



DESARROLLO DE UN SUSTITUTO DE LA MEMBRANA TIMPÁNICA MEDIANTE EL USO DE MATERIALES NATURALES COMO TRATAMIENTO DE LAS PERFORACIONES CRÓNICAS

Más que ninguna otra metodología, la microscopía electrónica ha contribuido a nuestro conocimiento de la organización de las células y de la estructura de los virus. La microscopía electrónica sigue jugando un papel clave en el descubrimiento de nuevos organismos, sobre todo virus y es de gran ayuda para estudiar las etapas de su ciclo vital. Cualquiera de esas etapas es susceptible de ser bloqueada por un fármaco antiviral. Y para validar y comprender el mecanismo de acción de los antivirales, la microscopía electrónica está jugando un importante papel.

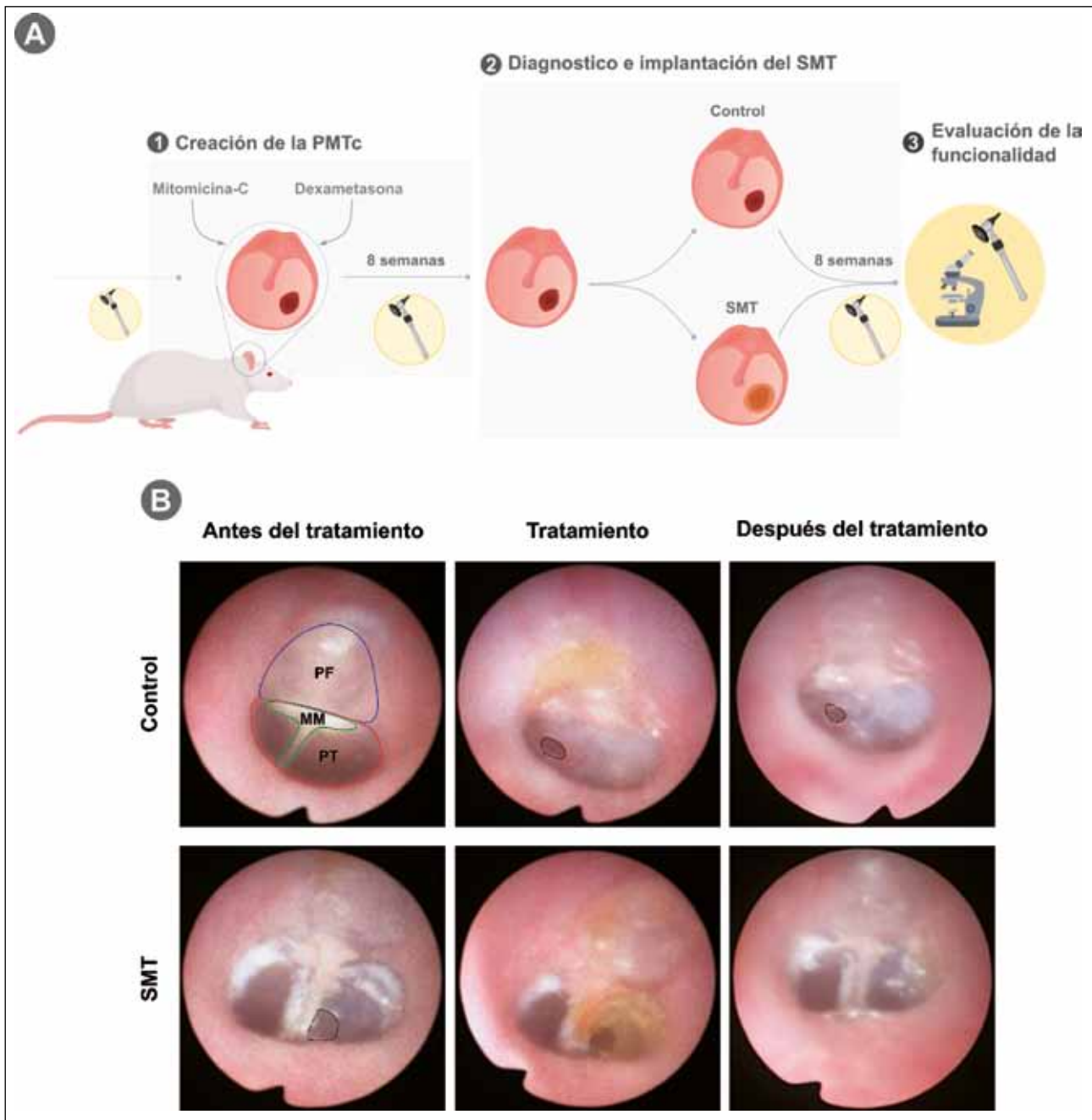
AINHOA IRASTORZA. INVESTIGADORA POSTDOCTORAL,
Unidad de Terapias Avanzadas, IIS BioGipuzkoa-Hospital Universitario Donostia. Servicio Vasco de Salud - Osakidetza.

Las perforaciones de la membrana timpánica y el uso de tratamientos convencionales

Las perforaciones de la membrana timpánica (PMT) afectan a un 2,1 % de la población mundial, siendo causadas principalmente por traumatismos e infecciones del canal auditivo ^[1]. La magnitud de las perforaciones, que se clasifican según su tamaño y ubicación, se relaciona directamente con la sintomatología. Todas las PMT están generalmente asociadas a pérdida de plenitud auditiva e hipoacusia ^[2,3]. La mayoría de las perforaciones (80-90 %) cierran espontáneamente en las primeras 4 semanas. La ubicación y tamaño de la perforación, así como la capacidad regenerativa del propio paciente, son los factores que más afectan a dicha regeneración espontánea ^[4-6]. La capacidad regenerativa inherente de la MT se atribuye a la presencia de células progenitoras latentes, que comparten similitudes con otras células madre epiteliales. El cierre espontáneo de la PMT está guiado por el epitelio

timpánico, que cierra la perforación mediante hiperproliferación. Inicialmente, el epitelio queda suspendido en el aire, y posteriormente las capas fibrosa y mucosa que completan la estructura histológica del tímpano rellenan el defecto, cerrando por completo el daño ^[7,8].

Aunque no es lo más habitual, algunas perforaciones se vuelven crónicas (PMTc) debido a heridas de gran tamaño, infecciones recurrentes o una capacidad de curación deficiente. Estos casos requieren tratamientos quirúrgicos reconstructivos que permitan la reestructuración del tejido nativo, ya que las PMTc carecen del soporte necesario para facilitar la migración y proliferación celular. El tratamiento actual para la inducción de la regeneración timpánica, la miringoplastia, se basa en el uso de material de injerto autólogo, habitualmente fascia del músculo temporal o pericondrio del cartílago tragal, para promover el cierre de la perforación. El éxito del tratamiento es variable (tasas de cierre del 46-100 %), debido a variaciones en las técnicas y habilidades quirúrgicas ^[9,10]. Asimismo, la miringoplastia presenta



Evaluación de la funcionalidad e integración del SMT en un modelo de PMTc. A) Etapas y flujo de trabajo del ensayo in vivo. B) Evaluación otoscópica de la implantación in vivo del SMT. En la imagen superior izquierda se muestra una MT sana donde se distinguen las principales estructuras que componen el tímpano (PF: pars flácida, PT: pars tensa, MM: mango del martillo). En el resto de imágenes se presenta el seguimiento realizado a las perforaciones de control (sin tratamiento) y las tratadas con el SMT, antes de la perforación, el día de tratamiento y a tiempo final tras 2 meses desde la colocación del injerto.

diversos inconvenientes asociados a la utilización de tejidos autólogos: 1) los injertos requieren de una cirugía invasiva y anestesia general para la obtención del injerto, 2) la operación necesita de grandes habilidades quirúrgicas, 3) es un tratamiento con alto coste, 4) las

propiedades estructurales de los materiales autólogos no están optimizadas para la conducción del sonido o la prevención de la retracción de la TM, 5) la cicatrización tras una miringoplastia con injertos autólogos puede ser prolongada, y 6) los injertos pueden tener defectos

estructurales que pueden dar lugar a debilidad, retracción y reperfusión. De hecho, en muchas ocasiones, las PMT tratadas mediante miringoplastia se reperfúran debido a defectos estructurales, incorrecta colocación del injerto, infecciones, o desarrollo de un neotímpano con insuficiente funcionalidad.

Desarrollo de una nueva solución basada en la ingeniería tisular

Dada la limitada disponibilidad de tejido de injerto autólogo, el clínico a menudo se queda sin material suficiente para sucesivas miringoplastias. Por tanto, existe actualmente la necesidad de desarrollar tratamientos alternativos que sean rentables, no invasivos, seguros y efectivos. En este escenario, el empleo de biomateriales derivados de fuentes naturales, así como la adaptación precisa de las características y propiedades del sustituto a las necesidades específicas de la patología, se presentan como factores clave para favorecer una integración y regeneración más efectivas. Es por ello que desde los grupos de investigación en "Células madre y envejecimiento" y "Otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello" del Instituto de Investigación Sanitaria BioGipuzkoa, en colaboración con el grupo de investigación BioMat de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), se ha desarrollado un novedoso sustituto de la membrana timpánica (SMT).

Para el diseño del SMT se optó por una formulación basada en gelatina, al ser un biomaterial ampliamente utilizado en otología que favorece las interacciones célula-matriz y la actividad celular ^[11]. La gelatina se formuló con agar, que confiere soporte estructural ^[12]; glicerol, un plastificante que otorga flexibilidad al constructo ^[13]; y lactosa, que reticula químicamente con la gelatina ^[14]. Dicha formulación fue recientemente registrada en la Oficina Europea de Patentes (n.º 24382019.8). El film resultante demostró propiedades combinadas de hidratación y semipermeabilidad que favorecen la proliferación, migración y el correcto funcionamiento tanto de las células epidérmicas como de los fibroblastos, garantizando así un microentorno propicio para la regeneración timpánica efectiva ^[15].

El SMT presenta superficie rugosa, lo que fomenta la interacción célula-biomaterial. El anclaje mecánico al soporte favorece el crecimiento y proliferación celular. Asimismo, la rugosidad superficial es ventajosa para promover la adhesión al tejido circundante durante la colocación quirúrgica, por lo que postulamos que la técnica de implantación mejorará la accesibilidad para los clínicos y minimizará las molestias para los pacientes. El biomaterial es transparente, lo que es de especial interés en

el contexto otológico ya que posibilita la observación de estructuras internas del oído ^[16]. Además, el biomaterial muestra cualidades adecuadas para soportar las presiones diferenciales dentro del conducto auditivo externo. El grosor del film oscila entre 70 y 140 µm, en función del grado de hidratación, asemejándose al grosor del tímpano humano. Se ha descrito que la adecuación del grosor afecta no solo a la integración del constructo, sino a los patrones de vibración y a la eficacia de transmisión del sonido ^[17,18].

A la vista de estos resultados, se procedió a la evaluación de la funcionalidad e integración del SMT en un modelo animal de PMTc. Concretamente, se utilizó un modelo de rata en el que se indujo la cronificación mediante la aplicación de mitomicina C, seguida de perforación mecánica de la MT y administración de dexametasona ^[19]. En aquellas PMT donde se observó cronificación, se aplicó el SMT o un tratamiento control. Tras un seguimiento exhaustivo de las MT mediante observación otoscópica, se evidenció el cierre completo de las PMTc tras 10 días de tratamiento, mientras que las perforaciones no tratadas permanecieron abiertas durante todo el estudio.

El análisis histopatológico de las muestras a tiempo final demostró que los oídos tratados con el SMT se asemejaban a nivel estructural a las muestras de tejido sano, presentando la estructura trilaminar típica de la MT, con un grosor y área similares a los del control. Asimismo, se evidenció la completa ausencia de residuos del injerto, sin mostrar señales de reacciones adversas, lo que confirmaría su seguridad y biocompatibilidad.

Potencial del SMT como tratamiento de las PMTc

Como conclusión, estos resultados preliminares destacan el potencial del sustituto desarrollado para el tratamiento de las PMTc, despuntando como un dispositivo de implantación simple, seguro, rentable, manejable y potencialmente efectivo. El SMT es uno de los dos productos que la Unidad de Terapias Avanzadas del IIS BioGipuzkoa-Hospital Universitario Donostia tiene previsto llevar a fases clínicas en los próximos años en el ámbito del Consorcio Estatal en Red para el desarrollo de Medicamentos de Terapias Avanzadas (CERTERA), gracias a la financiación obtenida específicamente para ello por parte del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

El Consorcio CERTERA es una infraestructura científico-técnica de I+D+I en red orientada al desarrollo de medicamentos de terapia avanzada desde los entornos académicos hasta los ensayos clínicos en fases precoces (pre-comerciales).

Agradecimientos

Este trabajo se ha desarrollado gracias a la financiación obtenida de las siguientes convocatorias competitivas: (a) Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2021-124294OB-C22; MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER), co-financiado por la Unión Europea; (b) Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), "CERT22/00032", "PI22/01247" y "PT23/00142", co-financiadas por la Unión Europea; (c) Diputación Foral de Gipuzkoa; y (d) Departamento de Salud (20BU206; 19BU203), Departamento de Economía y Competitividad (ZE-2022/00021 y ZE-2020/00021) y Departamento de Educación, Universidades e Investigación (IT1658-22; PRE_2019_1_0031) del Gobierno Vasco.

Referencias

1. A.S. Kim, J.F. Betz, N.S. Reed, B.K. Ward, C.L. Nieman, Prevalence of Tympanic Membrane Perforations Among Adolescents, Adults, and Older Adults in the United States, *Otolaryngol.-Head Neck Surg.* 167 (2022) 356–358. <https://doi.org/10.1177/01945998211062153>.
2. N. Dolhi, A.D. Weimer, Tympanic Membrane Perforations, in: StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557887/> (accessed June 1, 2023).
3. F.H. A. T., R. Prasad K. U., A clinical study of traumatic tympanic membrane perforation, *Int J Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 7 (2021) 1668. <https://doi.org/10.18203/issn.2454-5929.ijohns20213903>.
4. L. Castelhana, F. Correia, T. Colaço, L. Reis, P. Escada, Tympanic membrane perforations: the importance of etiology, size and location, *Eur Arch Otorhinolaryngol* 279 (2022) 4325–4333. <https://doi.org/10.1007/s00405-021-07186-6>.
5. M.E. Jellinge, S. Kristensen, K. Larsen, Spontaneous closure of traumatic tympanic membrane perforations: observational study, *J. Laryngol. Otol.* 129 (2015) 950–954. <https://doi.org/10.1017/S0022215115002303>.
6. Z.-C. Lou, Y.-M. Tang, J. Yang, A prospective study evaluating spontaneous healing of aetiology, size and type-different groups of traumatic tympanic membrane perforation: Factors affecting spontaneous healing of traumatic tympanic membrane perforation, *Clinical Otolaryngology* 36 (2011) 450–460. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2011.02387.x>.
7. P.L. Santa Maria, S.L. Redmond, M.D. Atlas, R. Ghassemifar, Histology of the healing tympanic membrane following perforation in rats: Tympanic Membrane Healing Histology, *The Laryngoscope* 120 (2010) 2061–2070. <https://doi.org/10.1002/lary.20998>.
8. S.W. Kim, J. Kim, H. Seonwoo, K.-J. Jang, Y.J. Kim, H.J. Lim, K.-T. Lim, C. Tian, J.H. Chung, Y.-H. Choung, Latent progenitor cells as potential regulators for tympanic membrane regeneration, *Sci Rep* 5 (2015) 11542. <https://doi.org/10.1038/srep11542>.
9. M. Nardone, R. Sommerville, J. Bowman, G. Danesi, Myringoplasty in Simple Chronic Otitis Media: Critical Analysis of Long-Term Results in a 1,000-Adult Patient Series, *Otology & Neurotology* 33 (2012) 48–53. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e31823dbc26>.
10. B.C.A. Van Stekelenburg, M.C.J. Aarts, Determinants influencing success rates of myringoplasty in daily practice: a retrospective analysis, *Eur Arch Otorhinolaryngol* 276 (2019) 3081–3087. <https://doi.org/10.1007/s00405-019-05611-5>.
11. M.C. Echave, L.S. Burgo, J.L. Pedraz, G. Orive, Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering, *CPD* 23 (2017). <https://doi.org/10.2174/0929867324666170511123101>.
12. M.A. Salati, J. Khazai, A.M. Tahmuri, A. Samadi, A. Taghizadeh, M. Taghizadeh, P. Zarrintaj, J.D. Ramsey, S. Habibzadeh, F. Seidi, M.R. Saeb, M. Mozafari, Agarose-Based Biomaterials: Opportunities and Challenges in Cartilage Tissue Engineering, *Polymers* 12 (2020) 1150. <https://doi.org/10.3390/polym12051150>.
13. M.G.A. Vieira, M.A. Da Silva, L.O. Dos Santos, M.M. Beppu, Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review, *European Polymer Journal* 47 (2011) 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>.
14. A. Etxabide, R.D.C. Ribeiro, P. Guerrero, A.M. Ferreira, G.P. Stafford, K. Dalgarno, K. De La Caba, P. Gentile, Lactose-crosslinked fish gelatin-based porous scaffolds embedded with tetrahydrocurcumin for cartilage regeneration, *International Journal of Biological Macromolecules* 117 (2018) 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.154>.
15. R. Xu, H. Xia, W. He, Z. Li, J. Zhao, B. Liu, Y. Wang, Q. Lei, Y. Kong, Y. Bai, Z. Yao, R. Yan, H. Li, R. Zhan, S. Yang, G. Luo, J. Wu, Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement, *Sci Rep* 6 (2016) 24596. <https://doi.org/10.1038/srep24596>.
16. M. Aleemardani, Z. Bagher, M. Farhadi, H. Chahsetareh, R. Najafi, B. Eftekhari, A. Seifalian, Can Tissue Engineering Bring Hope to the Development of Human Tympanic Membrane?, *Tissue Engineering Part B: Reviews* 27 (2021) 572–589. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2020.0176>.
17. S. Van Der Jeught, J.J.J. Dirckx, J.R.M. Aerts, A. Bradu, A.G. Podoleanu, J.A.N. Buytaert, Full-Field Thickness Distribution of Human Tympanic Membrane Obtained with Optical Coherence Tomography, *JARO* 14 (2013) 483–494. <https://doi.org/10.1007/s10162-013-0394-z>.
18. X. Yao, B.M. Teh, H. Li, Y. Hu, J. Huang, C. Lv, S. Bu, M. Zheng, Y. Shen, Acellular Collagen Scaffold With Basic Fibroblast Growth Factor for Repair of Traumatic Tympanic Membrane Perforation in a Rat Model, *Otolaryngol.-Head Neck Surg.* 164 (2021) 381–390. <https://doi.org/10.1177/0194599820938345>.
19. T. Esteban, N.M. Atucha, J.M. Moraleda, J. García-Estañ, C.L. Insausti, J. Moraleda-Deleyto, Chronic model of tympanic perforation in rats with mitomycin C and dexamethasone, *Journal of Otology* 14 (2019) 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.joto.2018.11.002>.