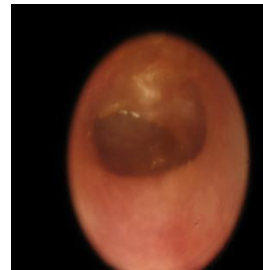
OD 6-3-15



OD 13-3-15



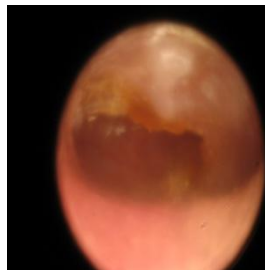
OD 20-3-15



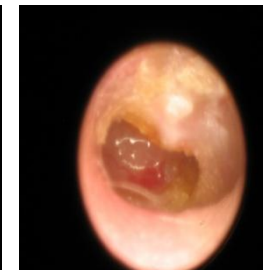
OD 27-3-15



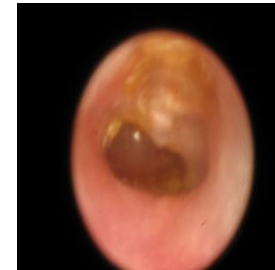
OD 3-4-15



OD 10-4-15



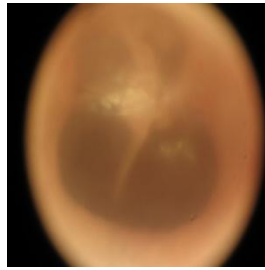
OD 17-4-15



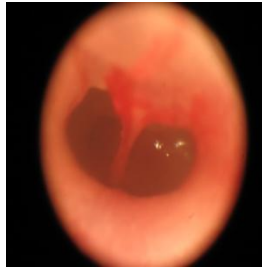
OD 24-4-15



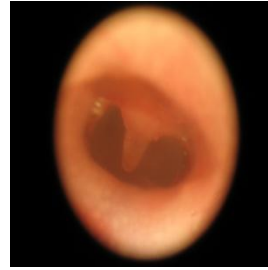




OI 24-10-14(Integro)



OI 24-10-14



OI 27-10-14



OI 31-10-14



OI 3-11-14



OI 7-11-14



OI 14-11-14



OI 21-11-14



OI 28-11-14



OI 5-12-14



OI 12-12-14



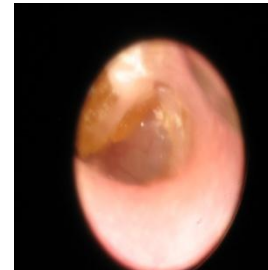
OI 19-12-14



OI 26-12-14

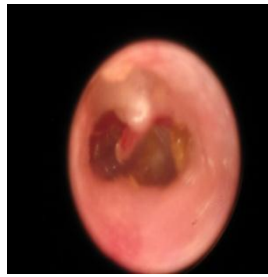


OI 2-1-15

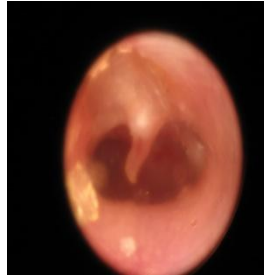


OI 9-1-15





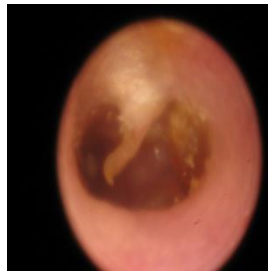
OI 16-1-15



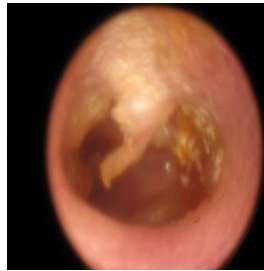
OI 23-1-15



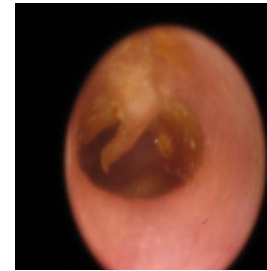
OI 30-1-15



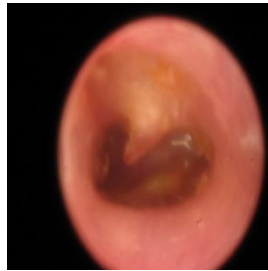
OI 6-2-15



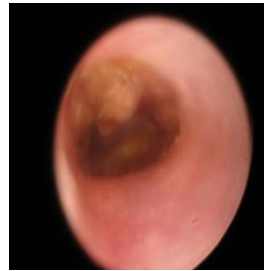
OI 13-2-15



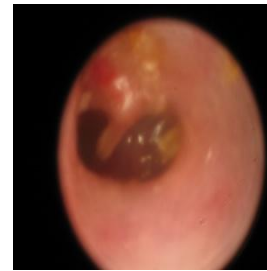
OI 20-2-15



OI 27-2-15



OI 6-3-15



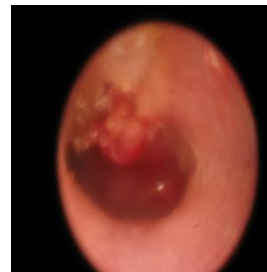
OI 13-3-15



OI 20-3-15



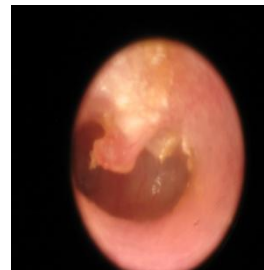
OI 27-3-15



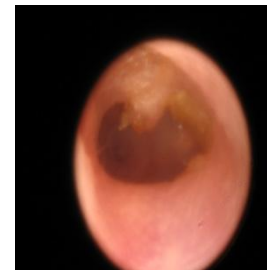
OI 3-4-15



OI 10-4-15



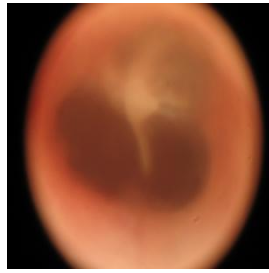
OI 17-4-15



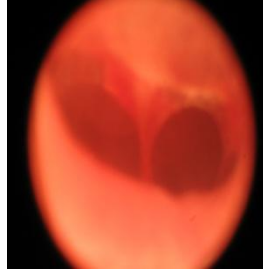
OI 24-4-15



## RATA 7



OD 24-10-14(Integro)



OD 24-10-14



OD 27-10-14



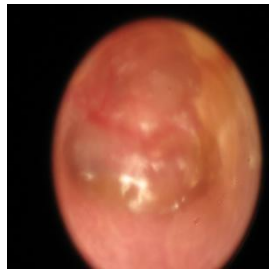
OD 31-10-14



OD 3-11-14



OD 7-11-14



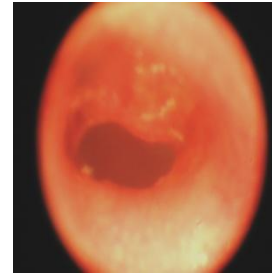
OD 14-11-14



OI 24-10-14(Integro)



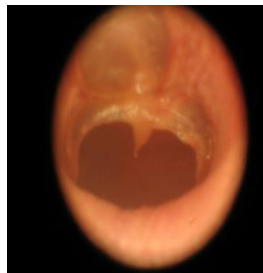
OI 24-10-14



OD 27-10-14



OD 31-10-14



OD 3-11-14



OD 7-11-14

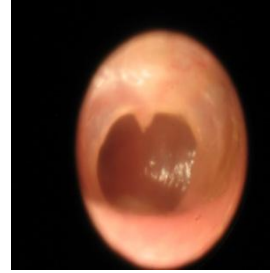




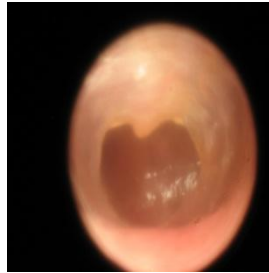
OI 14-11-14



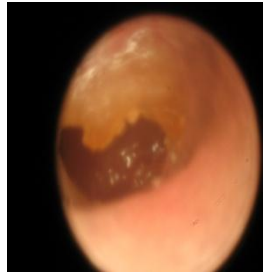
OI 21-11-14



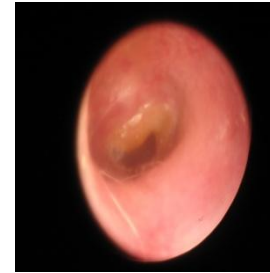
OI 28-11-14



OI 5-12-14



OI 12-12-14



OI 19-12-14



OI 26-12-14

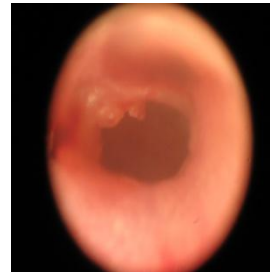
RATA 8



OD 24-10-14(Integro)



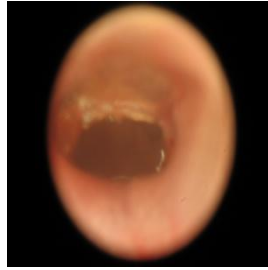
OD 24-10-14



OD 27-10-14







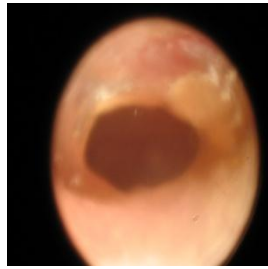
OD 31-10-14



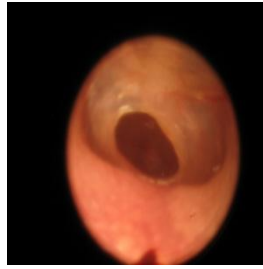
OD 3-11-14



OD 7-11-14



OD 14-11-14



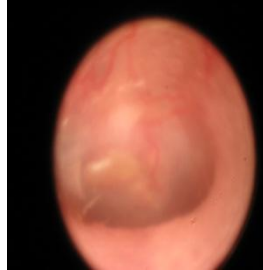
OD 21-11-14



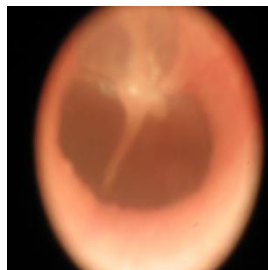
OD 28-11-14



OD 5-12-14



OD 12-12-14



OI 24-10-14(Integro)



OI 24-10-14



OI 27-10-14



OI 31-10-14



OI 3-11-14

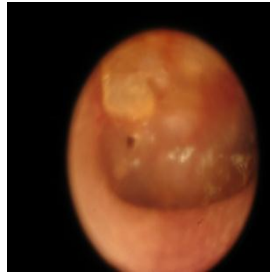


OI 7-11-14

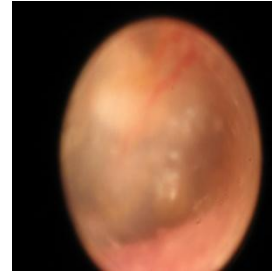




OI 14-11-14

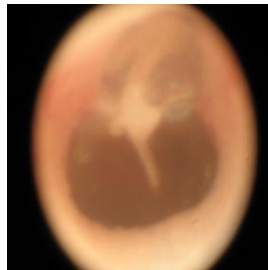


OI 21-11-14

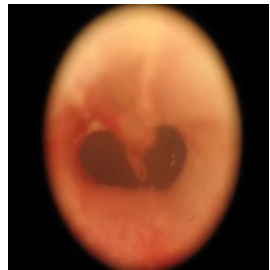


OI 28-11-14

RATA 9



OD 24-10-14(Integro)



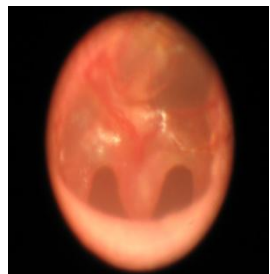
OD 24-10-14



OD 27-10-14



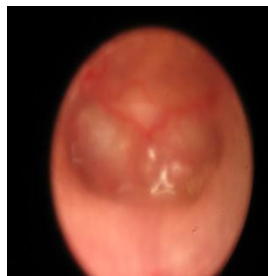
OD 31-10-14



OD 3-11-14

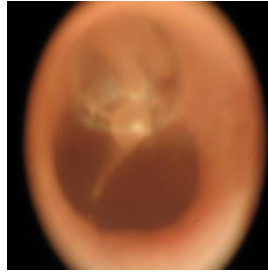


OD 7-11-14

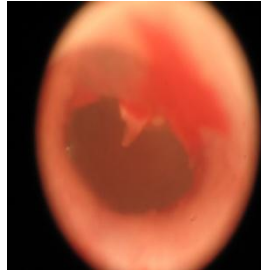


OD 14-11-14





OI 24-10-14(Integro)



OI 24-10-14



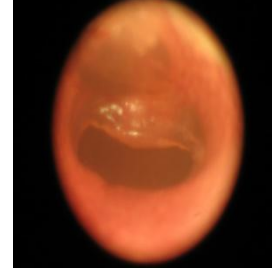
OI 27-10-14



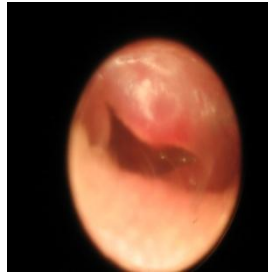
OI 31-10-14



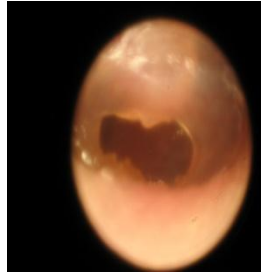
OI 3-11-14



OI 7-11-14



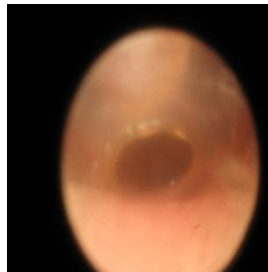
OI 14-11-15



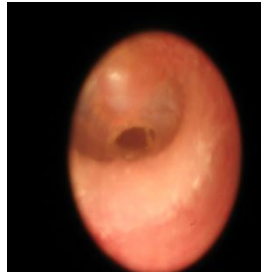
OI 21-11-15



OI 28-11-15



OI 5-12-15



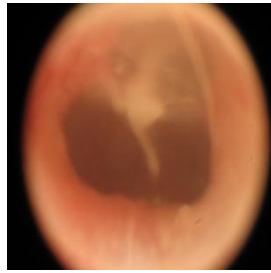
OI 12-12-15



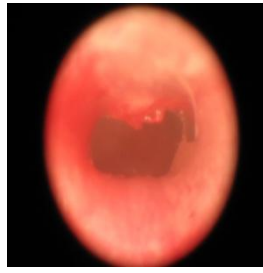
OI 19-12-15



## RATA 10



OD 24-10-14(Integro)



OD 24-10-14



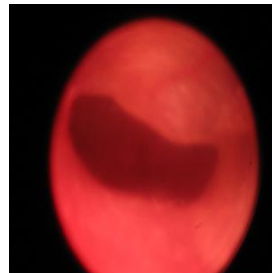
OD 27-10-14



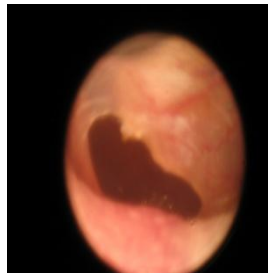
OD 31-10-14



OD 3-11-14



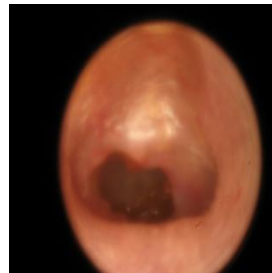
OD 7-11-14



OD 14-11-14



OD 21-11-14



OD 28-11-14



OD 5-12-14



OD 12-12-14



OD 19-12-14



OD 26-12-14



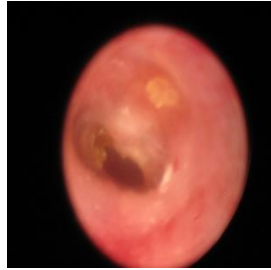
OD 2-1-15



OD 9-1-15



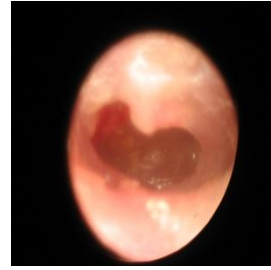




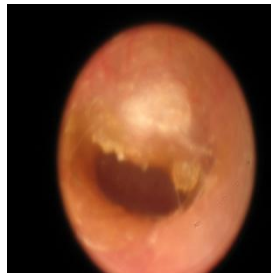
OD 16-1-15



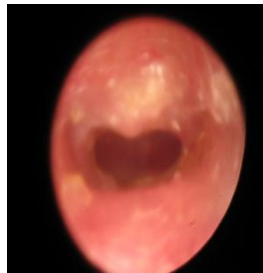
OD 23-1-15



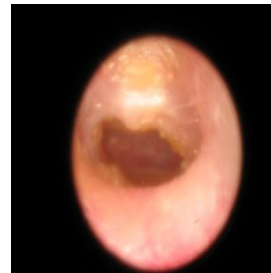
OD 30-1-15



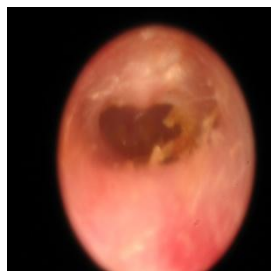
OD 6-2-15



OD 13-2-15



OD 20-2-15



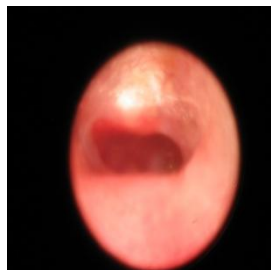
OD 27-2-15



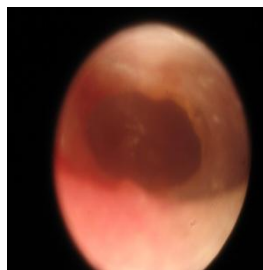
OD 6-3-15



OD 13-3-15



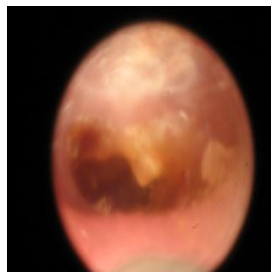
OD 20-3-15



OD 27-3-15



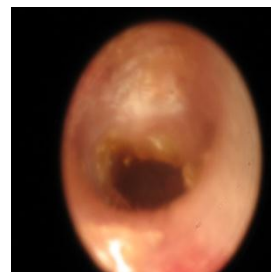
OD 3-4-15



OD 10-4-15

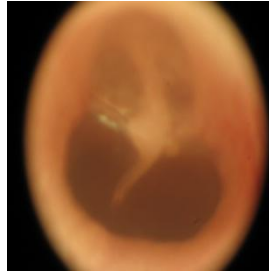


OD 17-4-15



OD 24-4-15





OI 24-10-14(Integra)



OI 24-10-14



OI 27-10-14



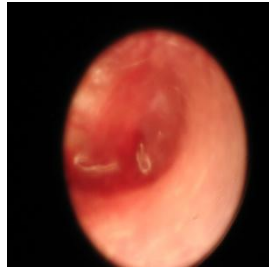
OI 31-10-14



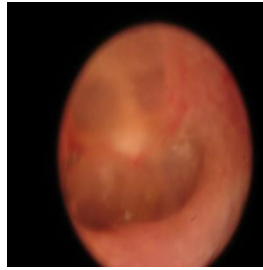
OI 3-11-14



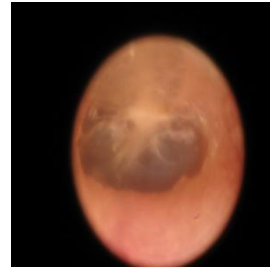
OI 7-11-14



OI 14-11-14

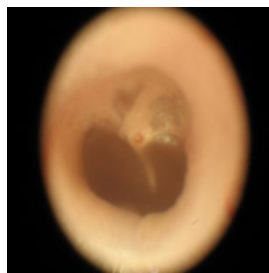


OI 21-11-14



OI 6-2-15

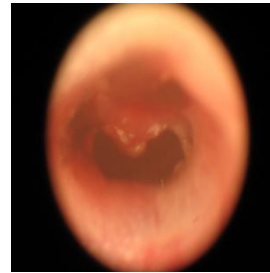
RATA 11



OD 24-10-14(Integro)



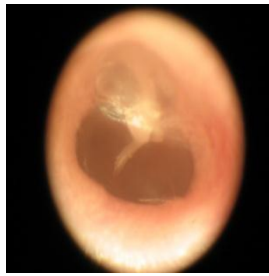
OD 24-10-14



OD 27-10-14



OD 31-10-14



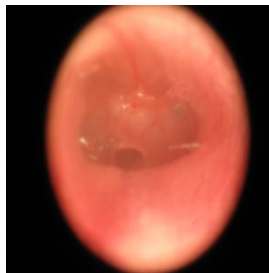
OI 24-10-14(Integro)



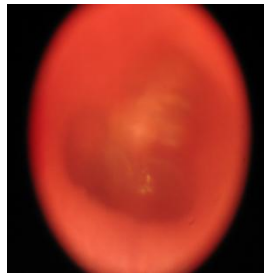
OI 24-10-14



OI 27-10-14

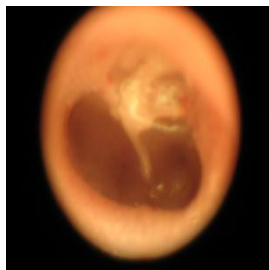


OI 31-10-14



OI 3-11-14

RATA 12



OD 24-10-14(Integro)



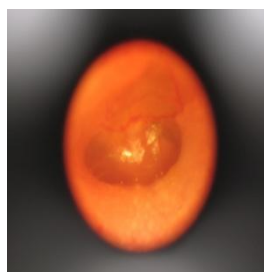
OD 24-10-14



OD 27-10-14

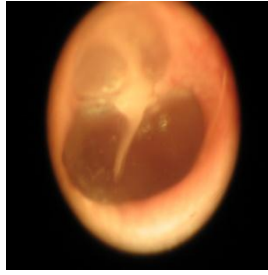


OD 31-10-14



OD 3-11-14





OI 24-10-14(Integro)



OI 24-10-14



OI 27-10-14



OI 31-10-14



OI 3-11-14

