



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, OFTALMOLOGÍA, OTORRINOLARINGOLOGÍA Y
FISIOTERAPIA

TESIS DOCTORAL:

MICROESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN MINERAL DEL YUNQUE NORMAL Y PATOLÓGICO

Estudio mediante FTIR y SEM-EDX

Presentada por David Herrero Calvo para optar al grado de
doctor por la Universidad de Valladolid.

Dirigida por:

Dr. Luis Ángel Vallejo Valdezate

Dr. Francisco Javier Martín Gil

Valladolid, 2015

A mi familia

■ agradecimientos

No quisiera desaprovechar esta ocasión para agradecer a todas aquellas personas que con su trabajo, su apoyo y su compañía han conseguido alentar a este doctorando para lograr terminar su trabajo.

Gracias al Doctor Luis Ángel Vallejo Valdezate por animarme a elegir la Otorrinolaringología como profesión, por compartir sus conocimientos, por guiarme en el camino profesional y por confiar en mí todos los días.

Gracias al Doctor Francisco Javier Martín Gil por avivar la curiosidad científica, por despertar el afán investigador, por sus consejos de sabio y por enseñarme la importancia de la Química como herramienta para conocer el mundo que nos rodea.

Gracias al Profesor Luis María Gil-Carcedo por darme la oportunidad de formarme a su lado y por la confianza que siempre depositó en mí.

Gracias a todos los compañeros del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid por su colaboración durante todos estos años. Y, en especial, gracias a mis compañeros de residencia por compartir conmigo grandes momentos y experiencias.

Gracias a la Unidad de Apoyo a la Investigación del Hospital Río Hortega, a los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante y a la Unidad de Microscopía del Parque Científico de la Universidad de Valladolid por colaborar con su trabajo a la realización de esta tesis.

Gracias a los pacientes que, con su colaboración desinteresada en medio del sufrimiento de la enfermedad, impulsan día a día la investigación científica.

Por último –pero ante todo– gracias a mis padres por darme todo lo que han tenido para llegar hasta donde estoy. Y gracias a mis hermanos por acompañarme en este viaje.

Los trabajos de esta tesis han sido realizados a través de dos proyectos de investigación:

- Proyecto de Investigación en Biomedicina, Biotecnología y Ciencias de la Salud de la Gerencia Regional de Salud de Castilla y León (SACYL), 2007. Investigador principal: Francisco Javier Martín Gil.
- Proyecto de Investigación HVR02A08 de la Consejería de Educación de Castilla y León, 2008–2010. Investigador Principal: Luis Ángel Vallejo Valdezate.



■ Índice

Abreviaturas	15
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1 EL OÍDO MEDIO HUMANO	19
1.1.1 La cadena osicular	20
1.1.1.1 Los huesos de la cadena. Martillo, yunque y estribo	20
1.1.1.2 Las articulaciones de la cadena	23
1.1.2 Vascularización del oído medio	24
1.1.2.1 Vascularización del yunque	24
1.1.3 La mucosa del oído medio	25
1.1.4 El proceso de osificación en el oído medio	25
1.2 ESTRUCTURA DEL HUESO	27
1.2.1 Estructura macroscópica del hueso	27
1.2.1.1 Hueso cortical o compacto	27
1.2.1.2 Hueso esponjoso o trabecular	27
1.2.2 Estructura microscópica del hueso	28
1.2.2.1 Hueso no laminar, inmaduro o primario	28
1.2.2.2 Hueso laminar, lamelar, maduro o secundario	28
1.2.3 Componentes celulares del hueso	30
1.2.3.1 Osteoblastos	30
1.2.3.2 Osteocitos	30
1.2.3.3 Osteoclastos	30
1.2.3.4 Células de revestimiento óseo	31
1.2.4 Componentes extracelulares del hueso	32
1.2.5 Remodelación del tejido óseo	34
1.3 PATOLOGÍA CRÓNICA DEL OÍDO MEDIO	36
1.3.1 Otitis Media Crónica (OMC)	36
1.3.1.1 Otitis Media Serosa o secretora	36
1.3.1.2 Otitis Media Crónica Supurada	37
1.3.2 Colesteatoma	39
1.4 MÉTODOS ESPECTROGRÁFICOS	41
1.4.1 Espectrometría de Infrarrojos. FTIR	42
1.4.1.1 Reflexión total atenuada	45
1.5 MÉTODOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	47
1.5.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y análisis por energía dispersa de rayos X (EDX)	48
1.5.1.1 Electrones secundarios	48
1.5.1.2 Electrones retrodispersados	49

1.5.1.3	Rayos X	49
2.	BASES PREVIAS	51
2.1	ESTUDIOS MEDIANTE TÉCNICAS ESPECTROGRÁFICAS	53
2.2	ESTUDIOS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	54
2.2	ESTUDIOS MEDIANTE ANÁLISIS ELEMENTAL	57
3.	HIPÓTESIS	61
4.	OBJETIVOS	65
5.	MATERIAL Y MÉTODOS	69
5.1	RECOGIDA DE MUESTRAS	69
5.2	PROCESADO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	69
5.3	RECOGIDA DE DATOS	71
5.4	ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIO ÓPTICO	71
5.5	ESTUDIO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS (FTIR)	72
5.6	ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ANÁLISIS DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (SEM-EDX)	75
5.6.1	Estudio SEM-EDX de yunque normal y patológico	75
5.6.2	Estudio EDX de la relación Ca/P en el hueso yunque	76
5.6.3	Estudio EDX de la relación Ca/P en la porción distal de la rama larga del yunque	77
5.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	78
5.8	BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA	78
6.	RESULTADOS	81
6.1	ESTUDIO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS (FTIR)	81
6.1.1	Estudio global	81
6.1.1.1	Variables demográficas: edad y sexo	81
6.1.1.2	Variables topográficas: fragmento	82
6.1.1.3	Variables clínicas: patología	83
6.1.1.4	Variables químicas: Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato	84
6.1.2	Estudio sobre yunque normal	88
6.1.2.1	Variables demográficas: edad y sexo	88
6.1.2.2	Variables topográficas: fragmento	89
6.1.2.3	Variables químicas: Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato	89
6.1.3	Estudio sobre hueso cortical	93
6.1.4	Estudio sobre Colesteatoma	94
6.1.4.1	Variables demográficas: edad y sexo	94
6.1.4.2	Variables topográficas: fragmento	95
6.1.4.3	Variables clínicas: evolución y grado de destrucción	95
6.1.4.4	Variables químicas: Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato	96
6.1.5	Estudio sobre Otitis Media Crónica	100
6.1.5.1	Variables demográficas: edad y sexo	100

6.1.5.2	Variables topográficas: fragmento	101
6.1.5.3	Variables clínicas: evolución, diagnóstico secundario	102
6.1.5.4	Variables químicas: Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato	103
6.2	ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ANÁLISIS DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (SEM-EDX)	105
6.2.1	Estudio de la relación Ca/P en el hueso yunque	105
6.2.1.1	Variables demográficas: edad y sexo	105
6.2.1.2	Variables clínicas: patología	105
6.2.1.3	Variables químicas: relación Calcio/Fósforo	106
6.2.2	Estudio de la relación Ca/P en la porción distal de la rama larga del yunque	108
6.2.2.1	Variables demográficas: edad y sexo	108
6.2.2.2	Variables clínicas: patología	109
6.2.2.3	Variables químicas: relación Calcio/Fósforo	110
6.2.3	Estudio SEM-EDX del yunque normal	112
6.2.3.1	Análisis de superficie	112
6.2.3.2	Pruebas EDX	122
6.2.4	Estudio SEM-EDX del yunque en Colesteatoma	123
6.2.4.1	Análisis de superficie	124
6.2.4.2	Pruebas EDX	130
6.2.5	Estudio SEM-EDX del yunque en Otitis Media Crónica	131
6.2.5.1	Análisis de superficie	132
6.2.5.2	Pruebas EDX	139
7.	DISCUSIÓN	143
7.1	ESTUDIO MEDIANTE FTIR	143
7.2	ESTUDIO MEDIANTE EDX	144
7.3.	ESTUDIO SOBRE YUNQUE NORMAL	146
7.3.1	Estructura	146
7.3.2	Vascularización	147
7.3.3	Estudio de superficie	148
7.3.4	Remodelación	149
7.3.5	Cambios relacionados con la edad	151
7.4.	ESTUDIO SOBRE YUNQUE EN COLESTEATOMA	153
7.5.	ESTUDIO SOBRE YUNQUE EN OTITIS MEDIA CRÓNICA	157
8.	CONCLUSIONES	163
9.	BIBLIOGRAFÍA	167

■ abreviaturas

A	absorbancia.
Ap.	apófisis.
AR	artritis reumatoide.
ATR	Attenuated total reflectance (Reflexión Total Atenuada).
BSED	Backscattered Electron Detection (Detección de Electrones Retrodispersados).
C/P	carbonato/fosfato, carbonatación.
Ca/P	relación calcio/fósforo.
DE	desviación estándar.
EDX	Energy Dispersive X-Ray Analysis (Análisis de Energía Dispersa de Rayos X).
Fig	figura.
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier).
HAP	hidroxiapatita.
IC	intervalo de confianza.
IR	infrarrojo.
M/m	Mineral/matriz, mineralización.
NS	no significativo.
OMC	Otitis Media Crónica.
PAC	Proceso Adhesivo Crónico.
RI	rango intercuartílico.
SE	secondary electrons (electrones secundarios).
SEM	Scanning Electron Microscopy (Microscopía Electrónica de Barrido).
T	transmitancia.
TNF α	factor de necrosis tumoral alfa.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.

■ introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL OÍDO MEDIO HUMANO

Un prerrequisito para el desarrollo de la función auditiva es la habilidad para la conversión o transducción de ondas de presión sonora en un desplazamiento de fluidos a través de un mecanismo de amplificación y ajuste de impedancia [1]. Estas funciones son proporcionadas por el conducto auditivo externo, la trompa de Eustaquio y el sistema timpano–osicular.

El oído medio es una cavidad aérea compleja situada en el seno del hueso temporal que contiene una serie de estructuras óseas, la cadena de huesecillos: martillo, yunque y estribo. Además, alberga un sistema musculo–tendinoso que se acopla a dicha cadena. Entre el oído medio y el conducto auditivo externo se sitúa la membrana timpánica [2], tal y como se representa en la figura 1 [3].

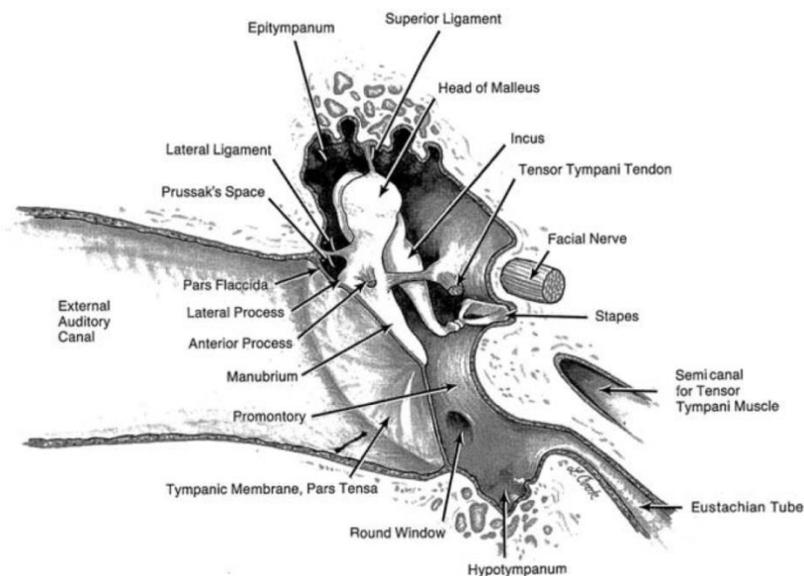


Figura 1. Modelo esquemático del oído medio (Deaver, 1901).

Los huesecillos que componen la cadena transmisora–transductora del sonido del oído medio tienen un origen embriológico desigual. El martillo y el yunque proceden del primer arco branquial, al igual que el músculo del martillo y la tercera rama del nervio trigémino. Por el contrario, el estribo deriva del segundo arco branquial, como también lo hacen el músculo del estribo y el nervio facial. Esta diferenciación mesodérmica entre primer y segundo arco branquial tiene lugar en el transcurso del segundo mes del desarrollo [4, 5].

1.1.1 La cadena osicular

1.1.1.1 Los huesos de la cadena. Martillo, yunque y estribo

Martillo

Es el hueso más lateral y anterior de la cadena, dispuesto de superior a inferior por las siguientes partes: cabeza, cuello, apófisis lateral, apófisis anterior y manubrio o mango. Se trata del osículo más largo de los tres, con entre 7 y 9 mm de longitud. El mango del martillo se encuentra firmemente adherido a la membrana timpánica, especialmente en su porción más inferior, en la que las fibras del tímpano se dividen para rodearlo en el umbo [6, 7].

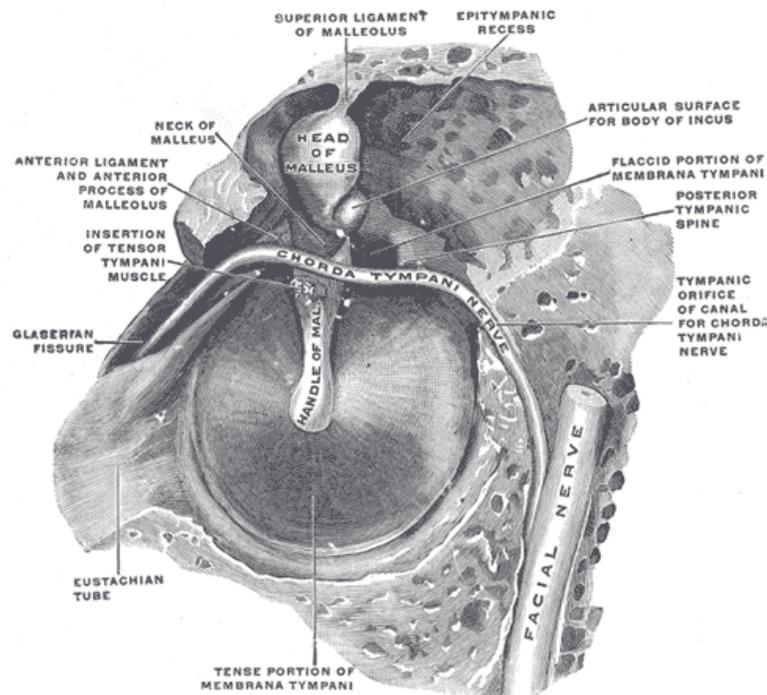


Figura 2. Vista del martillo y el tímpano desde el interior de la caja timpánica (Gray H, 1918).

El martillo está suspendido por cinco ligamentos, una articulación, el tendón del músculo del martillo y la membrana timpánica. Tres de los cinco ligamentos tienen una función exclusivamente de soporte, estando fuera del eje de rotación osicular. El ligamento maleolar anterior, junto con la apófisis anterior del martillo, está en el eje de rotación del martillo. El ligamento maleolar posterior es el margen inferior del repliegue maleolar posterior y une el cuello del martillo con la espina pretimpánica. La membrana timpánica une el manubrio al surco timpánico.

La cápsula de la articulación incudomaleolar también contribuye a la estabilidad de este osículo, poseyendo dos condensaciones en sus fibras denominadas ligamentos incudomaleolares anterior y posterior [8].

El tendón del músculo del martillo o tensor del tímpano se extiende desde el proceso cocleariforme lateralmente para alcanzar el cuello y el manubrio del martillo. La función de este músculo es tirar del manubrio medialmente y así ejercer tensión sobre la membrana timpánica en respuesta a sonidos de alta intensidad [9].

Yunque

El huesecillo más grande de la cadena se compone de cuerpo, apófisis corta, apófisis larga (*crus longum*) y apófisis lenticular. El cuerpo del yunque descansa en el epitímpano junto a la cabeza del martillo. El movimiento del yunque está íntimamente relacionado con el del martillo gracias a una articulación en silla de montar [10, 11].

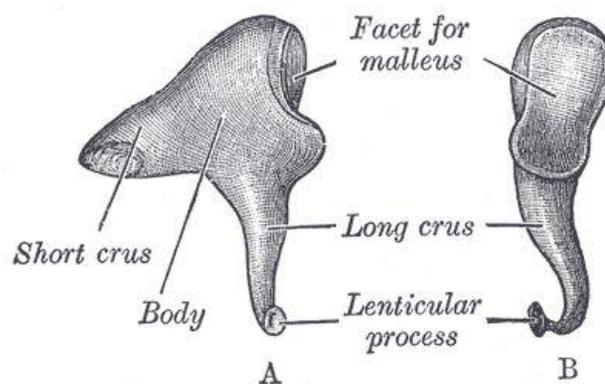


Figura 3. Vista medial y anterior de un yunque izquierdo (Gray H, 1918).

La apófisis corta del yunque se extiende posteriormente ocupando la *fossa incudis*, en algunos casos, esta apófisis puede ser larga y esbelta. La apófisis larga discurre hacia abajo paralela al manubrio, para terminar en la apófisis lenticular. Clásicamente se ha descrito que la superficie convexa de esta apófisis lenticular se articula con la superficie cóncava de la cabeza del estribo en una articulación diartrodica, pero en numerosos estudios recientes se ha comprobado que en realidad se trata de una articulación plana [12]. La configuración seccional horizontal de la apófisis larga del yunque es circular, a diferencia del manubrio del martillo, que es ovoidea.

Existen tres ligamentos que sostienen al yunque. El ligamento posterior del yunque asegura la apófisis corta en la *fossa incudis*. En la parte anterior, los ligamentos incudomaleolares medial y lateral sostienen el cuerpo del yunque con la cabeza del martillo.

La calcificación del ligamento posterior del yunque es un hallazgo observado en ocasiones, pero la consecuencia que ello tiene en la conducción del sonido no ha sido establecida. Algunos

autores añaden a este grupo un cuarto ligamento en posición más superior, aunque su existencia no es siempre demostrable y la mayor parte de las veces se halla tan solo un repliegue mucoso [13].

Tras el nacimiento, tanto el martillo como el yunque poseen médula ósea en su interior que se oblitera posteriormente y, raramente, puede encontrarse también en adultos [14].

Es habitual encontrar procesos de resorción y neumatización en la apófisis larga del yunque, en forma de horadaciones o cavernas [15].

Estribo

Es el hueso más pequeño y medial de la cadena. Posee una cabeza, una platina o *basis stapedis* y dos ramas o *crura*. La *crus* anterior es más recta y más estrecha que la posterior. Existe una zona irregular cerca de la cara superior de la *crus* posterior en donde se ancla el tendón del músculo del estribo. El área delimitada por los arcos cóncavos entre ambas *crura* se denomina foramen obturador y en ocasiones está ocupado por una fina capa de mucosa [16].

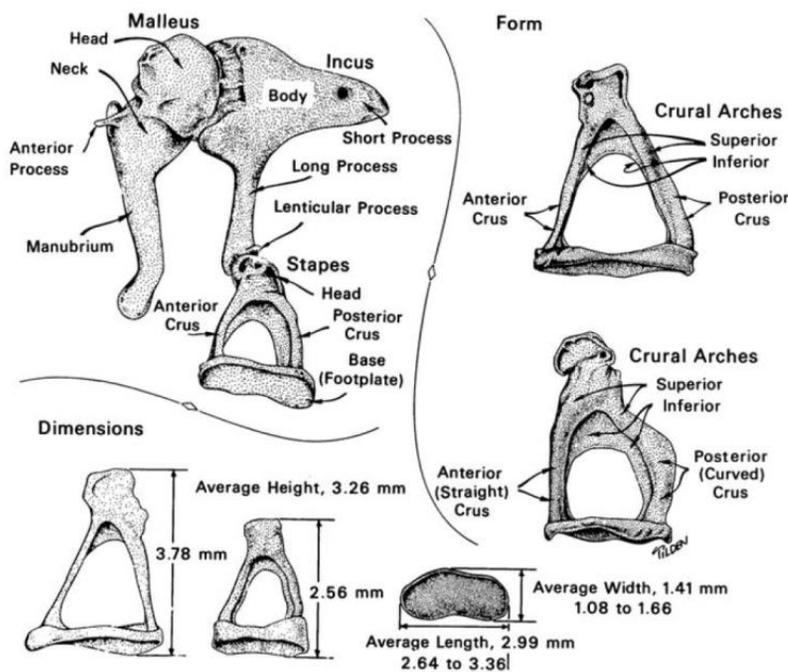


Figura 4. Forma y dimensiones del estribo (Anson BJ, 1967).

La platina, en conjunto con el ligamento anular, sella la ventana oval. En la cara lateral de la platina puede existir una cresta conocida como *crista stapedis*. La superficie vestibular o medial puede ser plana, levemente cóncava o levemente convexa. La cabeza se articula con la apófisis lenticular del yunque y puede tener una pequeña prolongación para la unión del tendón del músculo estapedial [17].

1.1.1.2 Las articulaciones de la cadena

Dos articulaciones reales unen los tres huesecillos del oído medio. Las superficies articulares están revestidas de cartílago y en ocasiones puede existir un disco intercartilaginoso. Cada articulación tiene una cápsula compuesta de fibras ligamentosas que se originan del periostio de sendos huesos y está forrada de una membrana sinovial. Una última unión móvil entre la platina del estribo y la ventana oval completan el sistema.

Mientras que las articulaciones osiculares son suficientemente fuertes para resistir movimientos fisiológicos, se ven fácilmente alteradas con el trauma directo sobre el oído medio, fracturas del hueso temporal o manipulaciones quirúrgicas [18]. Los osículos pueden luxarse parcialmente, en cuyo caso la cápsula se retuerce y el desplazamiento de los huesos es parcial, o totalmente, con la rotura completa de dicha cápsula y la desarticulación de ambos huesecillos [17].

Articulación incudo-maleolar

La unión entre martillo y yunque es una articulación sinovial, diartródica que no soporta peso. Se describe generalmente como en forma de silla de montar aunque algunos autores la definen como un engranaje en mordaza [8]. Una cápsula de tejido elástico rodea el margen articular y existe un disco interarticular. Dicha cápsula posee tres capas: la membrana sinovial que tapiza la cavidad, la membrana mucosa del oído medio y una lámina intermedia de tejido fibroso. La cápsula no es uniforme: en la zona superior, la cara medial posee más longitud y densidad de fibras, constituyendo el ligamento incudomaleolar medial. En la zona más inferior, la cara lateral de la cápsula es más densa; es el ligamento incudomaleolar lateral. Estas variaciones en la longitud, densidad y espesor de las fibras ayudan a controlar la interacción de los dos huesos.

El cartílago articular posee dos láminas. La capa más profunda, adyacente al tejido óseo, muestra la formación de hueso endocondral así como transformación ósea directa de su matriz cartilaginosa. Este último proceso es característico del cartílago secundario o condroide, que deriva del hueso membranoso [19]. La capa superficial está formada por cartílago primitivo, producido y mantenido por la membrana sinovial; es considerado análogo al cartílago epifisario.

Articulación incudo-estapedial

Se trata de una articulación sinovial, diartródica, que no soporta peso y que une la convexidad de la apófisis lenticular del yunque con la concavidad de la cabeza del estribo. En ocasiones, la apófisis lenticular del yunque puede encontrarse independiente como un hueso accesorio [20]. Las fibras de la cápsula poseen mayor longitud que las de la articulación incudomaleolar, aunque con la misma densidad [8]. En la cara inferior de la articulación, las fibras capsulares posteriores en ocasiones emergen junto con las fibras del tendón del músculo estapedial, de manera que la contracción de este músculo no sólo tira de la cabeza del estribo hacia atrás, sino que también lo hace de la apófisis larga del yunque [17].

1.1.2 Vascularización del oído medio

El suministro de sangre del oído medio se deriva de: la arteria carótida externa a través de la arteria faríngea ascendente, la arteria occipital (directamente ya través de su rama auricular posterior), y la arteria maxilar interna y sus ramas (la arteria meníngea media y la arteria meníngea accesoria), de la arteria carótida interna, y de la arteria basilar a través de la rama subarcuata de la arteria laberíntica (auditiva interna). A partir de estas tres raíces principales nacen las arterias que proporcionan la amplia red vascular anastomótica para el oído medio y la mastoides [21-24].

1.1.2.1 Vascularización del yunque

La arteria timpánica anterior nace en la zona mandibular de la arteria maxilar interna y entra en la fisura petrotimpánica, donde se divide en tres ramas principales. Su rama posterior proporciona la red arterial de la apófisis larga del yunque, la apófisis lenticular, la articulación incudoestapedial y la cabeza del estribo. Las ramas posterior y superior de la arteria timpánica anterior se anastomosan para formar la red vascular del martillo y yunque.

La rama osicular de la arteria timpánica anterior entra en el oído medio bien con el nervio cuerda del tímpano o a través de su propio canal, dividiéndose en dos vasos responsables de la mayoría del aporte sanguíneo para el martillo y el yunque. La rama maleolar discurre por la mucosa del ligamento maleolar lateral y entra en el martillo en el foramen nutricio, localizado en la zona anterolateral de su cuello. También da una ramita para la apófisis lateral del martillo y, de forma variable, puede anastomosarse con la rama del yunque. La rama del yunque atraviesa habitualmente la pared epitimpánica lateral en un repliegue mucoso para entrar en el foramen nutricio del yunque, localizado en la zona lateral del cuerpo. Habiendo atravesado sus respectivos canales nutricios, las ramas del martillo y del yunque forman una compleja red vascular que se ramifica por todo el osículo correspondiente [25-27].

1.1.3 La mucosa del oído medio

La mucosa del oído medio representa una modificación de la mucosa respiratoria. Las paredes óseas de la caja están revestidas de una mucosa muy delgada, de coloración gris-rosada, adherida al hueso subyacente. Este tejido de revestimiento de las cavidades timpánicas y accesorias es una mucosa con caracteres especiales, que se parece mucho al tipo de revestimiento endostal, sin ser realmente un endostio, por lo que puede ser considerada como un verdadero revestimiento mucoperiostal con todas las propiedades inherentes a su doble carácter de formación epitelial y perióstica [28]. Está formada por dos capas:

- Epitelio, es la capa más superficial, formado por varios tipos de células que se apoyan en una membrana basal. La constitución del epitelio según la región.
- Cubierta conjuntiva, corion, o lámina propia, es la capa profunda de naturaleza conjuntiva, de grosor muy variable según la topografía y la edad.

Según los estudios de Hentzer [29], se pueden distinguir hasta cinco tipos de células en la mucosa del oído medio, mastoides y trompa: células no ciliadas sin gránulos de secreción, células no ciliadas con gránulos de secreción, células ciliadas, células intermedias y células basales.

1.1.4 El proceso de osificación en el oído medio

El hueso es un tejido conectivo, cuya matriz intercelular se ve modificada por el depósito de material calcáreo. Se conocen dos tipos de desarrollo óseo, dependiendo del tipo de tejido conectivo en el que tenga lugar. En el mesénquima se produce una osificación intramembranosa, mientras que en el cartílago previamente establecido tiene lugar una osificación intracartilaginosa. La osificación intramembranosa es un método que aparece en los huesos planos del cráneo, la mandíbula y la clavícula. El primer paso consiste en una condensación del mesénquima y un incremento de la vascularización en la región donde se va a desarrollar el hueso. Algunas células del tejido conectivo se diferencian a osteoblastos y depositan material osteoide, una mezcla homogénea de fibras de colágeno y matriz. Mediante la calcificación, el osteoide se convierte en hueso. Inicialmente, los osteoblastos forman una membrana envolvente en la superficie del hueso: la capa osteogénica. Es en la superficie interna de esta capa donde tiene lugar el depósito calcáreo. Algunas de las células de esta capa son atrapadas por la matriz del hueso convirtiéndose en osteocitos que ocupan sus correspondientes lagunas. El remanente de la capa osteogénica se mueve desde el epicentro inicial con el depósito de las sucesivas capas de hueso. El hueso formado se insinúa entre los canales vasculares del mesénquima primitivo y consiste en espículas de hueso atravesadas por múltiples vasos

sanguíneos con su correspondiente tejido perivascular. Este tejido óseo existe durante un corto período de tiempo, tras el cual sufre una reabsorción selectiva y nuevos depósitos de material óseo, que tendrán como objetivo el crecimiento del hueso.

Existen tres tipos de hueso intracartilaginoso: el pericondral, el endocondral o encondral y el intracondral. Los dos primeros se encuentran en la mayoría de los huesos largos del esqueleto; en cambio, el hueso intracondral es exclusivo de la cápsula ótica y los huesecillos del oído medio. La formación de hueso intracartilaginoso se diferencia de la intramembranosa en que tiene lugar en un modelo de cartílago hialino embrionario preexistente. En las primeras fases del desarrollo del hueso encondral, el mesénquima embrionario se diferencia primero en precartilago y luego en cartílago hialino verdadero, que imita la configuración final del adulto. El crecimiento en tamaño tiene lugar en esos modelos cartilagosos y, una vez que alcanza la estructura y talla del adulto, comienza el proceso de osificación. Las células cartilaginosas se hipertrofian y las sales del calcio se depositan en su matriz intracelular, formando cartílago calcificado.

Al mismo tiempo, el tejido conectivo (pericondrio) que rodea al cartílago se combina gradualmente con las células cartilaginosas de la capa condral. Cuando comienza la osificación, la capa profunda del pericondrio se diferencia en una capa de osteoblastos que depositan hueso pericóndrico en el cartílago subyacente. Con la aparición de hueso pericondral, el pericondrio es ahora propiamente periostio. El hueso periostal envuelve a la cápsula ótica que se está osificando. Al tiempo que se forma el hueso pericóndrico, numerosos brotes osteogénicos altamente vascularizados entran en la cápsula ótica para llegar hacia las lagunas cartilaginosas para agrandarlas y retirar las células cartilaginosas. Algunas de las células de los brotes osteogénicos se diferencian en osteoblastos que depositan hueso en las lagunas cartilagosas agrandadas, retirando parte del cartílago calcificado. Las islas de cartílago calcificado que permanecen se denominan hueso intracondral.

Los osteoblastos forman una membrana que envuelve las islas de cartílago calcificado y depositan hueso encondral o de reemplazo. La fina capa de hueso perióstico que forma la superficie interna de la cápsula ótica se conoce comúnmente como capa endostal. Se desarrolla una vez que la cápsula ótica ha sido ampliamente reemplazada por los brotes osteogénicos y se ha formado el hueso intracondral [17, 30, 31].

1.2 ESTRUCTURA DEL HUESO

El hueso es un tejido denso y heterogéneo constituido por células rodeadas de una matriz de componentes orgánicos (fibras de colágeno, lípidos, péptidos, proteínas, glicoproteínas, polisacáridos y citratos) e inorgánicos (fosfatos cálcicos, carbonatos, sodio, magnesio, flúor) [32]. Variaciones en la estructura y los componentes del tejido óseo dan lugar a distintos tipos de hueso que se diferencian por sus características mecánicas y funcionales. Este tejido conjuntivo mineralizado duro y elástico, que proporciona soporte y protección a los órganos, es también responsable del mantenimiento de la homeostasis mineral y fuente de células hematopoyéticas. El hueso está involucrado en un ciclo constante de resorción y formación de nuevo tejido (remodelado o *turnover* óseo) controlado por reguladores hormonales y las necesidades mecánicas del tejido en cuestión.

1.2.1 Estructura macroscópica del hueso

Atendiendo a las características macroscópicas, se diferencian dos tipos de hueso: el hueso compacto y el hueso trabecular.

1.2.1.1 Hueso cortical o compacto

El tejido óseo cortical o compacto corresponde aproximadamente al 80 % del volumen total del hueso. Es el que predomina en el esqueleto apendicular, conformando la diáfisis de los huesos, adoptando la forma de un cilindro hueco para contener la médula ósea. Sus particulares características lo hacen resistente a las fuerzas de flexión, torsión y cizallamiento.

1.2.1.2 Hueso esponjoso o trabecular

Se encuentra en continuidad con el tejido compacto y representa alrededor del 20 % del volumen total del hueso. El hueso esponjoso posee una red de espículas ramificadas o trabéculas que limitan espacios ocupados por la médula ósea. Se encuentra en el esqueleto axial, las epífisis y metáfisis de los huesos largos y en los huesos planos. El hueso esponjoso tiene la capacidad de resistir fuerzas de comprensión y tensión. Las propiedades mecánicas de este tipo de hueso dependen del grado de porosidad y la arquitectura de las trabéculas. Ambos factores varían según el sitio anatómico y la edad [33].

1.2.2 Estructura microscópica del hueso

A nivel microscópico, el hueso se puede dividir en dos tipos distintos: hueso laminar y hueso no laminar.

1.2.2.1 Hueso no laminar, inmaduro o primario

Se caracteriza por la disposición aleatoria de las fibras de colágeno. Esta característica hace que sea un hueso mecánicamente débil. Se puede encontrar en el período embrionario, en el que se forman los primeros huesos en lo que se conoce como osificación primaria. En la mayoría de esos huesos tendrá lugar un proceso denominado osificación secundaria a través del cual el tejido se transformará en hueso laminar.

Pueden diferenciarse dos tipos de hueso no laminar en relación a la colocación de las fibras de colágeno. La variedad plexiforme se caracteriza por una disposición entrelazada de las fibras y es la más frecuente en las estructuras óseas del oído. Por otra parte, las fibras pueden tender a distribuirse longitudinalmente, de forma paralela unas a otras.

Este tipo de hueso posee un mayor componente celular, especialmente osteocitos, que se distribuyen al azar sin ninguna regularidad con las fibras de colágeno ni los vasos sanguíneos. Otra característica es que está menos mineralizado, posee menos cantidad de calcio. Puede aparecer tanto en el hueso compacto como en el esponjoso o trabecular.

1.2.2.2 Hueso laminar, lamelar, maduro o secundario

En el hueso laminar las fibras de colágeno se organizan de forma paralela constituyendo láminas o lamelas. Estas estructuras, de entre 3 y 7 micras de grosor, se disponen –a su vez– paralelas entre sí pero con cambios bruscos de dirección, a modo de zigzag. Los osteocitos se suelen localizar entre una lámina y otra, por lo general, aunque pueden encontrarse en su interior.

En el hueso compacto existe una unidad estructural denominada osteona o sistema de Havers. Cada sistema es un cilindro de láminas que se dispone paralelo al eje de la diáfisis en los huesos largos. En el centro de esta osteona se encuentra el conducto de Havers o canal haversiano. Alrededor de este canal se disponen de 4 a 20 lamelas concéntricas. Llegan a tener unas 100 micras de diámetro por lo general y se observan como círculos concéntricos en los cortes transversales. La longitud de estos cilindros es variable. Además de los sistemas de Havers, las láminas pueden disponerse paralelas al periostio o al endostio y existen sistemas intersticiales que son restos de antiguas osteonas que han sido remodeladas.

Los conductos de Havers tienen unas 20 micras de diámetro, por término medio. En su interior está recubierto de endostio y contiene vasos sanguíneos, nervios y tejido conectivo. A través de estos vasos se nutren las células fundamentales del hueso, los osteocitos. La primera línea de osteocitos se abastece directamente del vaso y son los encargados de nutrir al resto de ellos a través de pequeños canalículos. Los canales haversianos se conectan entre sí a través de conductos perpendiculares u oblicuos denominados conductos de Volkmann. Éstos, al contrario que los primeros, no tienen láminas alrededor y no poseen capacidad de crecimiento.

En el hueso esponjoso las láminas se disponen paralelas entre sí y a la superficie de la trabécula, que suele tener un diámetro igual o menor a 2 milímetros. Esta característica permite nutrir a los osteocitos sin necesidad de los canales de Havers [34].

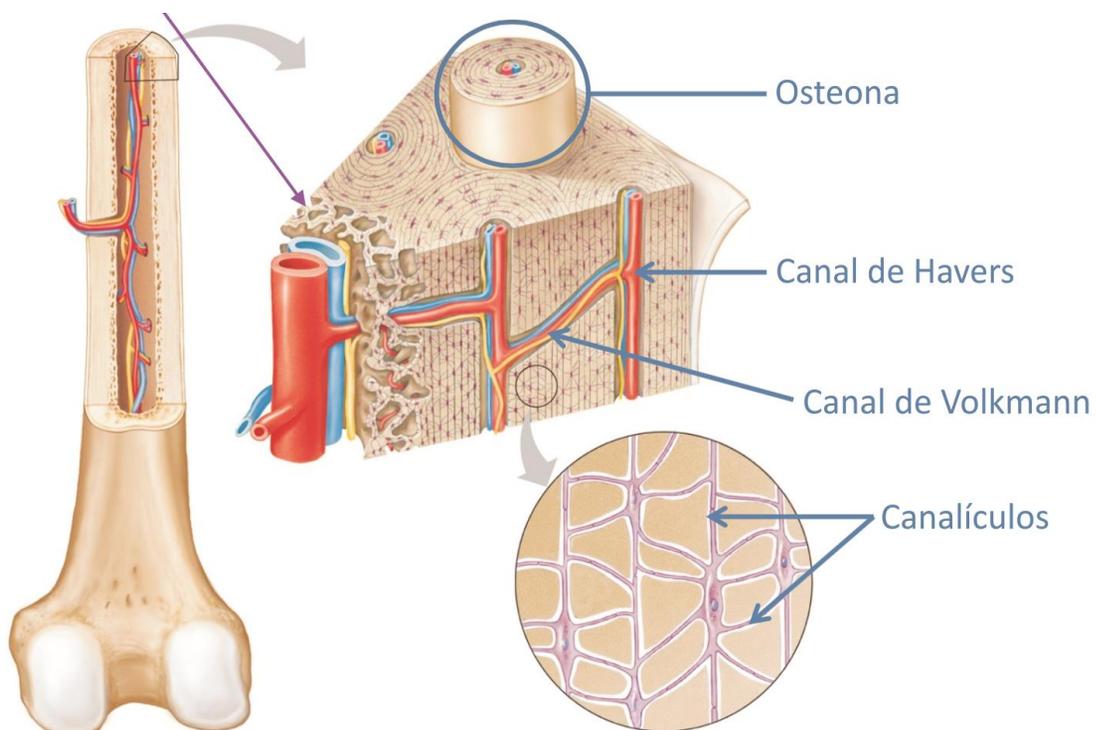


Figura 5. Representación esquemática del sistema de Havers en un hueso largo.

1.2.3 Componentes celulares del hueso

1.2.3.1 Osteoblastos

Son células cuboidales que se localizan a lo largo de la superficie del tejido óseo y suponen del 4 al 6% de la población celular del hueso. Estas células poseen un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi prominentes, al igual que numerosas vesículas secretoras, lo que habla de sus capacidades de síntesis. Los osteoblastos derivan de células mesenquimales y son responsables de la formación de los componentes orgánicos de la matriz ósea. Cuando se activan demuestran una gran actividad fosfatasa alcalina. Los osteoblastos pueden diferenciarse en osteocitos o directamente sufrir la apoptosis [35].

Además de sintetizar proteínas, el osteoblasto dirige la mineralización ósea. El tejido óseo no mineralizado se denomina "osteoides", y está formado por capas que se van sintetizando de la profundidad a la superficie, estando definidas por la distinta orientación de las fibras de colágeno en cada una de ellas. Su mineralización se realiza progresivamente desde las capas más profundas a las superficiales, tras un tiempo de maduración del osteoide. La fosfatasa alcalina es una proteína de los osteoblastos que interviene en el proceso de mineralización destruyendo un inhibidor de la misma, el pirofosfato, con lo que además aumenta la concentración local de fosfato [36].

1.2.3.2 Osteocitos

Son las células fundamentales del hueso (un 90–95%) con una esperanza de vida de más de 25 años. Se localizan en lagunas a lo largo de la matriz del hueso. Poseen largas digitaciones –o *filopodia*– que permiten su interconexión a través de pequeños canalículos. Esta comunicación celular facilita el paso de nutrientes y oxígeno desde las células más cercanas a los vasos sanguíneos a las más alejadas de ellos. Tienen la capacidad de disolver la matriz ósea para liberar calcio con el objetivo de mantener el equilibrio de homeostasis cálcica sistémica. También poseen una capacidad mecanosensitiva gracias a su especial disposición en la estructura del tejido. Transforman estímulos mecánicos en señales bioquímicas a través de un mecanismo aún no aclarado [37].

1.2.3.3 Osteoclastos

Poseen un origen totalmente distinto al osteoblasto. El osteoclasto es una célula multinucleada completamente diferenciada que se origina de células mononucleares del sistema hematopoyético. Esta diferenciación depende de muchos factores entre los que se encuentran los factores estimuladores de colonias de macrófagos que son secretados por células progenitoras mesenquimales y osteoblastos.

La función principal de los osteoclastos es la destrucción de fibras de tejido óseo, formando parte del sistema de reparación o remodelación ósea. Para esta misión, la célula adopta una morfología especial, en virtud de la cual la parte de la membrana de la célula que se pone en contacto con el tejido adopta un carácter rugoso, que en las imágenes histológicas se describe como "borde en cepillo". Dicho borde está constituido por unas microvellosidades a las que se vierten hidrogeniones y enzimas (principalmente catepsina K) con capacidad para destruir el hueso. Los hidrogeniones eliminan el componente mineral, y las enzimas desintegran el colágeno. A fin de que dichas sustancias permanezcan entre el osteoclasto y la superficie ósea desarrollando su función, en la periferia de la zona rugosa se forma un anillo cuya superficie tiene la propiedad de unirse íntimamente al hueso; el resultado es que en el interior de dicho anillo queda un espacio sellado, del que los hidrogeniones y los enzimas no pueden escapar. Tanto en la formación del anillo de actina como en la de la superficie rugosa, juega un papel fundamental el citoesqueleto de la célula. La configuración que adopta éste, además, marca el camino a unas vesículas citoplasmáticas que se dirigen a las microvellosidades para liberar en ellas su contenido y verterlo al espacio sellado, donde ejercerán su efecto osteodestructivo. En el desarrollo del osteoclasto y en su activación funcional es primordial un receptor de superficie denominado RANK. Una proteína característica de los osteoclastos es la fosfatasa ácida resistente al tartrato, cuyo papel fisiológico no está bien definido [36].

Además de la resorción de hueso, los osteoclastos están implicados en otras funciones de la homeostasis ósea, la hematopoyesis y pueden intervenir en fenómenos inmunes en procesos inflamatorios. El incremento anormal en el número y actividad de los osteoclastos, como el que ocurre en diferentes enfermedades, pueden causar un descenso de la densidad ósea y aumentar el riesgo de fracturas. Además, se les ha otorgado funciones de regulación de otras poblaciones celulares [38].

1.2.3.4 Células de revestimiento óseo

Son células aplanadas que corresponden a osteoblastos inactivos que cubren las superficies del hueso que no sufren formación ni destrucción de tejido. Su función no se conoce con exactitud pero se conoce que controlan la actividad de los osteoclastos y forman parte del proceso de remodelación ósea [39].

1.2.4 Componentes extracelulares del hueso

El tejido óseo está constituido por una fase mineral y una fase orgánica. La fase mineral está formada principalmente por cristales de fosfato de calcio, organizados en la forma cristalina conocida como hidroxapatita (HAP). Alrededor del 70% de la masa del hueso lo constituye el mineral, mientras que un 30% lo representa la matriz orgánica, compuesta en un 90% por la proteína de colágeno.

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano y se encuentra en varios tejidos conjuntivos calcificados y no calcificados. La unidad estructural del colágeno, el tropocolágeno, es una molécula rígida y alargada formada por una triple hélice de tres cadenas polipeptídicas α dispuestas sobre un eje común. Las cadenas α tienen la secuencia glicina (Gly)-X-Y. Se producen distintos tipos de colágeno mediante la combinación de distintas cantidades y secuencias de otros aminoácidos dentro de la molécula tropocolágeno. Hasta ahora, se conocen 13 tipos distintos de colágeno. El colágeno tipo I es la forma más abundante y cuenta el 90% del colágeno en el organismo. El hueso tiene mayoritariamente colágeno tipo I y una pequeña cantidad de colágeno tipo V. Los colágenos tipo I y V se organizan en fibrillas con una estriación característica que se repite cada 55–75 nm, con promedio de 64 nm. Las fibrillas tienen un diámetro entre 40 y 120 nm, con promedio de 100 nm y se organizan en haces formando las fibras de colágeno que tienen un diámetro entre 0.2 y 12 μm .

La molécula de colágeno es una superestructura altamente entrecruzada donde se depositan los cristales de hidroxapatita interactuando con las triples hélices (Figura 6). El mineral se localiza fundamentalmente entre las moléculas de colágeno. Sólo una pequeña cantidad de cristales de hidroxapatita se encuentra entre las sucesivas moléculas de tropocolágeno. Posee un patrón de uniones intermoleculares (*crosslinks*) específico que tiene influencia en su estructura y propiedades físicas. El *crosslink* más abundante del colágeno maduro es el hidroxilisil piridinolina (HL-Pyr) y tiene importancia en el proceso de mineralización. Las modificaciones postranslacionales de la matriz de colágeno son importantes tanto para las propiedades estructurales como mecánicas, y alteraciones de los *crosslinks* de colágeno pueden dar lugar a una severa alteración del tejido [40].

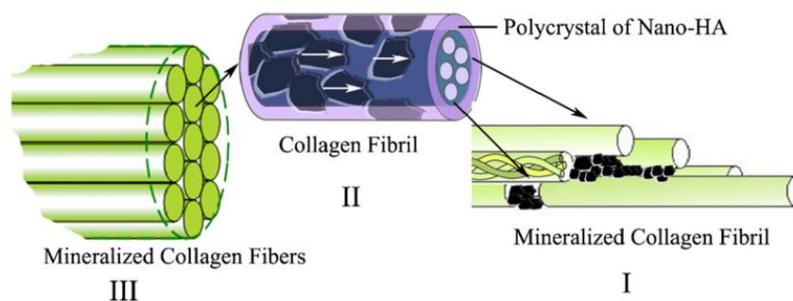


Figura 6. Estructura jerárquica del colágeno mineralizado (Qiu ZY, 2015) [41].

El colágeno tiene importancia en el hueso, aportando las propiedades plásticas y dúctiles del hueso. Pero además del colágeno existen otros componentes protéicos que, en menor cuantía, forman parte de la matriz extracelular. Las proteínas no colágenas constan de mucopolisacáridos ácidos, entre los que destacan la osteocalcina, la sialoproteína ósea, la osteopontina y la osteonectina. La osteocalcina y la sialoproteína ósea son específicas para el hueso. Estas proteínas se sintetizan por las células óseas y se ven involucradas en regular la mineralización y el remodelado óseo.

Como hemos dicho, la mayor parte de la masa ósea está constituida por el componente mineral. Este material inorgánico está formado fundamentalmente por iones calcio y fosfato, además de otras sustancias como bicarbonato, sodio, potasio, citrato, magnesio, carbonato, fluorita, zinc, bario y estroncio. Los iones calcio y fosfato se combinan para formar los cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Esta hidroxiapatita es, por lo general, deficiente en calcio, fosfato y grupos hidroxilo. Junto con el colágeno, la matriz de proteínas no-colágeno forman un armazón para el depósito de hidroxiapatita, proporcionando la rigidez y resistencia al tejido óseo [42].

La relación Ca/P oscila generalmente entre 1.37-1.87. Es posible la sustitución iónica de elementos menos frecuentes como magnesio, estroncio, flúor y carbonato en la estructura del cristal de apatita. Estas diferencias resultan en una apatita lo suficientemente insoluble para ser estable y suficientemente reactiva para permitir la resorción y la formación constantes de cristales de 5-100 nm de diámetro. Generalmente, los osteoblastos controlan la formación de fosfato cálcico amorfo, que sirve como reserva y núcleo para el crecimiento de hidroxiapatita. Otras sustancias orgánicas presentes en la matriz pueden ser involucradas en la promoción de la nucleación y la precipitación de bio-apatita y en la regulación de la orientación, el tamaño y la tasa de crecimiento de los cristales [43].

1.2.5 Remodelación del tejido óseo

El remodelado es el proceso por el que el esqueleto óseo es continuamente renovado. La velocidad con que se lleva cabo se conoce como recambio o *turnover* óseo. El proceso comienza con la osteogénesis fetal y continúa a lo largo de toda la vida. Consiste en la renovación del hueso lamelar sin causar cambios en la cantidad, geometría o tamaño del hueso. Su propósito es ajustar los elementos óseos a los cambios en los requerimientos mecánicos, prevenir el acúmulo de daños por fatiga, reparar microfracturas y participar en el metabolismo del calcio, además de intervenir en la homeostasis del equilibrio ácido-base. Este proceso tiene lugar en la superficie de todos los huesos, aunque es conocida la gran variabilidad que existe entre unas y otras localizaciones.

Existen cuatro superficies diferentes que pueden observarse en el hueso. La primera es la que se encuentra bajo el periostio, capa de tejido conjuntivo firmemente adherida a través de las fibras de Sharpey al hueso. Además, otras superficies que pueden sufrir remodelación son la del conducto de Havers (intracortical), la superficie endostal (endocortical) y la de las trabéculas. Por lo general, el hueso esponjoso posee una actividad de renovación de 5 a 10 veces más que el hueso cortical [43].

La remodelación del hueso ocurre como consecuencia de una cascada de acontecimientos que se llevan a cabo por un grupo de células coordinadas denominadas Unidad de Remodelación Ósea, encargadas de destruir pequeñas porciones de hueso, que son posteriormente sustituidas por hueso nuevo. Dichas células son de diversos tipos, pero dos de ellas son las protagonistas principales del proceso: los osteoclastos (encargados de destruir el hueso), y los osteoblastos (encargados de formarlo). Intervienen prestando su apoyo otras células, como linfocitos, macrófagos, células endoteliales, neuronas, etc. El volumen de hueso renovado por cada unidad es de unos $0,025 \text{ mm}^3$, y la tasa de renovación anual del esqueleto de aproximadamente un 10% (25-30% el hueso trabecular y 3-4% el cortical).

Existe una asimetría temporal entre la intervención de los osteoclastos y la de los osteoblastos. Los primeros desarrollan su tarea destructiva en unas 2-3 semanas, mientras que los segundos tardan 4-5 meses en reemplazar el hueso destruido. Entre la actuación de ambos tipos celulares hay una fase intermedia que se denomina "de inversión", y que dura unas 2 semanas. En ella unas células de origen no bien determinado –aunque probablemente de estirpe osteoblástica–, limpian la superficie ósea producto de la resorción, preparándola para la fase formativa [44].

En el hueso trabecular –y en los huesecillos del oído medio– los osteoclastos actúan en la superficie ósea, y no se mueven de manera longitudinal, sino en un zig-zag errático, en el que la célula vuelve a pasar por donde ya había actuado previamente. El resultado final de su actuación es una cavidad con una morfología que recuerda la de una laguna. Los osteoblastos la rellenan también por capas de la profundidad a la superficie [36].

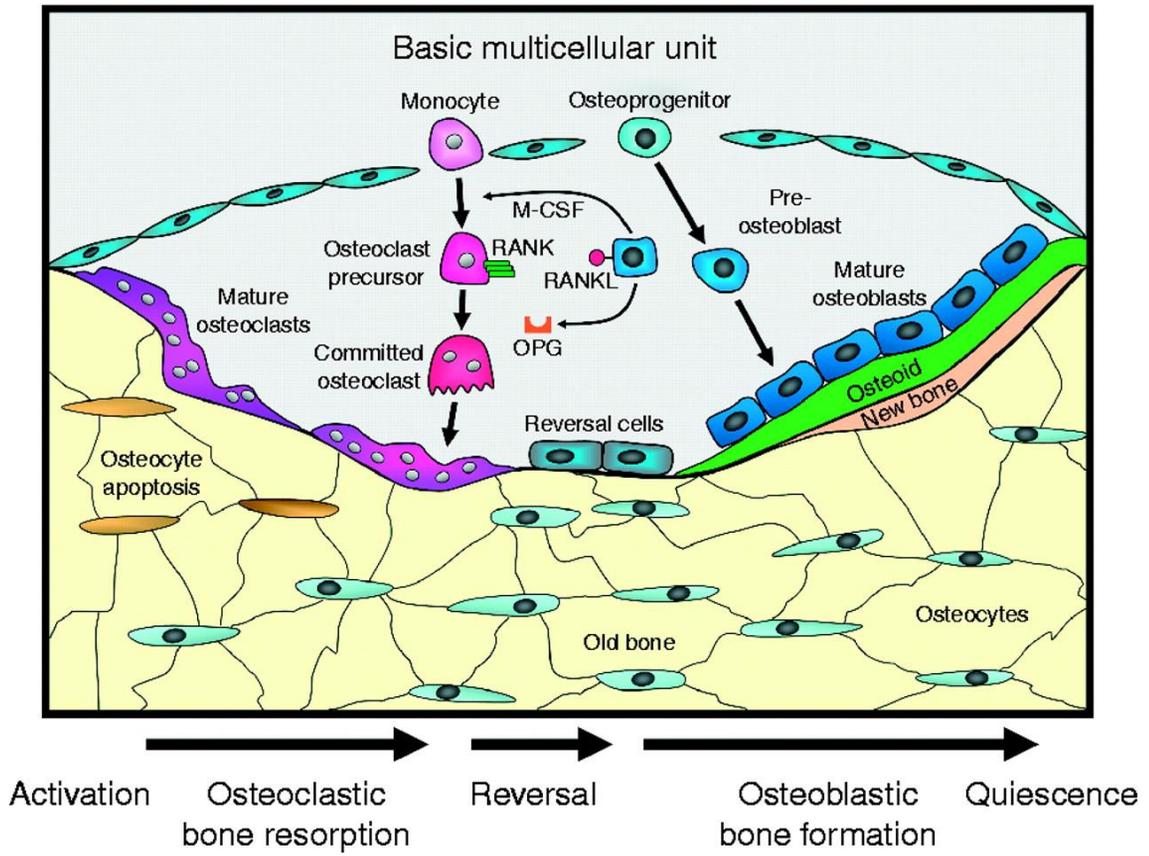


Figura 7. Representación esquemática de una Unidad de Remodelación Ósea (Nicholls, 2012) [45].

1.3 PATOLOGÍA CRÓNICA DEL OÍDO MEDIO

1.3.1 Otitis Media Crónica (OMC)

Esta denominación engloba una serie de procesos inflamatorios crónicos del oído medio que se mantienen en el tiempo sin mostrar tendencia a la curación. Es característica la persistencia de una otorrea continua o intermitente y con frecuencia su comienzo se remite a patología otológica de la infancia, aunque no siempre es así. Las OMC tienen poca tendencia a la curación, pero a lo largo de su evolución, bien porque un tratamiento tenga éxito o bien porque mejoren las condiciones del paciente, puede llegarse a un estado de inactividad. Pero esta recuperación nunca conduce a una vuelta a la integridad morfológica y funcional del oído afecto, quedan siempre unas secuelas de mayor o menor entidad que se conocen como residuos cicatriciales del oído medio.

Las otitis medias crónicas se caracterizan fundamentalmente por la localización de la perforación a través de la cual supuran. De tal manera que si la otitis cursa con una perforación central el cuadro generalmente es benigno, no se mantienen lesiones osteíticas en actividad y es muy difícil que produzca complicaciones. Sin embargo, si la otitis presenta una perforación marginal es muy probable la existencia de osteítis, es posible la presentación de una complicación y en un 90% de los casos esta enfermedad lleva implícita la existencia de un colesteatoma [46].

1.3.1.1 Otitis Media Serosa o secretora

Es un trastorno fundamentalmente inflamatorio no infeccioso, que afecta a la mucosa del oído medio, con la formación de líquido en el oído medio y la existencia de un tímpano íntegro. Es típica de la infancia, siendo la primera causa de hipoacusia en edades tempranas. La mucosa de la caja timpánica responde a la inflamación con fenómenos de hipertrofia, vasodilatación y edema. Posteriormente aparece un infiltrado de características inflamatorias, a la vez que se produce una hiperplasia de la mucosa, sobre todo de las células y glándulas caliciformes. Si el proceso se cronifica y no evoluciona hacia la curación, se producirán lentamente una serie de transformaciones en la membrana y la caja timpánicas que provocarán adherencias y fijaciones irreversibles en el sistema timpano-oscular. Es lo que se denomina otitis adhesiva o proceso adhesivo crónico [47-49]. La estructura ósea más afectada suele ser la apófisis larga del hueso yunque que sufre una serie de agresiones que provocan su lisis parcial o total con la consiguiente disrupción de la transmisión del sonido (Fig. 8).

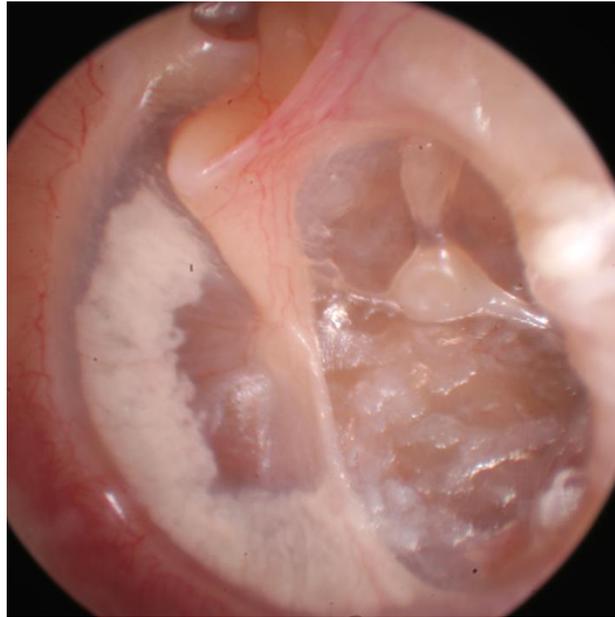


Figura 8. Retracción hemitimpánica posterior (PAC) con lisis de la apófisis larga del yunque.

1.3.1.2 Otitis Media Crónica Supurada

Son procesos inflamatorios crónicos del oído con supuración a través de una perforación de la membrana timpánica, habitualmente intermitente, de larga duración. Dependiendo de la localización, se pueden diferenciar dos tipos:

Otitis Media Crónica con perforación Central

Se caracteriza por una perforación de la membrana timpánica central y la ausencia de complicaciones. Cuando el proceso se inactiva, dejan habitualmente una serie de secuelas como la perforación timpánica persistente. También provocan alteraciones de la cadena osicular que se daña en diferentes puntos, especialmente en las articulaciones y en la apófisis larga del yunque. En ocasiones se produce una degeneración hialina de la submucosa del oído medio que conduce a la proliferación lamelar de colágeno y el depósito de sales cálcicas, proceso denominado timpanosclerosis [50, 51].

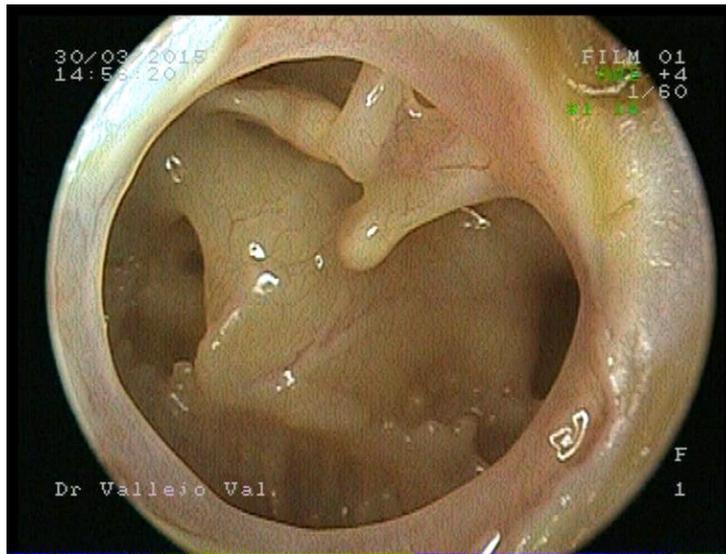


Figura 9. Perforación timpánica total.

Otitis Media Crónica con perforación Marginal

En este caso la localización de la perforación timpánica es en la zona marginal, con afectación del *annulus timpanicus*. Las alteraciones que produce son similares a las anteriores, sin que exista por lo general una inactivación de la enfermedad. Además, y de forma característica, aparecerá un fenómeno de osteítis en el oído medio, y una supuración mucho más purulenta. En la mayoría de los casos, aunque no en todos, aparece epitelio epidérmico queratinizado en el interior de la caja timpánica, que se desarrolla progresivamente y de forma redundante, provocando la destrucción de las estructuras del oído medio. Este pseudotumor se denomina colesteatoma [52] y, por el diferente comportamiento clínico, lo separaremos en un apartado diferente.

1.3.2 Colesteatoma

El colesteatoma es un pseudotumor formado por crecimiento de epitelio queratinizado dentro del oído medio. Como se dijo anteriormente, se forma muchas veces por la existencia de una perforación timpánica marginal; se denomina colesteatoma adquirido secundario. Pero existe la posibilidad de que aparezca un cuadro similar sin la presencia de perforación alguna. Otras muchas ocasiones son resultado de una invaginación del epitelio del conducto auditivo externo hacia la caja timpánica, habitualmente localizada en la *pars flácida* timpánica; es el colesteatoma adquirido primario. Un caso menos frecuente lo provoca la presencia de restos embrionarios ectodérmicos presentes en la caja timpánica con tímpano cerrado sin alteraciones; son los colesteatomas congénitos [53, 54].

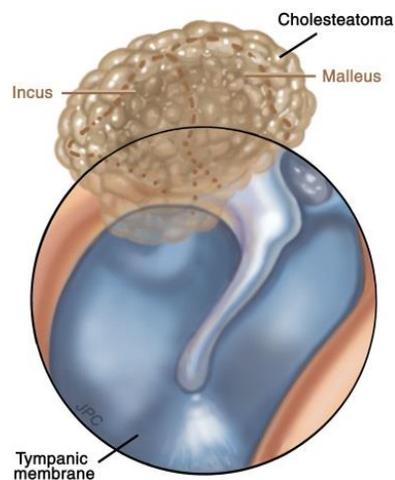


Figura 10. Esquema y fotografía de un colesteatoma adquirido primario de oído derecho.

Existen múltiples teorías o hipótesis con relación a la etiopatogenia del colesteatoma y todas ellas corresponden probablemente a los diferentes tipos de colesteatoma hallados en la clínica [55].

El colesteatoma lentamente va produciendo una importante destrucción ósea debida a distintos mecanismos. Por un lado, la presión que ejerce la creciente masa del colesteatoma sobre las paredes de la caja provoca la destrucción de los elementos vecinos. Se debe fundamentalmente a la acción del tejido de granulación de la capa externa (*perimatrix*) y a los enzimas proteolíticos derivados del cuadro de inflamación crónica. La salida de contenido del colesteatoma (*matrix*) al exterior es un importante factor determinante de la destrucción ósea [56]. Además, los microorganismos anaerobios que infectan el colesteatoma contribuyen a la formación de ácidos orgánicos; estos ácidos grasos producen una acidez del medio, que es un factor adyuvante en la osteolisis [57, 58].

En el caso de los osículos, el colesteatoma produce en primer lugar un adelgazamiento del periostio con una reacción inflamatoria posterior. Esta agresión aumenta el *turnover* óseo con una actividad mayor osteoclástica y la aparición de lagunas de resorción ósea. Progresivamente, la *perimatrix* del colesteatoma se va adhiriendo al hueso. Aparecen focos de osteítis u osteomielitis tanto periféricamente como en áreas centrales. Se forman focos de fibrosis como consecuencia del intento desesperado del hueso de repararse, con un desenlace final hacia la necrosis tisular completa. Además de los procesos inflamatorios se sospecha una acción enzimática que explicaría la agresividad y la rápida progresión en algunos casos [59].

Dependiendo de la localización del colesteatoma, el daño inducido sobre los huesecillos va a ser diferente. Así, los mayores efectos destructivos sobre martillo y yunque se producen a partir de colesteatomas aticales. Es el yunque el osículo que más sufre transformaciones a lo largo de la evolución del colesteatoma, tanto en la zona de la articulación incudomaleolar como en su apófisis descendente, que se ve alterada en la mayoría de los casos tanto por efecto directo como por la alteración del medio que induce la otitis media crónica colesteatomatosa [60-64].

1.4 MÉTODOS ESPECTROGRÁFICOS

La espectroscopia estudia la interacción entre la radiación y la materia. Un espectro es una representación gráfica de la distribución de intensidades de la radiación electromagnética emitida o absorbida por la materia, en función de la longitud de onda de dicha radiación. La radiación electromagnética transporta energía y momento, los cuales pueden ser transferidos a la materia con la que interactúa. El espectro electromagnético comprende un intervalo muy amplio de longitudes de onda y de frecuencias, las cuales están relacionadas con diferentes metodologías que son utilizadas para generar y detectar las distintas clases de radiación que pueden ser medidas.

En el espectro se utiliza el inverso de la longitud de onda, con unidades de cm^{-1} , para señalar la posición de las bandas de absorción ya que sus valores numéricos son de manejo más cómodo. En la figura 11 se representan los distintos espectros electromagnéticos. Las regiones ultravioleta e infrarroja están divididas en varias subregiones. La energía de excitación es inversamente proporcional a la longitud de onda, por lo que las radiaciones de menor energía corresponden a las de mayor longitud de onda [65].

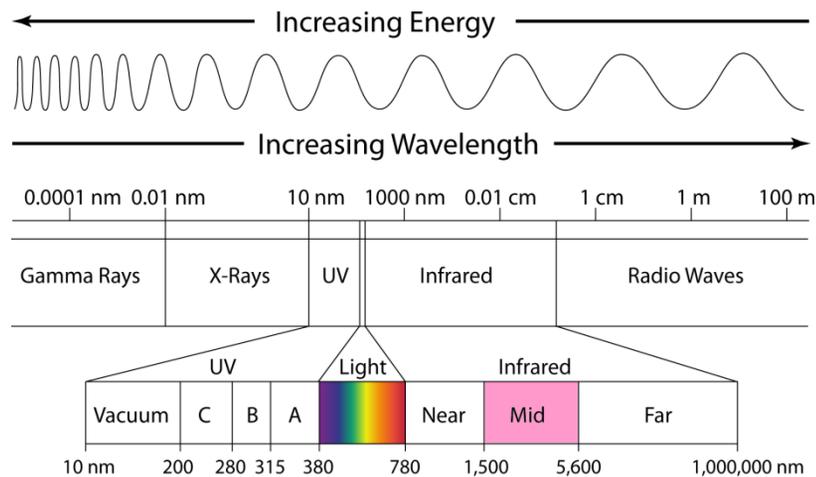


Figura 11. Espectro electromagnético según su longitud de onda. En rosa, espectro infrarrojo medio.

1.4.1 Espectrometría de Infrarrojos. FTIR

La espectrometría de absorción y reflexión en el infrarrojo medio es la principal herramienta para la determinación estructural de especies orgánicas y bioquímicas [66].

Para cuantificar la absorción de la radiación en espectroscopia IR se utilizan de manera habitual dos magnitudes diferentes. Éstas se denominan transmitancia (T) y absorbancia (A). Las medidas en transmitancia son útiles cuando se pretende identificar un compuesto correlacionando las bandas del espectro IR de un patrón con la muestra analizada. La otra magnitud que es utilizada para cuantificar el espectro es la absorbancia, la cual se define como la cantidad de intensidad de luz que absorbe la muestra. Cuando un haz de luz incide sobre un cuerpo translúcido, una parte de esta luz es absorbida por el cuerpo y el haz de luz restante lo atraviesa. A mayor cantidad de luz absorbida mayor será la absorbancia del cuerpo y menor cantidad de luz será transmitida por dicho cuerpo. La absorbancia y la transmitancia son dos aspectos que suelen utilizarse para definir el mismo fenómeno pero, a diferencia de la transmitancia, la absorbancia está relacionada linealmente con la concentración de los elementos que pueden estar presentes en la muestra y por tanto puede utilizarse con fines de análisis cuantitativo.

Las diferentes combinaciones de masas atómicas y energías de enlaces constituyen sistemas que vibran a diferentes frecuencias cuando la molécula absorbe radiación electromagnética. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja. Los diferentes movimientos vibracionales del átomo en la misma molécula producen absorción a diferentes números de onda. Por ejemplo, en el caso de la molécula de agua, los dos hidrógenos no vibran independientemente, sino con movimientos acoplados como los de dos péndulos que oscilaran sobre la misma varilla. Este acoplamiento produce un movimiento simétrico en el que los dos hidrógenos se acercan o separan del oxígeno al mismo tiempo, y un movimiento anti-simétrico en el que un hidrogeno se acerca al oxígeno mientras que el otro se separa (Figura 12). Para producir un cambio en estos movimientos se requiere una absorción de energía diferente y cada cambio produce absorción en la región infrarroja a frecuencias diferentes y características.

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de estiramiento (tensión) y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces. Cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar molecular), debido a que todas las moléculas (excepto las especies diatómicas homonucleares como O_2 y Br_2) tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo.

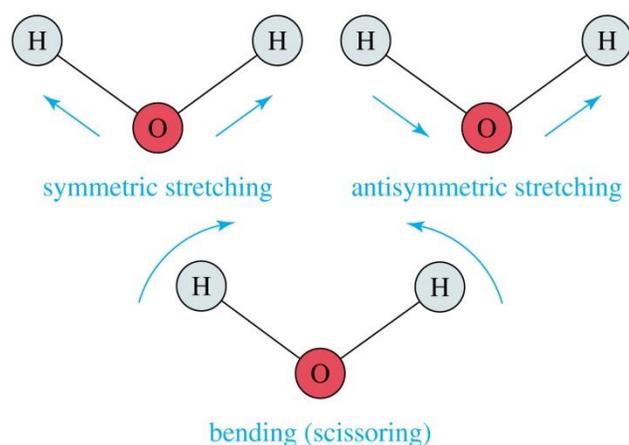


Figura 12. Modos vibracionales de la molécula de H_2O : estiramiento y flexión. El estiramiento puede ser simétrico o antisimétrico.

En la zona del espectro electromagnético IR con longitudes de onda del infrarrojo medio (entre 4000 y 1300 cm^{-1}) se suelen observar una serie de bandas de absorción provocadas por las vibraciones entre únicamente dos átomos de la molécula. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno o de grupos con dobles o triples enlaces aislados.

En la zona del espectro electromagnético IR con longitudes de onda comprendidas entre 1300 y 400 cm^{-1} , la asignación de las bandas de absorción a vibraciones moleculares es más difícil de realizar, debido a que cada una de ellas está generada por absorciones individuales sumadas (multiplicidad de las bandas). Es la denominada zona de la huella dactilar (flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, etc.). En esta zona de longitudes de onda, pequeñas diferencias en la estructura y constitución de las moléculas dan lugar a variaciones importantes en los máximos de absorción.

Un interferómetro, en general, es aquel instrumento que utiliza la interferencia de las ondas luminosas para lograr una medición muy precisa de las longitudes de onda de estas. El interferómetro de Michelson está compuesto por dos espejos planos, un detector y un divisor del haz (*beam splitter*). A través de una fuente se hace incidir un haz de radiación sobre el *beam splitter* formando un ángulo de 45° . Este separador tiene la propiedad de transmitir la mitad de la radiación y reflejar la otra mitad. Los haces transmitido y reflejado se dirigen a los dos espejos orientados perpendicularmente a ambos haces. A continuación los haces son reflejados de regreso al divisor del haz. Si solo uno de los espejos está en posición, el haz reflejado por el espejo retorna al *beam splitter* y envía la mitad de la radiación original al detector. Si ambos espejos están en posición se presentan fenómenos de interferencia en el *beam splitter* cuando los haces procedentes de ambos espejos se combinan. La interferencia es un fenómeno óptico que ocurre entre dos o más ondas ópticas que se encuentran en el espacio. Si estas ondas tienen la misma longitud de onda y se encuentran de modo que la cresta de una coincide con la cresta de la otra, entonces se dice que las ondas están en fase. La máxima amplitud combinada de la onda es la suma de las amplitudes de las ondas individuales. Dos ondas interfieren constructivamente si se encuentran después de haber recorrido trayectorias que difieren en longitud por un múltiplo de una longitud de onda.

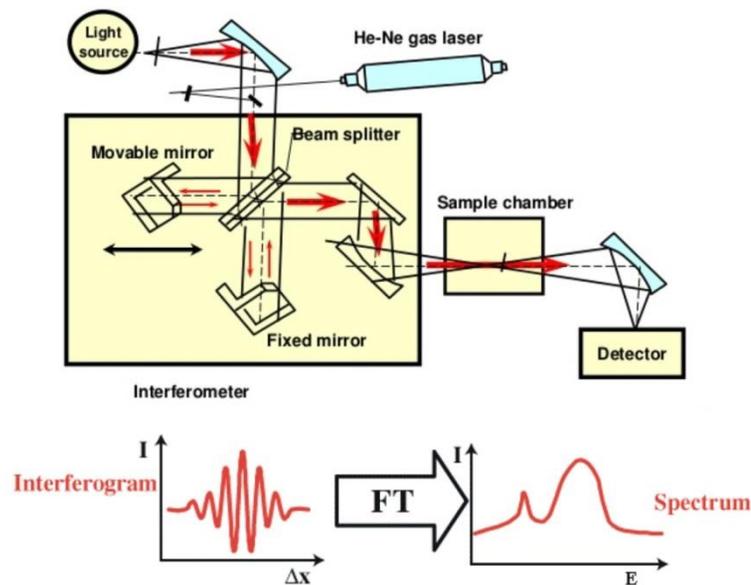


Figura 13. Representación esquemática de un interferómetro. Mediante la transformada de Fourier (FT) se obtiene el espectro final.

La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica de análisis para obtener el espectro infrarrojo con mayor rapidez. En lugar de registrar los datos variando la frecuencia de luz infrarroja monocromática, se guía la luz IR (con todas las longitudes de onda de pista utilizada) a través de un interferómetro. Después de pasar por la muestra, la señal medida da el interferograma. La realización de una transformada de Fourier de la señal produce un espectro idéntico al de la espectrometría infrarroja convencional (dispersiva).

Una fuente policromática puede ser considerada como una multitud de fuentes monocromáticas tipo láser muy próximas que cubren todo el rango de emisión de dicha fuente. El interferograma de una fuente policromática puede considerarse como la suma de las ondas coseno de los componentes monocromáticos. Para obtener un espectro en transmisión o absorbancia se debe registrar el espectro de la fuente o del blanco (*background*). La división punto a punto de las intensidades de este espectro entre las del tomado a la muestra permite obtener un espectro en transmisión o absorbancia de la muestra. Se busca una reducción del nivel de ruido respecto a la señal, lo cual se logra al adquirir un determinado número n de barridos que son promediados por el sistema informático. La resolución utilizada para llevar a cabo cada uno de los ensayos es constante sobre todo el rango espectral y se incrementa con el aumento del recorrido del espejo móvil.

La transformación de Fourier se usa como método matemático para el desarrollo en serie de la curva obtenida (interferograma). La transformada está constituida por el sumatorio de senos y cosenos de las distintas frecuencias ópticas que componen la radiación. Gracias a un programa de ordenador este tedioso cálculo matemático se simplifica y se obtienen resultados exactos y rápidos de las frecuencias elementales contenidas en el interferograma. La transformada de Fourier (o desarrollo en serie de Fourier) del interferograma es el espectro ordinario obtenido por aparatos convencionales IR. En efecto, el interferograma contiene la absorción completa de

la muestra descrita para cada longitud de onda por la correspondiente disminución de intensidad luminosa. Pero cualquier interferograma común es el resultado de la combinación de múltiples frecuencias que con la técnica de transformada de Fourier es posible descubrir. De esta forma, analizando qué longitudes de onda son las que absorbe una sustancia en la zona del infrarrojo, podemos obtener información acerca de las moléculas que componen dicha sustancia [67].

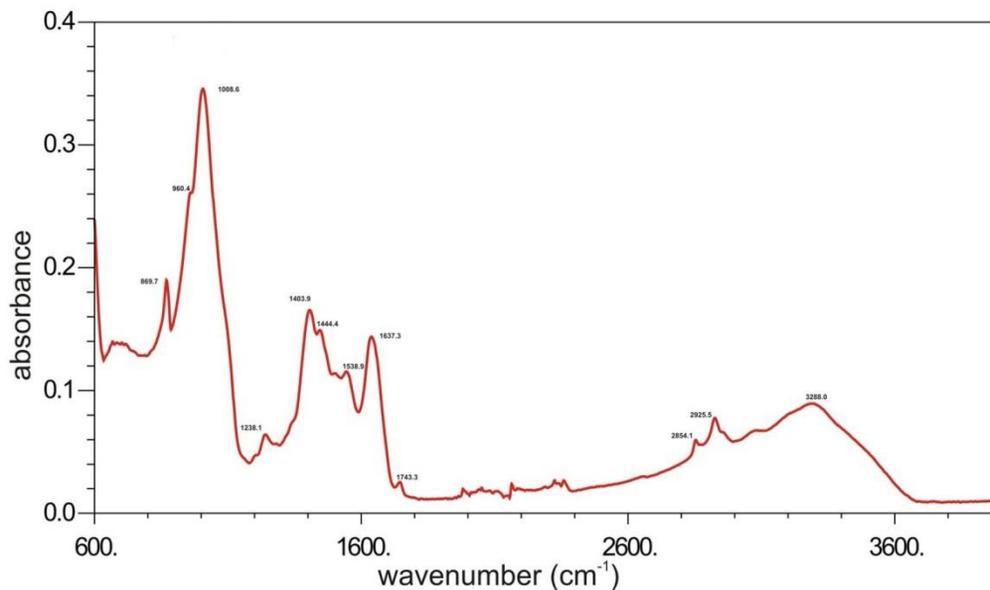


Figura 14. Espectro final obtenido mediante FTIR de una muestra de tejido óseo.

1.4.1.1 Reflexión total atenuada

La técnica de reflexión o reflectancia total atenuada (Attenuated Total Reflectance: ATR) se basa en el hecho de que cuando la radiación electromagnética que se propaga a través de un medio ópticamente denso llega a una interfase con un medio enrarecido (de menor índice de refracción) a un ángulo de incidencia mayor que el ángulo crítico, la radiación no escapa del medio denso sino que es totalmente reflejada internamente. Sin embargo, debido a la naturaleza ondulatoria de la radiación electromagnética, la reflexión no ocurre directamente en la interfase de los dos medios; la radiación realmente sale del medio más denso y se extiende una distancia corta del otro lado de la interfase en el medio enrarecido antes de retornar. La extensión con la cual la radiación penetra el medio enrarecido depende de la longitud de onda de la radiación, los índices de refracción de los dos medios y el ángulo de incidencia a la interfase.

Si un haz de radiación monocromática atraviesa un prisma de forma que el medio más denso está formado de algún material de elevado índice de refracción que transmite la radiación infrarroja, y el medio enrarecido por una muestra, entonces la muestra absorberá algo de la radiación infrarroja incidente. El registro de la radiación cuando finalmente sale del medio más denso suministra un espectro muy similar al espectro convencional.

En base a fundamentos teóricos y de la experiencia práctica se ha establecido que en la reflexión interna total hay una onda evanescente de igual frecuencia que la de la radiación reflejada, cuya amplitud decrece de forma logarítmica dentro del material menos denso más allá de la interfase. Esa onda evanescente es capaz de interactuar con el medio absorbente en la zona posterior a la interfase, originando una reducción o atenuación de la radiación reflejada total. Por medio de la utilización de esta técnica, la muestra es presionada contra una placa que transmite la radiación IR, tal como se muestra en la Figura 15. La penetración controlada de la onda evanescente en la muestra hace que la radiación IR pueda ser selectivamente absorbida en la superficie de la muestra en contacto con la placa. El espectro de la radiación reflejada internamente es similar al espectro IR de absorción convencional de la muestra.

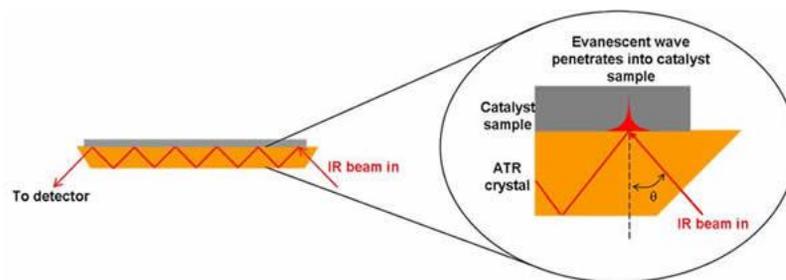


Figura 15. Esquema de la técnica Atenuated Total Reflectance, ATR (Queen's University Belfast. 2008).

Los espectros obtenidos mediante la técnica ATR son muy similares a los espectros de transmisión comunes, aunque existen algunas diferencias significativas. Una de ellas es producida por la profundidad de penetración de la radiación en la muestra. Esta penetración es función de la longitud de onda, siendo la profundidad de penetración del haz evanescente a longitudes de onda cortas menor que a longitudes de onda más largas.

La técnica ATR es de mucha utilidad para el registro de espectros IR de muestras difíciles de tratar mediante otros métodos. La calidad del espectro obtenido puede ser influida por varios factores externos entre los cuales se destacan el efecto de la presión en el portador de la muestra, la textura de la superficie de la muestra y el índice de refracción de ésta [68].

1.5 MÉTODOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La potencia amplificadora de un microscopio óptico se encuentra limitada por la longitud de onda de la luz visible. El microscopio electrónico, en cambio, utiliza electrones para iluminar un objeto. Dado que estos electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz, son capaces de mostrar estructuras mucho más pequeñas. La longitud de onda más corta de la luz visible es de alrededor de 4.000 ángstroms, mientras que la longitud de onda de los electrones que se utilizan en los microscopios electrónicos es de alrededor de 0,5 ángstroms.

Existen dos tipos básicos de microscopios electrónicos: el microscopio electrónico de transmisión (*Transmission Electron Microscope*, TEM) y el microscopio electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscope*, SEM). Mientras el primero proporciona información sobre la estructura interna de las muestras, el segundo se utiliza principalmente para estudiar la superficie o la estructura cercana a la superficie de muestras más gruesas. Las imágenes obtenidas por SEM son más fáciles de interpretar que las conseguidas por TEM.

Todos los microscopios electrónicos disponen de varios elementos básicos. Cuentan con un cañón que emite los electrones que van a chocar contra el espécimen, creando una imagen aumentada. Se usan lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, ya que las lentes convencionales utilizadas en los microscopios ópticos no funcionan con los electrones. El sistema de vacío es una parte relevante del microscopio electrónico: debido a que los electrones son dispersados más fuertemente por los gases que la luz, es preciso evacuar el camino de los electrones a presiones menores que 10⁻³ pascales. Por último, todos los microscopios electrónicos cuentan con un sistema que registra o muestra la imagen que producen los electrones [69].

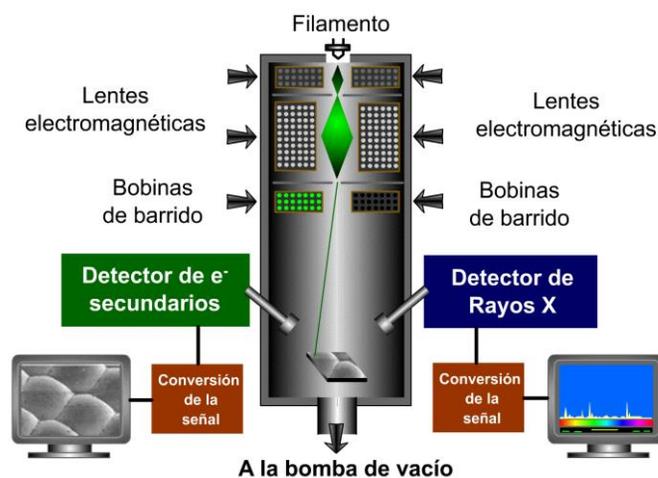


Figura 16. Esquema de un microscopio electrónico de barrido.

1.5.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y análisis por energía dispersa de rayos X (EDX)

El microscopio electrónico de barrido utiliza un haz fino de electrones para explorar la muestra y conseguir la formación de una imagen. Los tipos de imágenes que se pueden obtener son diversos y dependen, fundamentalmente, de las señales que se producen por la interacción entre los electrones y la muestra a explorar. Cuando un haz de electrones colisiona contra un objeto penetra en él a una profundidad directamente proporcional al número atómico de los átomos que lo constituyen. A medida que penetran, los electrones pierden su energía. En la zona de penetración se crea un área tridimensional donde interaccionan los electrones del haz y los átomos de la muestra (zona de excitación primaria). En esta zona se pueden emitir siete tipos de señales fundamentales: electrones transmitidos, electrones secundarios, electrones retrodispersados, fotones, electrones de Auger, corriente de espécimen o catodoluminiscencia y rayos X (Figura 17). Hablaremos de los más útiles para nuestro trabajo.

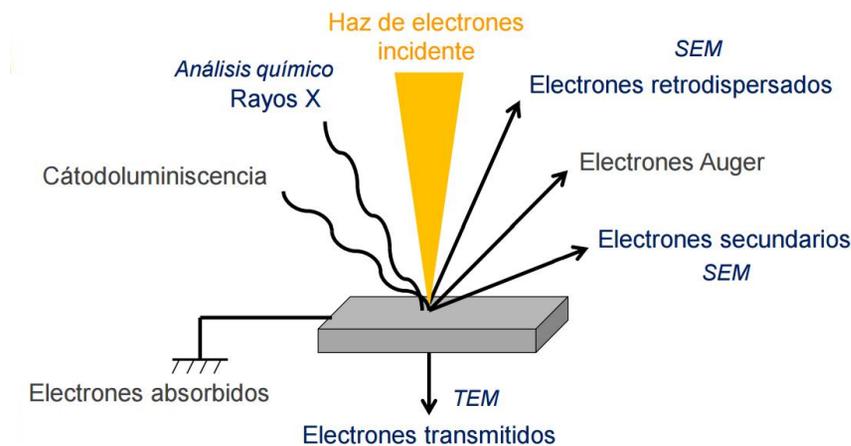


Figura 17. Tipos de radiación generada al incidir un haz de electrones (Servicios Técnicos de Investigación. Universidad de Alicante. 2012).

1.5.1.1 Electrones secundarios

Cuando alguno de los electrones del haz colisiona con uno de los electrones de los átomos que conforman la muestra, el átomo se ioniza y puede emitir electrones secundarios (frente a los "primarios", que serían los incidentes). Esto también puede ocurrir debido a los electrones retrodispersados. Estos electrones secundarios tienen una baja energía, por lo que sólo pueden escapar de la muestra si se producen en su parte más superficial. La probabilidad de que los electrones secundarios escapen de la muestra disminuye exponencialmente a medida que el punto donde se generan se aleja de la superficie. Los electrones secundarios que salen de la

muestra lo hacen en direcciones diferentes y pueden ser recogidos para formar una imagen tridimensional de la superficie del objeto.

Las imágenes obtenidas con electrones secundarios son de gran utilidad para estudios topográficos y como hemos mencionado, sus trayectorias son curvas, de modo que la imagen aparece con sombras suaves y difusas; en un segundo plano se observan las depresiones o áreas escondidas. Un cambio de inclinación de la superficie de una muestra con respecto al haz electrónico incidente, aún de pocos grados, produce una variación apreciable en el número de electrones secundarios emitidos. Así, un borde agudo o una protuberancia sobre la superficie generan un gran número de electrones secundarios. Lo mismo sucede si se trata de un escalón profundo sobre la superficie de la muestra. Las hendiduras o depresiones producen menos electrones detectables. Los efectos de variación de la emisión secundaria en función de las características topográficas de una superficie, permiten que se pueda interpretar la imagen de electrones secundarios como una imagen óptica de dicha superficie.

1.5.1.2 Electrones retrodispersados

Se producen cuando los electrones del haz incidente chocan con los electrones o los núcleos de los átomos de la muestra y rebotan y escapan de ella. Los electrones retrodispersados tienen una energía cercana a la de los electrones incidentes, por lo que en el trayecto desde su origen hasta la superficie de la muestra pueden interactuar con otros átomos y dar lugar a otros tipos de señales como electrones secundarios. La producción de electrones retrodispersados está en íntima relación con el número atómico de los átomos que componen la muestra, de tal forma que cuanto más alto es éste, mayor número de electrones retrodispersados se producen. Este fenómeno permite obtener información sobre la composición de la muestra. Los electrones retrodispersados se originan, además de en la superficie del objeto, en zonas profundas de la muestra y, debido a su energía, estos electrones siguen trayectorias rectilíneas y ha de tenerse en cuenta para su detección [70].

1.5.1.3 Rayos X

Los rayos X se producen en la zona de excitación primaria cuando un electrón del haz incidente choca contra un átomo de la muestra y provoca la salida de un electrón secundario. Un electrón de una capa más externa se desplazará para ocupar su lugar, liberando una energía en forma de rayos X. Estos rayos X tendrán una longitud de onda y una energía características de los átomos en los que se han producido. En el análisis por energías dispersivas de rayos X, EDX (Energy Dispersive X-ray) se detectan los rayos X generados en la muestra y permiten realizar un estudio cualitativo de su composición elemental. La energía de estos rayos X depende de los niveles de energía implicados en la transición electrónica y, por lo tanto, es característica de cada elemento. Estos rayos X son detectados por medio de espectrómetros de dispersión de longitudes de onda o de dispersión de energías. El resultado es un espectro en el que aparecen

picos correspondientes a las distintas emisiones de rayos X de los elementos presentes en la zona analizada (Fig. 18). Como en el caso de las imágenes, la resolución lateral del análisis es muy alta, al depender fundamentalmente de la zona sobre la que se focaliza el haz de electrones. Por ello, esta técnica permite el análisis detallado de los distintos productos de corrosión presentes en la superficie de la muestra. El análisis de los elementos y la morfología se puede realizar de manera conjunta obteniéndose mapas de distribución de los elementos presentes en la superficie y también perfiles de concentración de cada elemento [69].

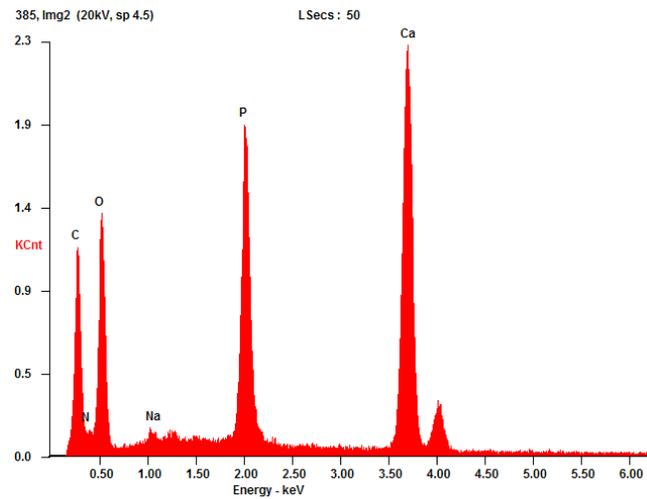


Figura 18. Espectro de Energía Dispersa de Rayos X.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.

■ bases previas

2. BASES PREVIAS

Se presentan a continuación, los trabajos más importantes de la literatura científica en relación al estudio del yunque con las técnicas que se emplean en esta Tesis y que han constituido la base para su planteamiento.

2.1 ESTUDIOS MEDIANTE TÉCNICAS ESPECTROGRÁFICAS

Oshaki K et al; Am J Otolaryngol 1988 [71]

Realizan un estudio con espectroscopía Raman en huesecillos del oído, además de proponer un modelo experimental de destrucción ósea. Según sus hallazgos, parece que el componente inorgánico del hueso se disuelve (disociándose en iones calcio, fosfato, carbonato e hidroxilo) debido a las condiciones de acidez provocando la desmineralización del hueso. Teorizan sobre la fisiopatología del colesteatoma: ácidos grasos de cadena corta pueden alcanzar el hueso desde el colesteatoma gracias al incremento de permeabilidad asociado al edema. Encuentran que la cantidad de carbonato en hueso enfermo es menor que en el hueso normal, probablemente por una alteración en la vascularización. A medida que la desmineralización progresa, la concentración de iones en el exudado aumenta. En ocasiones, ocurre una remineralización: hidroxiapatita o algún análogo se precipita en ese exudado. También la concentración de iones fosfato disminuye en la superficie de hueso destruido, al contrario que los iones hidroxilo, que aumentan. En este artículo se postula que, en el colesteatoma, la destrucción del hueso es fundamentalmente por contacto.

Duboeuf F et al; Bone 2015 [72]

Utilizan microtomografía de rayos X y microscopía FTIR para estudiar 15 yunques sanos y 13 patológicos. Describen que la estructura fundamental del yunque es esencialmente hueso cortical, no identificándose hueso trabecular. Los huesos de pacientes con procesos inflamatorios del oído medio presentan una degradación de la microarquitectura con un incremento de la porosidad. El índice de mineralización (M/m) es significativamente más alto en los yunques comparados con hueso cortical femoral, mientras que la madurez es significativamente menor en los primeros. En los huesos patológicos (procesos inflamatorios) la carbonatación es más alta que en los sanos.

2.2 ESTUDIOS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Brownson RJ et al; *Laryngoscope* 1972 [73,74]

En este par de estudios clásicos, se describe la microanatomía normal de los huesecillos del oído medio humano tras su estudio con microscopía electrónica de barrido. Para las observaciones se utiliza un microscopio Cambridge Stereoscan a 20 kV; las muestras son recubiertas de cromo tras su deshidratación. La mucosa de recubrimiento es identificada como un epitelio cúbico. Se constata la observación de canales vasculares, la disposición de fibras entrecruzadas y algún osteoblasto, pero no osteoclastos.

Hassmann E et al; *Arch Otorhinolaryngol* 1978 [75]

En este estudio comienza a describirse en profundidad la superficie de los huesecillos del oído medio tras su observación al microscopio electrónico de barrido. Se utiliza un un Cambridge Stereoscan para examinar las muestras deshidratadas y recubiertas de oro. Se identifican dos tipos principales de tejido óseo que aparecen en estos elementos: perióstico y endocondral. El hueso lamelar también aparece en los orificios vasculares pero raramente en forma de osteonas típicas. La superficie del hueso perióstico contiene fibras gruesas mientras que la del lamelar, fibras finas, aunque su aspecto es casi idéntico. En la superficie del hueso se observa, fundamentalmente, una red de fibras entretejidas con espacios entre ellas y alguna célula osteoblástica. Es lo que identifica como periostio. Tras su limpieza, aparece una estructura de fibras de 2-4 micras, entrelazadas y retorcidas, con lagunas osteocíticas. Se describe también la existencia de numerosos orificios vasculares, muy variables de unas muestras a otras, con la presencia de fibras gruesas entrelazadas. En aquellos casos en los que había una fractura, se observa que la estructura del hueso del canal vascular es del tipo de hueso lamelar con capas concéntricas y lagunas osteocíticas planas.

Wong J et al; *J Otolaryngol* 1991 [76]

En este trabajo se describe una técnica de preparación de muestras para SEM. Utilizan 46 especímenes (17 normales y 29 patológicos). Tras la conservación con glutaraldehído al 2%, utilizan una solución de 1% de hipoclorito sódico durante 24 h para la limpieza. Los huesos son recubiertos de oro para su observación en un microscopio Jeol JSM-35 a 15 kV. Preconizan el uso de hipoclorito para obtener unas muestras más limpias que las tratadas con formaldehído. En los huesos normales reconocen una estructura de fibras entrelazadas tras la cubierta epitelial a modo de urdimbre. Otros patrones de fibras que encuentran son: el patrón de panal de abeja (fibras organizadas aleatoriamente en unas zonas y regulares en otras, formando crestas y valles), el patrón denso (superficie homogénea lisa) y el patrón agujereado (con cavidades, más raro). En los huesos patológicos con colesteatoma describen tres tipos de

lesiones. El *apomazado*, en el que la erosión es de aspecto liso como si fuera limado. No se reconoce patrón fibrilar en la superficie, aunque las lagunas de Havers se siguen observando. Con más aumentos se observan fibras rotas con aspecto de mineral fusionado. Otro patrón es el *perforado*, en el que se producen erosiones en forma de bolsillos en el hueso. Un grado más de lesión es el patrón *cavitado*, en el que se producen amplias cavidades en la superficie del hueso, incluso tunelizadas en profundidad. Aquí se ve un hueso muy poroso y desmineralizado. Piensan que la erosión ocurre en etapas e invocan una mezcla de mecanismos de presión e inflamatorios. Creen que existe una primera fase en la que tras la erosión, se forma nuevo hueso desestructurado, dando lugar a la imagen en apomazado. Luego, cuando se supera la neoformación, el colesteatoma comienza a extenderse al hueso, creando un bolsillo que progresivamente erosiona el hueso.

Lannigan FJ et al; Clin Otolaryngol Allied Sci 1993 [77]

En este trabajo se observan 30 yunques normales al microscopio electrónico. Utiliza un microscopio JEOL JSM-T20 a 20 kV. Las muestras son tratadas para eliminar la capa mucosa y perióstica con una solución de 10% de papaína a 37°C durante 3-5 días. Luego se lavan con hipoclorito sódico al 5%, seguido de etanol, secado ambiente y recubrimiento con oro. Los autores buscan actividad osteoclástica en este estudio y la encuentran dispersa en apófisis corta y cuerpo, especialmente en orificios vasculares. Existe una mayor actividad en apófisis larga y lenticular, a todas las edades. En el artículo se describe una erosión progresiva a medida que avanza la edad hasta, en ocasiones, perder completamente la apófisis lenticular. Parece que la neoformación de hueso disminuye con la edad.

Lannigan FJ et al; J Laryngol Otol 1993 [78]

Estudia el yunque con SEM en pacientes con otitis media crónica supurada. Utiliza la misma técnica descrita anteriormente. Describe sitios frecuentes de erosión en la apófisis larga y lenticular del yunque. En aquellos con más daño sobre la apófisis larga, se observan perforaciones en punteado en cuerpo y apófisis corta. Cuando la apófisis larga está totalmente destruida, existe una gran fosa erosiva que afecta al resto de cuerpo y apófisis corta. No puede diferenciar el tipo de enfermedad en base al grado o patrón de erosión. Identifica el festoneado típico de la osteoclasia y encuentra poca evidencia de hueso neoformado. Concluye que la erosión del yunque en la otitis media crónica supurada es debida a la acción osteoclástica exclusivamente.

Lannigan FJ et al; J Anat 1995 [79]

Recoge yunques de cirugía de implante coclear y neurinomas o de cadáveres. También utiliza la misma técnica que en otros trabajos. En este caso se trata de un estudio morfométrico de la longitud de la apófisis corta y la proporción de áreas erosionadas. Encuentra una mayor

resorción ósea en los pacientes más mayores, especialmente en hombres. Teoriza sobre las causas mecánica, vascular, etc... que podrían estar detrás de este hallazgo.

Uno Y et al; *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995 [80]

En este completo trabajo estudian huesecillos erosionados procedentes de cirugías de 16 pacientes con otitis media crónica colesteatomatosa (8 martillos y 12 yunques). Las muestras fueron conservadas en formol. Examinan con microscopio óptico 4 yunques, con colesteatoma adherido al hueso. Para la SEM utilizan 8 yunques tras limpieza de las partes blandas con ultrasonidos y se recubren con oro para su observación en un microscopio Hitachi S-2300 a 25 kV. Con microscopio óptico detectan una proliferación importante de fibrocitos y fibroblastos con formación de capilares y la infiltración de numerosas células inflamatorias mononucleares en el tejido conectivo subepitelial del colesteatoma. Observan células multinucleares, con todas las características de los osteoclastos, en contacto con el hueso erosionado cerca del área de resorción activa. Con SEM identifican áreas de erosión en forma de cavidades irregulares en la superficie de los osículos. No detectan relación con los agujeros vasculares. Las fibras parecen haber sido parcialmente digeridas en estas zonas. Concluyen que la resorción osteoclástica es uno de los mecanismos importantes de la destrucción ósea en el colesteatoma, y que la desmineralización y/o degeneración de la matriz orgánica extracelular puede preceder a la destrucción de las fibras de colágeno.

Chen H et al; *Ann Anat* 2008 [81]

Interesante estudio sobre los 3 huesecillos de 34 cadáveres al microscopio electrónico. Preparan las muestras retirando la cubierta mediante una solución de papaína al 0,1% a 37°C durante 3 días, para después lavarlos con hipoclorito sódico al 5% y agua destilada, desecándolos posteriormente para su recubrimiento con oro-paladio. Describen una estructura fibrilar estable en la mayor parte de la superficie ósea. Encuentran una predominancia de resorción ósea de superficie y canales vasculares en el yunque y estribo, sobre todo en la apófisis larga del yunque y el cuello del estribo tanto en hombres como en mujeres, aunque detectan una ligera tendencia a ser mayores en mujeres (no estadísticamente significativa). No encuentran relación entre porcentaje de resorción ósea o canales vasculares con la edad. Atribuyen el aumento de superficie de resorción a cambios vasculares.

Milisavljevic D et al; *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010 [82]

En un estudio de nueve pacientes con artritis reumatoide (AR) y cinco sin enfermedad previa, examinan martillo y yunque extraídos tras autopsias. Las muestras son tratadas con formaldehído al 2% y solución Ringer para luego ser fijados con ácido ósmico y deshidratados. Utilizan un JEOL JSM 53000 con las muestras recubiertas de oro. Usan un sistema para medir la superficie de las fotografías que se obtienen y encuentran que la superficie de resorción es

mayor en yunque que en martillo. También observan daño en las superficies articulares, pero raramente en los pacientes con AR. Encuentran erosiones en la apófisis larga de yunque, sobre todo, en AR significativamente mayores que en los no patológicos. No existen diferencias entre los martillos. Los daños sobre el yunque –mayores en AR– aumentan con la edad y la evolución de la enfermedad (el rango en el estudio es escaso).

2.3 ESTUDIOS MEDIANTE ANÁLISIS ELEMENTAL

Bagger–Sjöback D et al; *Am J Otolaryngol* 1987 [83]

Realizan un estudio sobre la rama larga del yunque (o sus remanentes) en hueso normal y procedente de pacientes con patología crónica de oído medio. Determinan la relación Ca/P mediante métodos químicos y no encuentran diferencias significativas entre los yunques normales y los patológicos.

Sánchez–Fernández JM et al; *Acta Otolaryngol* 1992 [84]

Estudio con 52 huesos procedentes de fetos, niños y adultos sanos, y adultos con patología de oído medio. Utiliza un detector de rayos X acoplado a un microscopio de barrido. Observan que la osificación de martillo y yunque comienza en el período fetal. Hallan cocientes de Ca/P de 2,10 en martillo y 2,19 en yunque; en estribo de 2,11 en la platina. Encuentran una relación inversa entre Ca/P y la presencia de azufre en el proceso de osificación. Normalmente el azufre descende a medida que la mineralización progresa. No encuentra diferencias entre hueso sano y patológico.

Tohno Y et al; *Biol Trace Elem Res* 1997 [85]

Estudian vértebras y martillos procedentes de cadáveres formolizados. Utilizan la digestión con ácido nítrico y perclórico de las muestras, que son analizadas con espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente. La relación masa Ca/P es de 2,17 en hombres y de 2,18 en mujeres. Encuentran valores de azufre similares entre martillo y vértebra, pero magnesio mayor en el primero. Los valores Ca/P se mantienen constantes a lo largo de la vida (exploran 40–98 años), tampoco hay cambios en S, Mg y Na.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.

■ hipótesis

3. HIPÓTESIS

Las características químicas y estructurales de la cadena de huesecillos son, por su especial anatomía y función, diferentes a las de otros huesos del organismo. Estas características se ven alteradas de diferente manera en el transcurso de diversas enfermedades, tanto inflamatorias como degenerativas, congénitas o adquiridas.

Se proponen varias hipótesis para este estudio:

- Existen diferencias en la microestructura y la composición de la matriz extracelular del tejido en el yunque entre ambos sexos y a lo largo de la vida.
- Los procesos inflamatorios del oído medio afectan a la estructura del tejido óseo y a la interacción mineral-colágeno en el yunque.
- El mecanismo de destrucción ósea en las enfermedades inflamatorias crónicas que afectan al yunque posee características distintivas de cada proceso.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.

■ objetivos

4. OBJETIVOS

Se indican a continuación los objetivos que se proponen para este trabajo de investigación:

- Caracterizar la microestructura del tejido óseo del yunque con técnicas de microscopía electrónica de barrido.
- Explorar la composición mineral del yunque y su relación con el componente protéico.
- Comprobar la existencia de cambios en las características del tejido óseo y modificaciones en la matriz extracelular del yunque a lo largo de la vida y diferencias entre ambos sexos.
- Describir las alteraciones del tejido óseo del yunque en diferentes situaciones patológicas que afectan al oído medio humano.
- Elaborar nuevas teorías que expliquen los acontecimientos que se producen en el proceso de remodelación del yunque a lo largo de la vida y la destrucción que ocurre en el transcurso de diferentes procesos patológicos.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.

■ material y métodos

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de estos estudios se han utilizado muestras de hueso de pacientes intervenidos en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Río Hortega entre los años 2000 y 2013.

5.1 RECOGIDA DE MUESTRAS

Las muestras de tejido óseo fueron obtenidas de productos de desecho postquirúrgicos tras la realización de diferentes procedimientos sobre el oído medio (salvo un caso con diagnóstico de osteoma frontal). En los casos en los que dicho material era susceptible de uso clínico no se realizó la recogida ya que los elementos óseos se utilizaron para la fase de reconstrucción de la cadena osicular. En el resto de los casos, una vez descartada su utilidad, se procedió a la recogida del material óseo. Fueron descartados los casos con riesgo infeccioso o pacientes que no hubieran dado su consentimiento. Se excluyeron del estudio aquellos casos en los que hubo errores en la recogida, procesado o conservación de las muestras, así como en las ocasiones en las que no existían datos clínicos o existían dudas en la identificación de los restos osiculares obtenidos.

5.2 PROCESADO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Tras la recogida, las muestras de hueso fueron tratadas en una solución de suero salino al 0,9% y peróxido de hidrógeno 0.3% a partes iguales durante 3-5 días, tras lo cual se limpiaron mecánicamente y se procedió a su secado a temperatura ambiente en espacio protegido.

Se probaron otras técnicas de preparación descritas en la literatura:

- a. Inmersión en formaldehído al 2%, lavado con solución Ringer y fijación con ácido ósmico [82].
- b. Digestión en solución de papaína al 10% a 37°C durante 3-5 días [77, 78, 79].

- c. Solución tamponada de glutaraldehído al 2%, tras lo cual se realiza una inmersión en hipoclorito sódico al 1% durante 24 horas a temperatura ambiente [76].
- d. Fijación en formaldehído al 10%, luego con glutaraldehído al 2,5% durante varios días para luego realizar una limpieza mediante lavadora de ultrasonidos [80].

Todas las técnicas descritas en la literatura tienen como finalidad la preparación de las muestras para su visualización en cámara de alto vacío mediante un microscopio electrónico de barrido, tras su recubrimiento generalmente con oro o, menos frecuentemente, con otros elementos como cromo o paladio. En segundo lugar, mediante el uso de hipoclorito sódico, papaína o la utilización de ultrasonidos se busca la limpieza de restos orgánicos (sangre, tejido inflamatorio, restos de mucosa, etc.) que estarían adheridos a la superficie del osículo tras su extracción.

Estos procedimientos fueron ensayados en algunas muestras y se comprobó que no ofrecían mejores resultados en la limpieza y conservación del tejido óseo. El uso de formaldehído y/o glutaraldehído provocaba la fijación de abundante tejido mucoso y restos hemáticos en las piezas. El empleo de papaína para digerir la capa superficial del hueso o el uso de ultrasonidos para desprenderla no consiguió mejores resultados que el uso de peróxido de hidrógeno. La utilización de hipoclorito sódico provocaba un deterioro de la parte superficial del hueso, distorsionando la visualización de las fibras del tejido óseo.

Con la preparación de peróxido de hidrógeno al 0,3% y suero salino al 0,9% a partes iguales se consigue una buena disolución de los restos hemáticos e inflamatorios, así como la eliminación de la capa mucosa. El desprendimiento de la capa perióstica, espontánea o manualmente, no se consiguió en ciertas regiones del hueso en muchos casos pero la conservación de la microestructura fibrilar de la superficie del tejido óseo resultó ser mucho mejor que con las técnicas anteriores. En algunos casos se produjeron grietas, rasguños o desprendimientos de tejido óseo, especialmente en aquellas muestras más frágiles que correspondían a pacientes afectados de patología inflamatoria crónica de oído medio.

Tras la limpieza y secado, las muestras fueron etiquetadas y almacenadas en envases herméticos, protegidos de la luz y los cambios bruscos de temperatura.

5.3 RECOGIDA DE DATOS

Los datos sobre edad, sexo, antecedentes médico-quirúrgicos, características clínicas, diagnóstico, evolución, técnica quirúrgica y hallazgos intraoperatorios fueron recogidos de la historia clínica de los pacientes y almacenados en un fichero de datos. La información fue volcada y codificada en tablas de datos mediante el programa Microsoft Excel (Microsoft; Redmond, WA, USA. 2007). Se empleó el doble etiquetado para preservar la confidencialidad y se eliminaron los datos personales de los pacientes para todo el proceso de análisis.

5.4 ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIO ÓPTICO

Las muestras fueron inspeccionadas al microscopio quirúrgico tanto durante la intervención quirúrgica en la que fueron extraídas como tras su limpieza y secado. Se utilizó un microscopio Leica Wild M655 (Leica Microsystems; Germany) con cámara digital Canon EOS350 (Canon Inc; Tokyo, Japan) acoplada. Todos los osículos fueron fotografiados con rejilla de referencia para su medición. Se realizó un estudio descriptivo de la morfología de la muestra (generalmente yunque) y la presencia y tipo de lesiones, erosiones o lisis (Fig. 19).

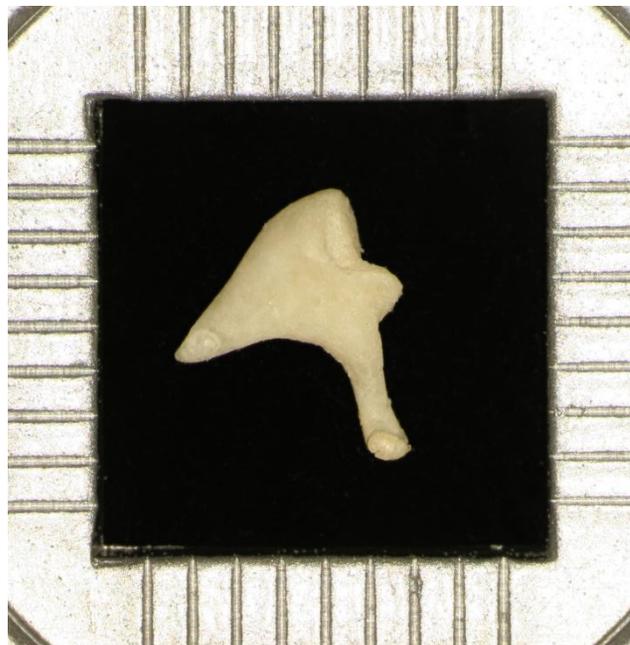


Figura 19. Fotografía de un yunque izquierdo con marco de escala.

5.5 ESTUDIO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS (FTIR)

Para la realización de esta prueba se utilizaron 77 muestras de hueso, correspondientes a 71 yunques, 1 fragmento de cortical mastoidea, 1 fragmento de cortical frontal y 4 muestras de hueso de conducto auditivo externo. Todos los yunques completos fueron fragmentados en 3 porciones: apófisis corta, cuerpo y apófisis larga (Fig. 20), de manera que se obtuvieron 3 mediciones por cada osículo. Aquellos en los que la erosión ósea provocada por los procesos patológicos crónicos había destruido totalmente ciertas regiones del hueso, sólo se fragmentaron aquellas áreas que se conservaban. El corte se realizó mecánicamente con una cuchilla de acero quirúrgico inoxidable 58 HRC.

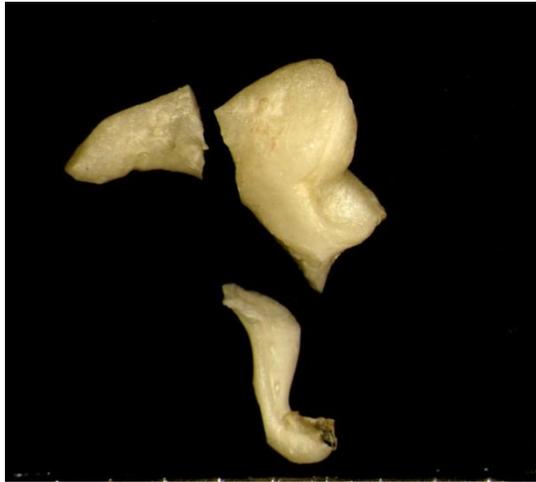


Fig 20. Fotografía de un yunque derecho tras la fragmentación mecánica.

Para el análisis se empleó un Espectrómetro BRUKER IFS 66/S con accesorio ATR Specac Golden Gate de prisma de diamante monolítico de los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante.

La técnica ATR (Attenuated Total Reflection) o Reflexión Total Atenuada es un método de muestreo en el que el haz de infrarrojos se proyecta en un cristal de alto índice de refracción. Este haz se refleja en la cara interna del cristal y crea una onda evanescente que penetra en la muestra, que debe estar en íntimo contacto con el cristal. Parte de la energía de la onda es absorbida y la radiación reflejada es registrada por el detector, con la información química de la muestra. Se trata de un método muy versátil que permite el estudio de muestras sólidas sin apenas necesidad de preparación [86].

Se registraron espectros IR con un campo de trabajo desde 600 cm^{-1} hasta 4000 cm^{-1} y una resolución de $1,9\text{ cm}^{-1}$. Los datos de absorbancia se presentaron en el eje Y del gráfico. Se identificaron los picos principales y las bandas de interés en cada uno de los espectros (Fig. 21)

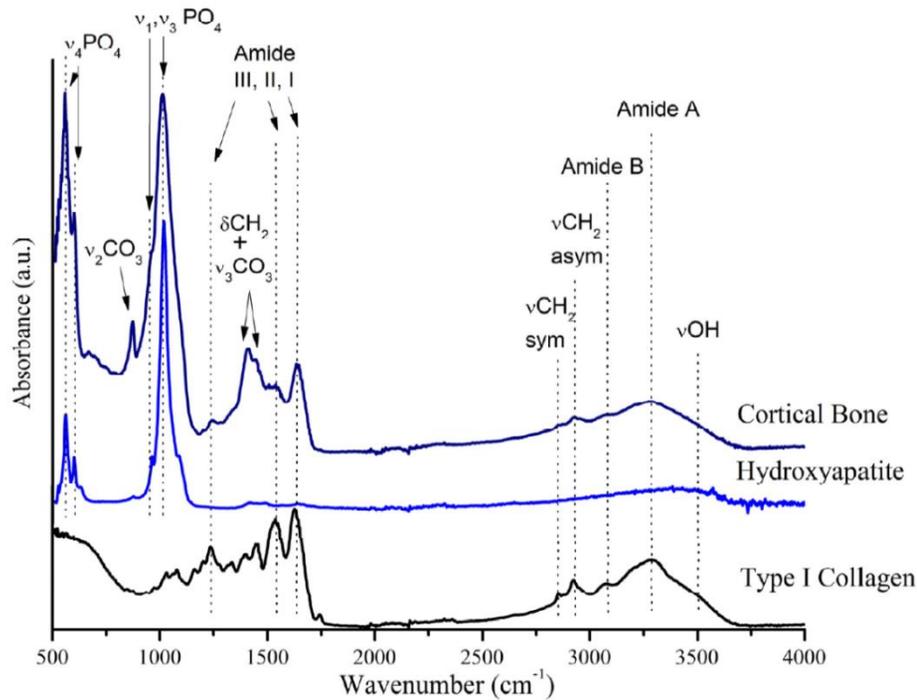


Figura 21. Regiones vibracionales principales en una muestra de tejido óseo y sus componentes principales: hidroxiapatita y colágeno tipo I (Figueiredo MM et al, 2012) [68].

Las regiones más importantes para el estudio del tejido óseo son el carbonato, el fosfato y el colágeno [87, 88].

El espectro de IR de proteínas presenta un número de bandas características denominadas Amida que son debidas a la vibración de los átomos involucrados en el enlace peptídico. El colágeno se estudia en las regiones Amida I (vibraciones en los enlaces C=O), Amida II (enlaces C-N y N-H) y Amida III (enlaces C-N, N-H y C-C α). La más utilizada para el estudio del colágeno es la Amida I [89].

La información sobre la parte mineral se obtiene de los porcentajes relativos de carbonato y fosfato, que permiten estimar la calidad del hueso [90,91]. El grado de mineralización del hueso se define a través de la intensidad de las especies de fosfato en la banda correspondiente [92].

El ión carbonato puede identificarse en varias localizaciones del espectro IR debido a sus diferentes modos vibracionales, pero para el estudio de la hidroxiapatita como componente del tejido óseo se utilizan habitualmente las bandas correspondientes a la región 860–890 cm^{-1} [93, 94].

Relación Mineral/matriz protéica (M/m)

El área bajo la curva de una banda determinada, obtenida por integración, es directamente proporcional a la cantidad de especies o variantes que genera esa banda. Como resultado, la relación entre el área de fosfato y cualquier banda de amida (habitualmente amida I) es

representativa de la cantidad de mineral en relación con el colágeno presente (en términos relativos) [95]. Por tanto, una estimación del cociente de las áreas Fosfato/Amida I indicará el grado de mineralización del tejido óseo [96].

Relación Carbonato/Fosfato (C/P)

El fosfato puede ser sustituido de la molécula de hidroxiapatita por grupos carbonato, dando lugar a carbonatoapatita. Se puede calcular esta carbonatación mediante el cociente de las áreas Carbonato/Fosfato [97, 98].

En los espectros obtenidos para este trabajo, se realizó un análisis de las regiones de carbonato $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ (860–890 cm^{-1}), fosfato $\nu_1\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ (963, 1033 cm^{-1}) y amida I (1630, 1700 cm^{-1}) hallando el área bajo la curva mediante integración del pico tras corregir la línea base (Fig. 22). Se utilizó el programa Origin Pro8 (OriginLab Corporation; Northampton, MA, USA. 2007).

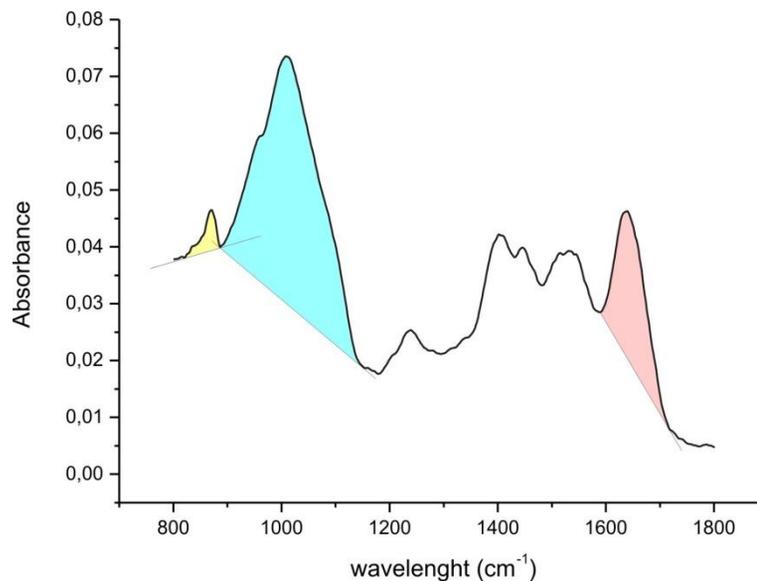


Figura 22. Áreas de Carbonato, Fosfato y Amida I utilizadas para los cálculos de los índices de Mineralización y Carbonatación.

De los resultados anteriores se infirió:

El grado de **mineralización**, a través de la relación Mineral/matriz (Fosfato/Amida I):

$$\frac{\text{área}(963-1033 \text{ cm}^{-1})}{\text{área}(1630, 1700 \text{ cm}^{-1})}$$

La **carbonatación** del hueso, mediante el cociente Carbonato/Fosfato:

$$\frac{\text{área}(860-890 \text{ cm}^{-1})}{\text{área}(963, 1033 \text{ cm}^{-1})}$$

5.6 ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ANÁLISIS DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (SEM-EDX)

5.6.1 Estudio SEM-EDX de yunque normal y patológico

Para el examen de las muestras de yunque se utilizaron un microscopio electrónico de barrido Hitachi S3000N de los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante y un Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM) FEI - Quanta 200FEG del Parque Científico de la Universidad de Valladolid.

Ambos equipos son microscopios de barrido a presión variable que no hace necesaria la preparación de la muestra realizando un recubrimiento con metales conductores. Por lo general, se utilizó un voltaje de aceleración de 20 kV.

El hueso es un tejido no conductor y por lo general se induce una carga negativa en la superficie de la muestra. Esta carga puede actuar de espejo haciendo rebotar los electrones que se lanzan hacia ella, por lo que la imagen que se obtiene de los electrones secundarios (SE) puede verse distorsionada. Esta es la razón principal por la que las muestras no conductoras necesitan un recubrimiento metálico. Aunque la utilización de los equipos de presión variable y de barrido ambiental permite minimizar ese efecto sin recurrir al recubrimiento, siempre puede haber cierto grado de interferencia [99, 100].

El uso de electrones retrodispersados para generar la imagen permite evitar las interferencias por carga eléctrica ya que los detectores BSED no son sensibles a electrones de baja energía. Además, la energía retrodispersada contiene información acerca del número atómico de los componentes de la muestra, lo que permite crear imágenes en las que el peso atómico se refleje en una intensidad de luz proporcional [101]. Estas ventajas hacen de esta técnica idónea para el análisis de los tejidos óseos mineralizados [102], entre los cuales se encuentran los elementos osiculares del oído medio [102-107].

Para este estudio se empleó fundamentalmente la imagen obtenida mediante el registro de electrones retrodispersados, lo que permite visualizar especialmente nítido el Calcio de la muestra (Fig. 23).

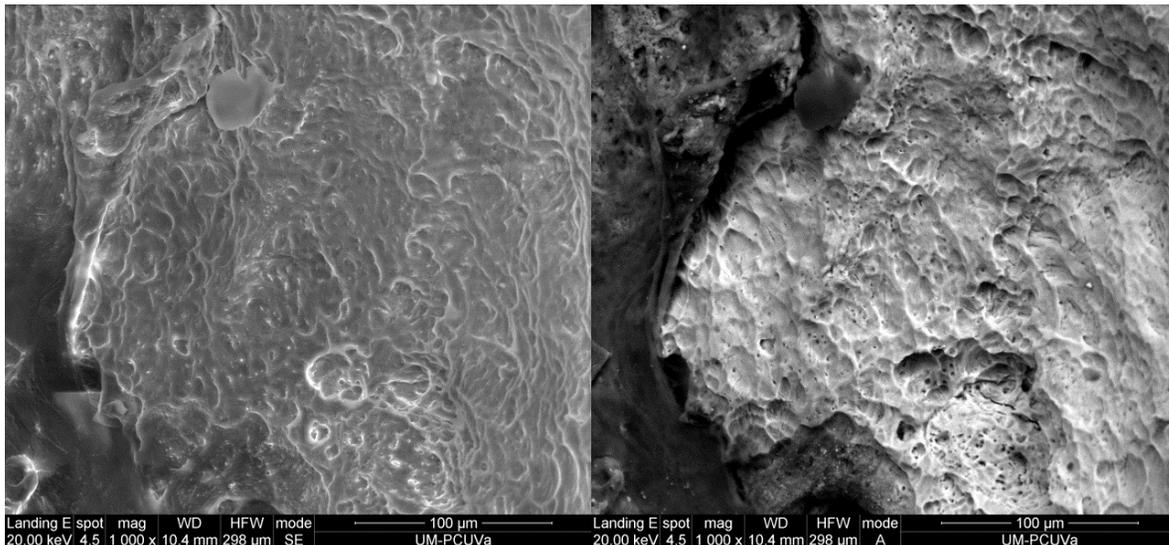


Figura 23. A la izquierda, imagen obtenida con electrones secundarios (SE), a la derecha se utiliza energía retrodispersada (BSED). Nótese la diferencia de resolución en el detalle del tejido óseo calcificado y su diferenciación con el tejido conectivo.

5.6.2 Estudio EDX de la relación Ca/P en el hueso yunque

Para la realización de este estudio, llevado a cabo en los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante, se utilizó un microscopio electrónico de barrido Hitachi S3000N para su visualización y se empleó un detector de rayos X Bruker XFlash 3001 para realizar el microanálisis (EDX).

La medición de los Rayos X dispersados a la vez que se obtienen imágenes microscópicas de alta calidad, permite un análisis mucho más preciso de la composición del tejido en una determinada localización y de los especiales hallazgos que se puedan observar durante la investigación como son degradaciones, erosiones, cristalización de compuestos, etcétera [108, 109].

Se efectuaron análisis puntuales y de área con EDX en diferentes zonas del hueso. Se obtuvieron los valores relativos de peso de los diferentes elementos químicos, su ponderación en base 100 y la corrección según número atómico (Fig. 24). A partir de ésta última, se prestó atención a las cifras de calcio y fósforo, hallando el cociente Ca/P de cada uno de los huesos. Se trata de un análisis semi-cuantitativo, ya que una cuantificación precisa de los elementos requeriría una preparación especial de las muestras y una serie de cálculos más complejos [110].

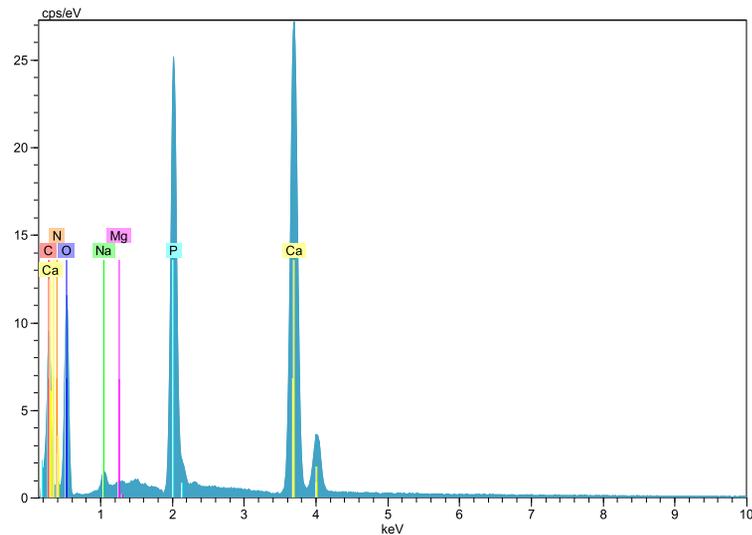


Figura 24. Microanálisis EDX de la superficie del hueso. Obsérvese la predominancia de Ca y P en la muestra.

5.6.3 Estudio EDX de la relación Ca/P en la porción distal de la rama larga del yunque

Con el equipamiento anteriormente descrito se efectuó un enfoque puntual en la zona central de la porción distal de la rama larga del yunque en su cara lateral, previa realización de raspado del área para eliminar la capa superficial de hueso (Fig. 25). Se obtuvieron los valores relativos de peso de los diferentes elementos químicos, su ponderación en base 100 y la corrección según número atómico. A partir de ésta última, se prestó atención a las cifras de calcio y fósforo, hallando el cociente Ca/P de cada uno de los huesos.

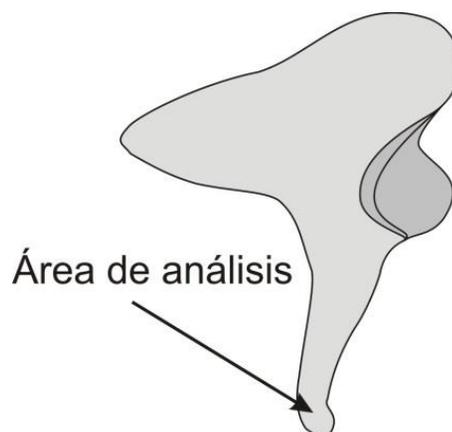


Figura 25. Zona de raspado para efectuar el análisis profundo.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las variables fueron analizados mediante el paquete informático Statistical Package for the Social Science IBM SPSS Statistics versión 22 (IBM Corp.; Armonk, NY, USA. 2013).

La normalidad de las variables se estableció mediante la prueba de Kolmogorov–Smirnov. Las variables cuantitativas se describen como media \pm desviación estándar (DE) en el caso de distribuciones normales. En el caso de distribuciones no normales se presenta la media y el rango intercuartílico (RI). Las variables cualitativas se presentan mediante frecuencias absolutas y relativas (o porcentajes). Se calculan los intervalos de confianza al 95% de los parámetros obtenidos. Se utilizan histogramas de frecuencia, barras de error o diagramas de cajas para representar las variables cuantitativas.

Para estudiar la asociación entre variables cualitativas se utiliza la prueba de Chi cuadrado con test exacto de Fisher o razón de verosimilitud, dependiendo de las condiciones de aplicación. Para estudiar las diferencias entre medias independientes se utilizan los test estadísticos paramétricos o no paramétricos exigidos por las condiciones de aplicación (la prueba de la t de Student o la U de Mann–Whitney, para 2 grupos; y el ANOVA o la H de Kruskal–Wallis, para comparaciones de más de 2 grupos). Para estudiar la relación entre variables cuantitativas se calculan los coeficientes de correlación de Pearson o Spearman, dependiendo de la normalidad o no de las distribuciones. El nivel de significación se ha fijado para una $p \leq 0,05$.

5.8 BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

Se ha realizado una revisión sistemática de la bibliografía sobre el estudio de los huesecillos del oído medio mediante técnicas de microscopía electrónica y de análisis espectrográfico. Se ha empleado la base de datos de la National Library of Medicine (<http://www.nlm.nih.gov>) seleccionando los artículos a través de términos científicos relacionados con FTIR, SEM, EDX, hueso, yunque, oído medio, colesteatoma, otitis media crónica, etc.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.

■ resultados

6. RESULTADOS

6.1 ESTUDIO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS (FTIR)

6.1.1 Estudio global

6.1.1.1 Variables demográficas: edad y sexo

El estudio global se realizó sobre una muestra total de 71 pacientes, con un amplio rango de edad, de 2 a 80 años. La media fue de $45,86 \pm 18,14$ años. La mediana se situó en 48 años. Esta variable sigue una distribución normal (Fig. 26).

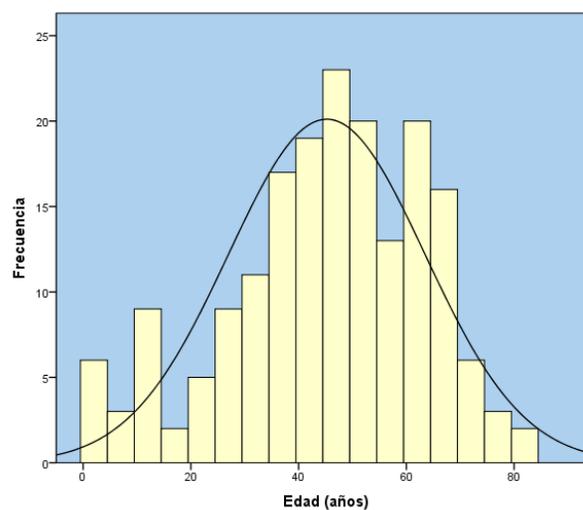


Figura 26. Histograma de frecuencias de la variable edad.

Para el estudio de las diferencias por edad, y a raíz de los resultados iniciales, se estableció un punto de corte y se compuso un grupo de 53 individuos (74,6%) menores de 60 años y otro grupo de 18 pacientes (25,4%) iguales o mayores de 60 años.

La distribución por sexos fue de 28 hombres (39,4%) frente a 43 mujeres (60,6%).

Dentro del grupo de hombres la media de edad se situó en $48,8 \pm 20,4$ años, mientras que en el de las mujeres se calculó en $44,0 \pm 16,5$ años, (NS).

En la variable *grupo de edad*, cuando se agrupan los pacientes en menores de 60 años y mayores o iguales a 60 años, se observa una distribución desigual de ambos sexos. En el grupo de menor edad existe una predominancia del sexo femenino (67,9%) mientras que en el grupo de mayor edad son más numerosos los varones (61,1%), ($p=0,029$). Se representan en la Tabla 1 y la Figura 27.

Grupo de edad		Sexo		Total
		Hombres	Mujeres	
< 60 años	Recuento	17	36	53
	Porcentaje	32,1%	67,9%	100,0%
≥ 60 años	Recuento	11	7	18
	Porcentaje	61,1%	38,9%	100,0%
Total	Recuento	28	43	71
	Porcentaje	39,4%	60,6%	100,0%

Tabla 1. Distribución de la variable *sexo* en cada grupo de edad.

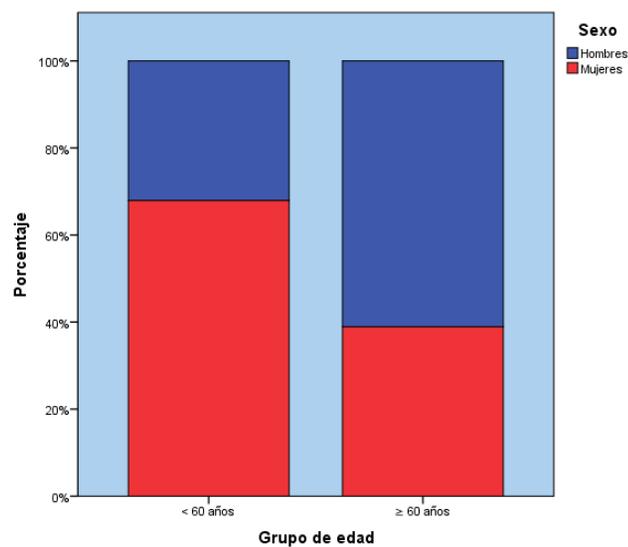


Figura 27. Distribución de la variable *sexo* en cada grupo de edad.

6.1.1.2 Variables topográficas: fragmento

La fragmentación de los yunques resulta en la formación de tres grupos según su topografía, tal y como se recogen en la Tabla 2.

De lo que se deduce que 10 yunques tenían erosionada completamente la apófisis corta y 19 carecían de apófisis larga debido a los procesos patológicos que habían sufrido.

Fragmento	Frecuencia	Porcentaje
1. Apófisis corta	61	33,2%
2. Cuerpo	71	38,6%
3. Apófisis larga	52	28,3%
Total	184	100,0%

Tabla 2. Frecuencia de los fragmentos resultado de la división de las muestras.

La distribución por edad es similar en los tres grupos tal y como se observa en la Tabla 3, (NS). Tampoco hay diferencias importantes en la distribución de los grupos de edad por cada fragmento, (NS). Lo mismo ocurre con el sexo, que no posee diferencias de distribución importantes por cada fragmento, (NS). Por estas razones se considerará cada fragmento de forma independiente para el análisis constituyendo una muestra total de n=184.

	1. Apófisis corta (n=61)	2. Cuerpo (n=71)	3. Apófisis larga (n=52)	
Media de edad (años)	45,6 ± 18,7	45,9 ± 18,1	43,9 ± 18,1	NS
Grupo de edad < 60 años	44 (72,1%)	53 (74,6%)	40 (76,9%)	NS
edad ≥ 60 años	17 (27,9%)	18 (25,4%)	12 (23,1%)	
Sexo Hombres	23 (37,7%)	28 (39,4%)	19 (36,5%)	NS
Mujeres	38 (62,3%)	43 (60,6%)	33 (63,5%)	

Tabla 3. Variables demográficas en relación con el fragmento.

6.1.1.3 Variables clínicas: patología

Existen tres grupos atendiendo al diagnóstico final del paciente. Frente a 15 yunques que pueden calificarse como normales, existen 21 procedentes de cirugía de colesteatoma y otros 35 huesos de pacientes con el diagnóstico de otitis media crónica. La distribución de esta variable no difiere de forma importante en cada grupo de fragmentos, (NS).

	Pacientes		Fragmentos		Nº fragmentos		
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Y1	Y2	Y3
1. Sin patología	15	21,1%	45	24,5%	15	15	15
2. Colesteatoma	21	29,6%	42	22,8%	13	21	8
3. Otitis media crónica	35	49,3%	97	52,7%	33	35	29
Total	71	100,0%	184	100,0%	61	71	52

Tabla 4. Distribución de la variable *patología* en la muestra de pacientes y por fragmentos (Y1 = apófisis corta, Y2 = cuerpo, Y3 = apófisis larga).

La predominancia del sexo femenino se repite aquí en los tres grupos, siendo el porcentaje de mujeres del 53,3% en huesos sin patología, del 69% en colesteatoma y 62,9% en otitis media crónica, (NS).

Tampoco hay diferencias importantes en las distribuciones de edad por cada grupo de patología, siendo las medias de edad de $43,7 \pm 21,5$ años en el grupo de los normales, de $44,8 \pm 20,1$ años en colesteatoma y de $46,1 \pm 15,7$ años en otitis media crónica, (NS).

Pero cuando se estudian las distribuciones de los grupos de edad que se han tenido en cuenta, se observa que el porcentaje de fragmentos de igual o más de 60 años es casi el doble en el grupo de yunques normales (40%) frente a los grupos de yunques patológicos (del orden del 21%), tal y como se refleja en la tabla 5, ($p=0,038$).

			Normal	Colesteatoma	OMC	Total
Grupo de edad	<60 años	Recuento	27	33	77	137
		Porcentaje	60,0%	78,6%	79,4%	74,5%
	≥60 años	Recuento	18	9	20	47
		Porcentaje	40,0%	21,4%	20,6%	25,5%
Total	Recuento	45	42	97	184	
	Porcentaje	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabla 5. Distribución de la variable *grupo de edad* en cada grupo de patología.

6.1.1.4 Variables químicas: Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato

Se realiza el análisis de los cocientes Fosfato/Amida I (Mineral/matriz) y Carbonato/Fosfato – resultantes de la integración de las áreas bajo los picos de las bandas correspondientes– de los 184 fragmentos de yunque. Los resultados globales se presentan en la Tabla 6. Existen 2 registros que fueron eliminados por problemas en la medición, probablemente derivados de la colocación de la muestra para la realización de la espectrometría. Las variables no siguen una distribución normal (Fig. 28 y 29).

		MINERAL/ MATRIZ	CARBONATO/ FOSFATO
N	Válidos	182	182
	Perdidos	2	2
Media		4,565	0,028
Mediana		4,068	0,030
Desv. típ.		2,412	0,006
Mínimo		0,734	0,004
Máximo		12,047	0,039
Percentiles	25	2,725	0,025
	50	4,068	0,023
	75	6,187	0,032

Tabla 6. Variables químicas.

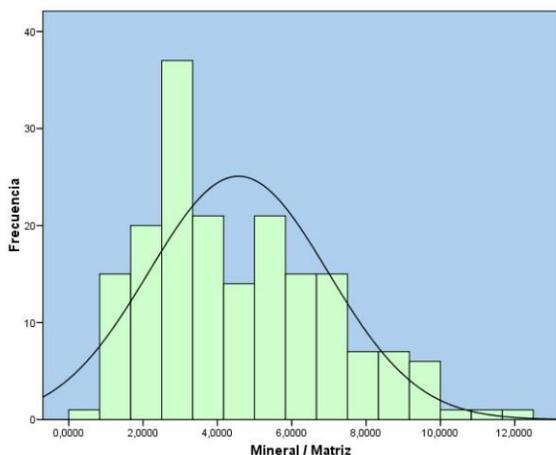


Figura 28. Distribución de la variable Mineral/matriz

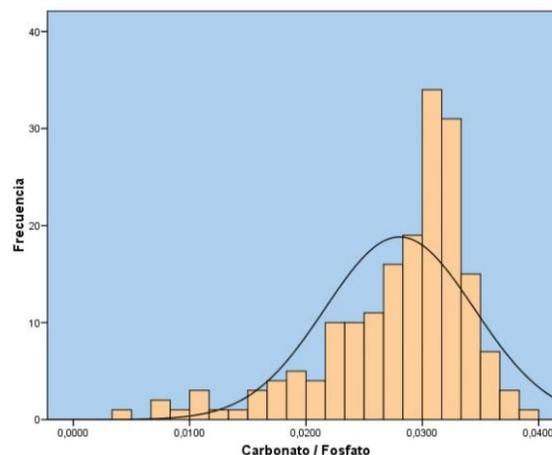


Figura 29. Distribución de la variable Carbonato/Fosfato

Las diferencias entre hombres y mujeres se reflejan en la Tabla 7. No hay diferencias importantes cuando se comparan ambas variables químicas según el sexo del paciente, (NS).

	Sexo		
	Hombres (n=70)	Mujeres (n=112)	
Mineral/matriz	4,32 (2,72-5,99)	3,98 (2,65-6,36)	NS
Carbonato/Fosfato	0,030 (0,025-0,032)	0,030 (0,026-0,032)	NS

Tabla 7. Variables químicas según sexo.
*mediana (rango inter-cuartílico)

Aunque no de suficiente entidad, se observa una ligera tendencia al aumento de la relación Mineral/matriz a medida que se incrementa la edad del paciente, (NS). Algo similar se aprecia en el aumento del cociente Carbonato/Fosfato con la edad, (NS). Se representan los gráficos de dispersión en las Figuras 30 y 31.

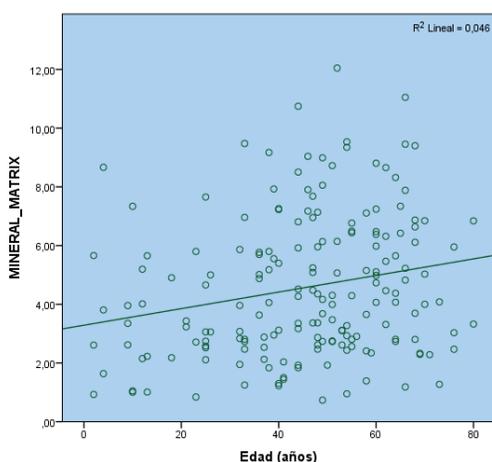


Figura 30. Distribución de los valores Mineral/matriz con la edad

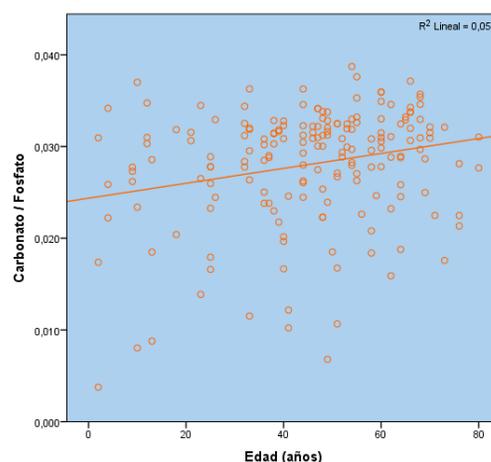


Figura 31. Distribución de los valores Carbonato/Fosfato con la edad

Cuando se estudian estas variables químicas según los grupos de edad (Tabla 8), se observa que los individuos de igual o más de 60 años de edad tienen valores significativamente más altos para los cocientes Mineral/matriz ($p=0,009$) y Carbonato/Fosfato ($p=0,026$) tal y como se representa en las Figuras 32 y 33.

	Grupo de edad		
	< 60 años (n=135)	≥ 60 años (n=47)	
Mineral/matriz	3,63 (2,58-5,80)	5,10 (3,33-6,84)	$p=0,009$
Carbonato/Fosfato	0,029 (0,024-0,033)	0,031 (0,028-0,033)	$p=0,026$

Tabla 8. Variables químicas según grupo de edad.
*mediana (rango inter-cuartílico)

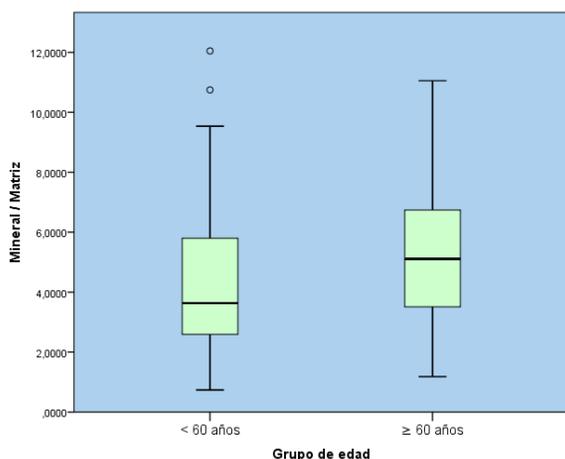


Figura 32. Valores de Mineral/matriz según el grupo de edad

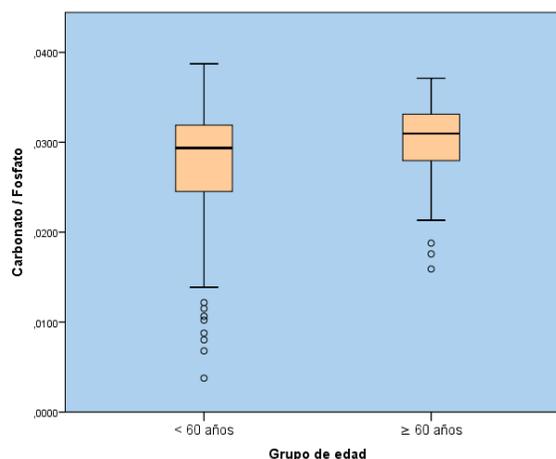


Figura 33. Valores de Carbonato/Fosfato según el grupo de edad

Las diferencias entre ambas variables químicas dependiendo del fragmento se reflejan en la tabla 9. Los valores de la relación Mineral/matriz son diferentes en su distribución en los tres fragmentos ($p=0,01$).

	Fragmento			
	1. Apófisis corta (n=59)	2. Cuerpo (n=71)	3. Apófisis larga (n=52)	
Mineral/matriz	4,17 (2,52-7,34)	4,88 (3,16-6,38)	3,08 (2,47-5,10)	$p=0,01$
Carbonato/Fosfato	0,031 (0,026-0,032)	0,031 (0,026-0,033)	0,029 (0,023-0,031)	NS

Tabla 9. Variables químicas según fragmento.
*mediana (rango inter-cuartílico)

La relación Mineral/matriz (Fig. 34) es significativamente menor en la apófisis larga que en la apófisis corta ($p=0,05$) y, sobre todo, menor que en el cuerpo del yunque ($p=0,001$).

Las diferencias en los resultados de la relación Carbonato/Fosfato según los fragmentos no son tan importantes de forma global, (NS). La relación Carbonato/Fosfato es algo menor en la apófisis larga que en el cuerpo del yunque (Fig. 35), (NS).

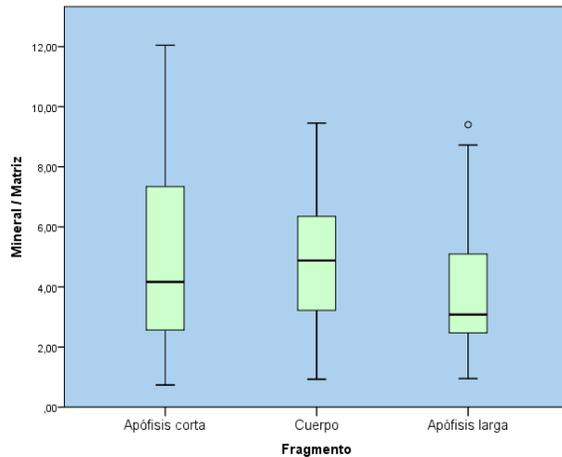


Figura 34. Distribución de la variable Mineral/matriz según el fragmento

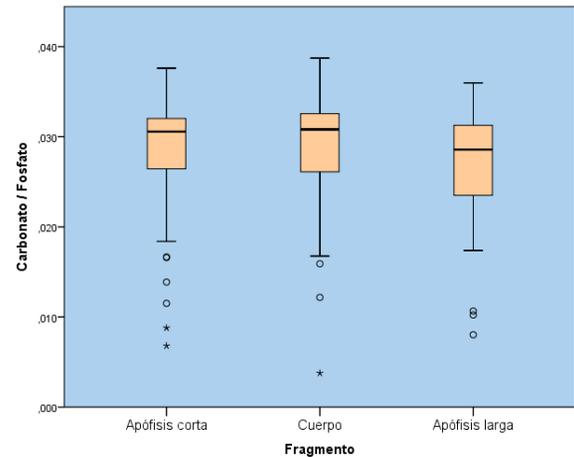


Figura 35. Distribución de la variable Carbonato/Fosfato según el fragmento

Se representan en la Tabla 10 los resultados del estudio de las variables químicas según la patología.

	Patología			
	Sanos (n=45)	Colesteatoma (n=42)	OMC (n=95)	
Mineral/matriz	4,00 (2,72-6,29)	3,74 (2,72-5,12)	4,66 (2,61-6,44)	NS
Carbonato/Fosfato	0,031 (0,026-0,033)	0,029 (0,023-0,033)	0,030 (0,025-0,032)	NS

Tabla 10. Variables químicas según patología.
*mediana (rango inter-cuartílico)

De forma general, la mineralización es ligeramente menor en colesteatoma, y ligeramente superior en Otitis Media Crónica, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. La carbonatación disminuye ligeramente en ambas patologías con respecto a los individuos sanos, aunque tampoco tiene significación estadística.

6.1.2 Estudio sobre yunque normal

En este grupo se estudiaron 15 yunques de características normales procedentes de cirugía otológica. Ninguno de los pacientes presentaba antecedentes de patología crónica de oído medio (Tabla 11).

Implante coclear	12
Carcinoma de parótida (vaciamiento petromastoideo)	1
Schwannoma vestibular (abordaje translaberíntico)	1
Mastoiditis aguda (mastoidectomía)	1

Tabla 11. Procedencia de las muestras

Los huesos fueron analizados al microscopio óptico para verificar que eran morfológicamente normales, sin lesiones en superficie, lisis o deformidades. Tras ello, fueron fragmentados mecánicamente en tres muestras: apófisis corta, cuerpo y apófisis larga.

6.1.2.1 Variables demográficas: edad y sexo

El rango de edad fue de 2 a 70 años, con una media de 44,7 (DE 21,5). En este caso no se corresponde con una distribución normal (Fig. 36).

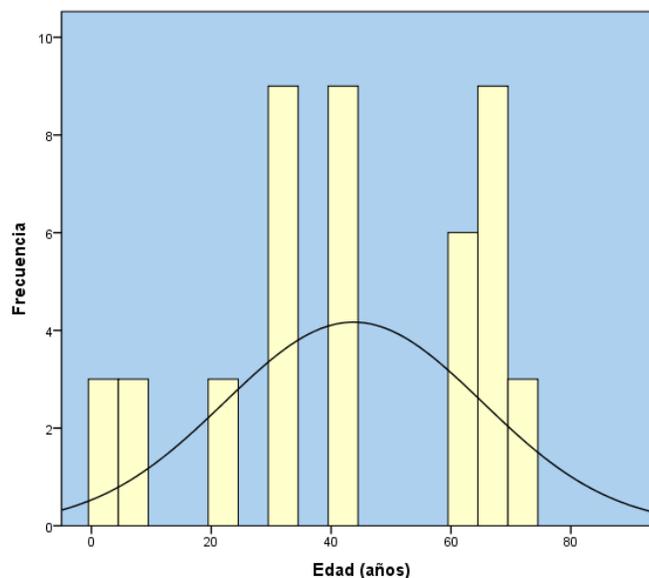


Figura 36. Histograma de frecuencias de la variable edad.

Por grupos de edad, 9 pacientes tenían menos de 60 años (60%) y 6 pacientes eran igual o mayores de 60 años (40%).

La distribución por sexos fue de 7 hombres (46,7%) frente a 8 mujeres (53,3%).

Se comprobó la ausencia de relación entre sexo y grupo de edad, (NS).

6.1.2.2 Variables topográficas: fragmento

Todos los yunques fueron segmentados en 3 fragmentos. No hay, por tanto, diferencias demográficas entre ellos.

6.1.2.3 Variables químicas: Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato

Los valores del cociente Mineral/matriz fueron de 4,49 de media (DE 2,49), con una distribución normal. Los valores de Carbonato/Fosfato fueron de 0,029 de media (DE 0,007) con una distribución no normal.

Se apreciaron valores de ambos índices algo mayores en mujeres que en hombres, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 12).

	Hombres Media (DE)	Mujeres Media (DE)	
Mineral/matriz	4,24 (2,32)	4,71 (2,67)	NS
Carbonato/Fosfato	0,027 (0,008)	0,030 (0,005)	NS

Tabla 12. Variables químicas según sexo.

Se observaron valores del cociente Mineral/matriz menores para la apófisis larga que en resto (especialmente el cuerpo), pero no tuvieron significación estadística. Los valores de Carbonato/Fosfato no difieren apenas entre los 3 fragmentos (Tabla 13).

	Apófisis corta Media (DE)	Cuerpo Media (DE)	Apófisis larga Media (DE)	
Mineral/matriz	4,55 (3,02)	4,93 (2,31)	4,00 (2,15)	NS
Carbonato/Fosfato	0,028 (0,008)	0,029 (0,008)	0,029 (0,006)	NS

Tabla 13. Variables químicas según fragmento.

Cuando se analizan los resultados de los cocientes Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato en relación con la edad, se observa un aumento de ambos a medida que lo hace la edad ($r=0,41$; $p=0,005$)($r=0,53$; $p<0,001$). La mineralización y la carbonatación del hueso parecen incrementarse progresivamente con la edad del sujeto (Fig. 37 y 38).

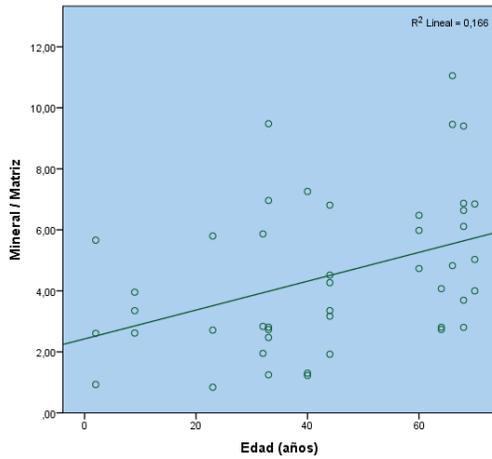


Figura 37. Distribución de la variable Mineral/matriz según la edad

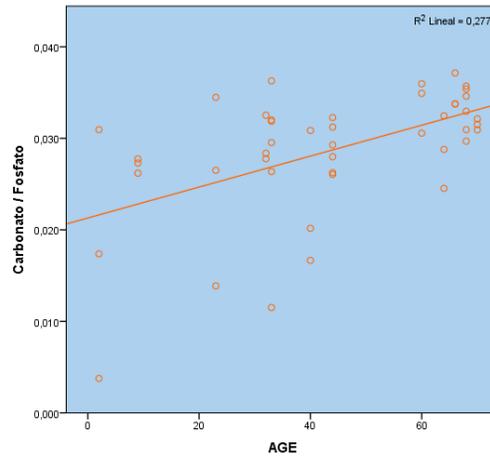


Figura 38. Distribución de la variable Carbonato/Fosfato según la edad

Aunque son evidentes estas diferencias, parece que los cambios en el índice Mineral/matriz suceden con más magnitud en los fragmentos 2 y 3 (cuerpo y apófisis larga) (Fig. 39), así como el incremento del cociente Carbonato/Fosfato es más intenso en el cuerpo del yunque que en el resto de fragmentos (Fig. 40).

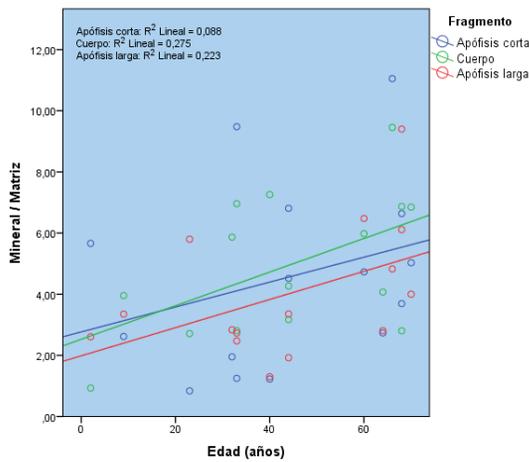


Figura 39. Correlación de Mineral/matriz según la edad y por fragmento

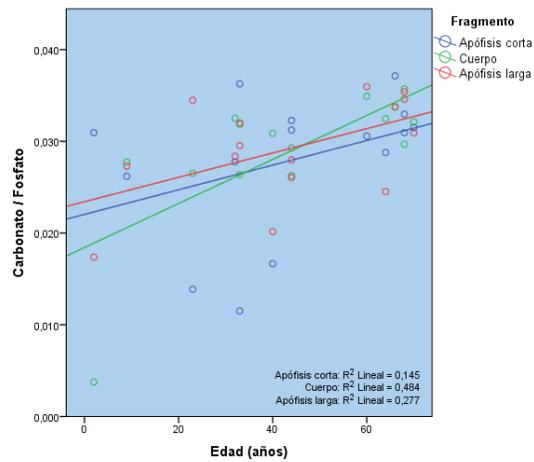


Figura 40. Distribución de Carbonato/Fosfato según la edad y por fragmento

Si comparamos los resultados de las variables químicas según los grupos de edad que habíamos establecido, se evidencian diferencias estadísticamente significativas (Tabla 14) en la mineralización y carbonatación, siendo superiores ambas en los pacientes de igual o más de 60 años de edad.

	Menos de 60 años Media (DE)	Igual o más de 60 años Media (DE)	
Mineral/matriz	3,65 (2,22)	5,75 (2,40)	p=0,004
Carbonato/Fosfato	0,026 (0,008)	0,033 (0,003)	p<0,001

Tabla 14. Variables químicas según grupo de edad.

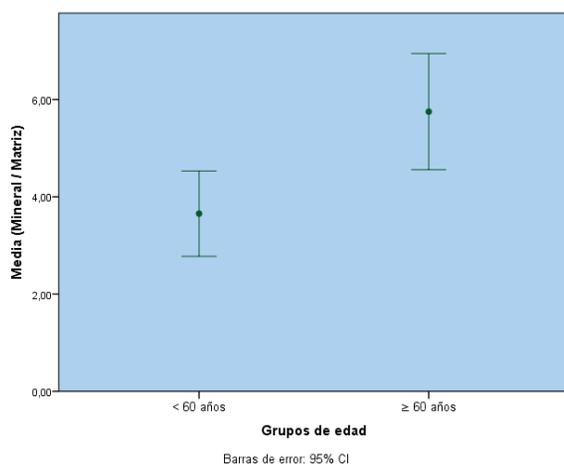


Figura 41. Medias de Mineral/matriz según el grupo de edad

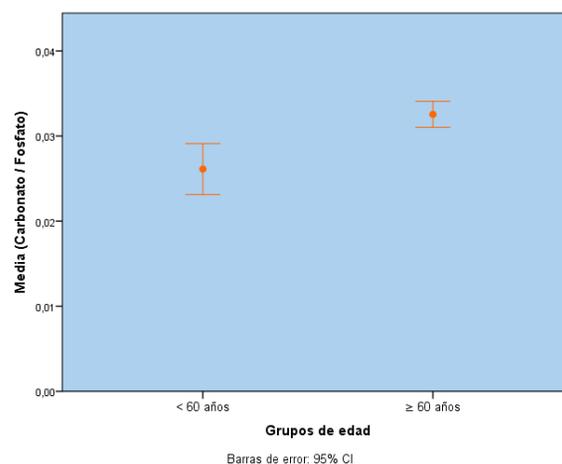


Figura 42. Medias de Carbonato/Fosfato según el grupo de edad

El aumento de la mineralización a partir de la sexta década de la vida ocurre fundamentalmente en la apófisis larga del yunque ($p=0,012$). La carbonatación se incrementa en pacientes mayores a costa fundamentalmente del cuerpo del osículo ($p=0,008$), aunque también es significativamente mayor en la apófisis larga ($p=0,05$). (Tabla 15 y Fig. 43–44).

		Menos de 60 años	Igual o más de 60 años	
		Media (DE)	Media (DE)	
Mineral/matriz	Y1	3,82 (3,00)	5,65 (2,96)	NS
	Y2	4,21 (2,11)	6,00 (2,34)	NS
	Y3	2,93 (1,26)	5,60 (2,30)	$p=0,012$
Carbonato/Fosfato	Y1	0,025 (0,009)	0,031 (0,003)	NS
	Y2	0,026 (0,009)	0,33 (0,002)	$p=0,008$
	Y3	0,027 (0,005)	0,033 (0,002)	$p=0,05$

Tabla 15. Variables químicas –segmentadas según fragmento– en cada grupo de edad.

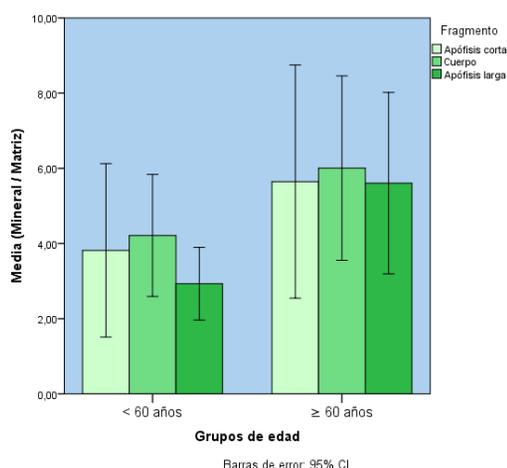


Figura 43. Medias de Mineral/matriz según grupo de edad y fragmento.

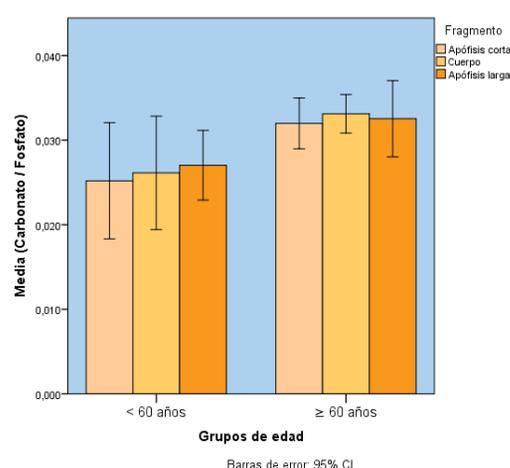


Figura 44. Medias de Carbonato/Fosfato según grupo de edad y fragmento.

Si analizamos los huesos de forma global (medias de los 3 fragmentos), hay diferencias significativas en los dos parámetros que vuelven a confirmar la existencia de cifras mayores en la relación Mineral/matriz en los yunques de ≥ 60 años ($p=0,026$) y valores más altos del cociente carbonato/fosfato en ≥ 60 años ($p=0,003$).

6.1.3 Estudio sobre hueso cortical

Además de los yunques normales y patológicos, se dispuso de 6 muestras de control para análisis mediante ATR-FTIR con la misma metodología. Dichos controles procedían de cortical mastoidea (1), cortical frontal (1) y hueso de CAE (4).

El rango de edades fue amplio [6-73] con una media de 45,7 años (DE 26,5). Sólo un paciente era varón frente a una mayoría de mujeres (83,3%).

Se presentan aquí los resultados obtenidos comparándolos con la serie de yunques normales:

	Yunque normal (n=45)	Hueso craneal (n=6)	
Mineral/matriz	4,49 (±2,49)	4,04 (±1,75)	NS
Carbonato/Fosfato	0,031 (0,026-0,032)	0,035 (0,031-0,041)	p=0,031

Tabla 16. Variables químicas en yunque normal y controles.

El cociente fosfato/amida I es menor en el hueso craneal que en los yunques aunque esta diferencia no es significativa, (NS).

El índice carbonato/fosfato es significativamente menor en los yunques analizados que en el hueso cortical craneal (p=0,031).

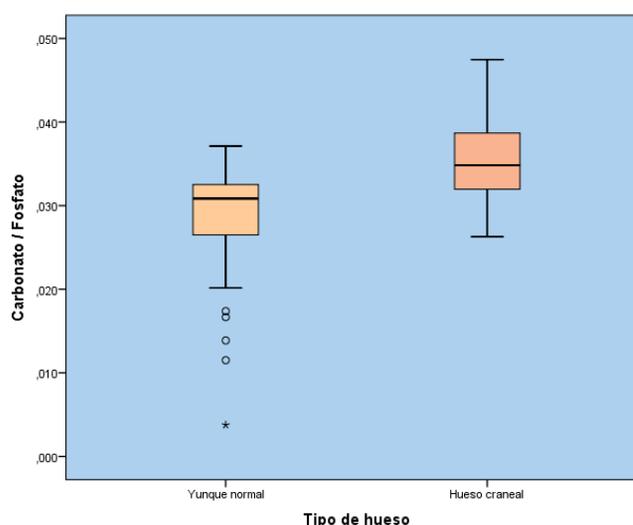


Figura 45. Resultados de Carbonato/Fosfato según tipo de hueso

6.1.4 Estudio sobre Colesteatoma

Se estudiaron 21 yunques procedentes de cirugía de oído medio de pacientes diagnosticados de otitis media colesteatomatosa.

En el examen con microscopio óptico se apreciaron diversos daños provocados por la enfermedad en los osículos, que tuvieron como consecuencia la ausencia total o parcial de algunos de sus elementos. Por esta razón, tras la segmentación de los huesos, de los 21 pacientes se obtienen solamente 42 fragmentos que conforman la muestra.

6.1.4.1 Variables demográficas: edad y sexo

El rango de edad fue de 4 a 80 años, con una media de 44,8 (DE 20,1). La mediana se situó en 48 años (RI 26-58). La variable no sigue una distribución normal (Figura 46).

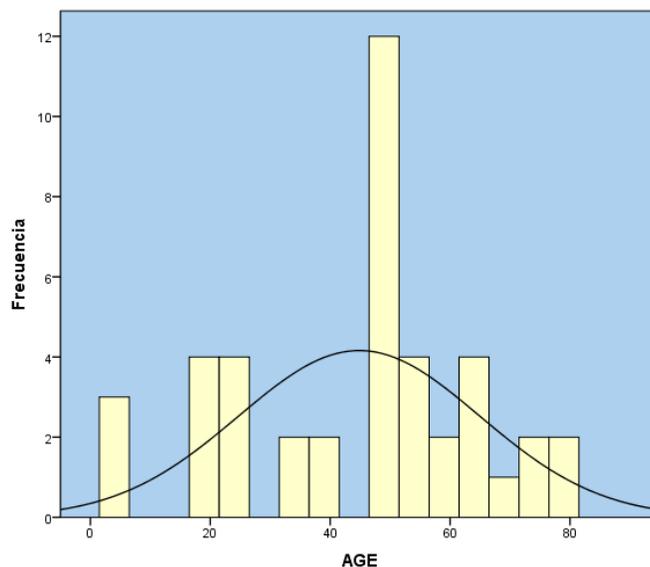


Figura 46. Histograma de frecuencias de la variable edad.

Trece muestras (31%) procedían de pacientes varones, mientras que 29 (69%) lo eran de mujeres.

Se aplica aquí también un punto de corte en la edad para componer dos grupos: el de edad menor de 60 años ($n=33$, 78,6%) y el de edad mayor o igual a 60 años ($n=9$, 21,4%), aunque es evidente su asimetría en esta muestra.

En el análisis inferencial se observa una asociación entre la variable sexo y la edad del paciente ($p=0,021$), pero no parece existir una gran asimetría cuando se analizan los 2 grupos de edad arriba mencionados, (NS).

6.1.4.2 Variables topográficas: fragmento

Debido al deterioro provocado por el colesteatoma, sólo en 3 casos se conservaba la estructura completa del osículo (cuerpo, apófisis corta y apófisis larga); en 10 se había destruido la apófisis larga; 5 tenían dañada la apófisis corta; y 3 de los huesecillos sólo conservaban el cuerpo.

La división de los yunques resulta en la formación de tres grupos según su topografía:

Fragmento	Frecuencia	Porcentaje
1. Apófisis corta	13	31%
2. Cuerpo	21	50%
3. Apófisis larga	8	19%
Total	42	100%

Tabla 17. Frecuencia de los fragmentos resultado de la división de las muestras.

La distribución por edad no difiere de forma significativa en los tres grupos (NS). Tampoco hay diferencias importantes en la distribución de los grupos de edad por cada fragmento (NS), aunque hay que resaltar que dentro del grupo ≥ 60 años ningún yunque conservaba la apófisis larga. Lo mismo ocurre con el sexo, que no posee diferencias de distribución significativas por cada fragmento (NS).

	1. Apófisis corta (n=13)	2. Cuerpo (n=21)	3. Apófisis larga (n=8)	
Media de edad (años)	46,7 \pm 22,2	46,5 \pm 19,7	37,4 \pm 18,3	NS
Grupo de edad < 60 años	9 (69,2%)	16 (76,2%)	8 (100%)	NS
Grupo de edad ≥ 60 años	4 (30,8%)	5 (23,8%)	0 (0,0%)	
Sexo Hombres	4 (30,8%)	7 (33,3%)	2 (25,0%)	NS
Sexo Mujeres	9 (69,2%)	14 (66,7%)	6 (75%)	

Tabla 18. Variables demográficas en relación con el fragmento.

6.1.4.3 Variables clínicas: evolución y grado de destrucción

De acuerdo con tiempo transcurrido desde el inicio de la clínica referida por el paciente y la cirugía, se establecen cuatro grupos de muestras según la evolución, tal y como se expresa en la Tabla 19.

	Frecuencia	Porcentaje
Menos de 5 años	17	40,5%
Entre 5 y 10 años	2	4,8%
Entre 10 y 20 años	11	26,2%
Más de 20 años	12	28,6%
Total	42	100,0%

Tabla 19. Frecuencia de los grupos de la variable evolución.

Como cabría de esperar, la media de edad aumenta a medida que aumenta el tiempo de evolución de la enfermedad ($p=0,002$) y el grupo de edad también se ve asociado ($p=0,04$). El sexo no parece interferir en la distribución, (NS). Tampoco lo hace la variable fragmento, (NS).

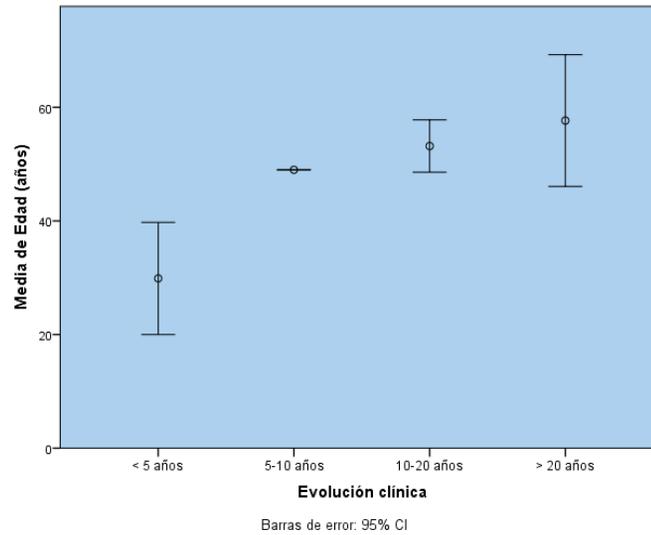


Figura 47. Media de edad por cada grupo de evolución

Según el grado de destrucción se divide la muestra en cuatro grupos tal y como se expone en la tabla X.

Grado de destrucción	Frecuencia	Porcentaje
Grado 1	9	21,4%
Grado 2	20	47,6%
Grado 3	10	23,8%
Grado 4	3	7,1%
Total	42	100,0%

Tabla 20. Frecuencia de los grupos de la variable *grado de destrucción*.

No hay una asociación importante en este caso con la variable edad (NS), ni tampoco con el sexo, (NS).

6.1.4.4 Variables químicas: Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato

Los valores de Mineral/matriz fueron de 4,18 de media (DE 1,99), con una distribución normal. Los valores de Carbonato/Fosfato fueron de 0,019 de media (DE 0,005) con una distribución no normal.

No se encontraron diferencias globales significativas en las relaciones Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato entre los 3 fragmentos (Tabla 21).

	Apófisis corta Media (DE)	Cuerpo Media (DE)	Apófisis larga Media (DE)	
Mineral/matriz	4,21 (2,13)	4,30 (1,88)	3,82 (2,28)	NS
Carbonato/Fosfato	0,028 (0,004)	0,028 (0,006)	0,028 (0,006)	NS

Tabla 21. Variables químicas según fragmento.

Tampoco hubo diferencias importantes de las medias de los parámetros químicos entre hombres y mujeres (Tabla 22).

	Hombres Media (DE)	Mujeres Media (DE)	
Mineral/matriz	4,34 (2,03)	4,11 (2,01)	NS
Carbonato/Fosfato	0,028 (0,006)	0,028 (0,005)	NS

Tabla 22. Variables químicas según sexo.

Teniendo en cuenta la edad de los pacientes, no se observa una correlación entre edad y los cocientes Mineral/matriz (NS) o Carbonato/Fosfato (NS).

Si analizamos los resultados en cada fragmento por separado, la relación Mineral/matriz aumenta ligeramente con la edad en apófisis corta ($r=0,55$; $p=0,049$) y apófisis larga (NS). En el cuerpo se observa un fenómeno inverso, (NS).

En el índice Carbonato/Fosfato se aprecia un fenómeno similar: el cociente aumenta con la edad en apófisis corta ($r=0,68$; $p=0,007$) y apófisis larga, (NS). En el cuerpo se observa un descenso progresivo con la edad ($r=0,53$; $p=0,014$).

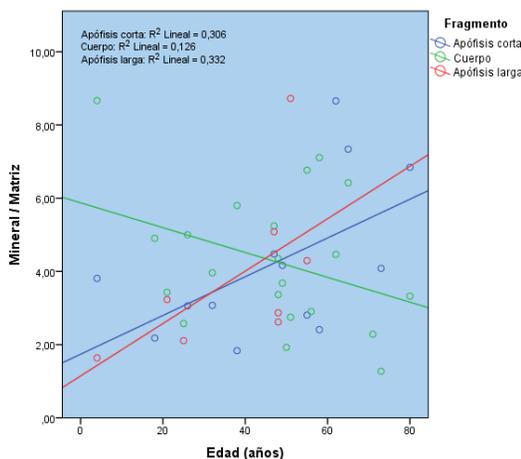


Figura 48. Correlación de Mineral/matriz según la edad y por fragmento

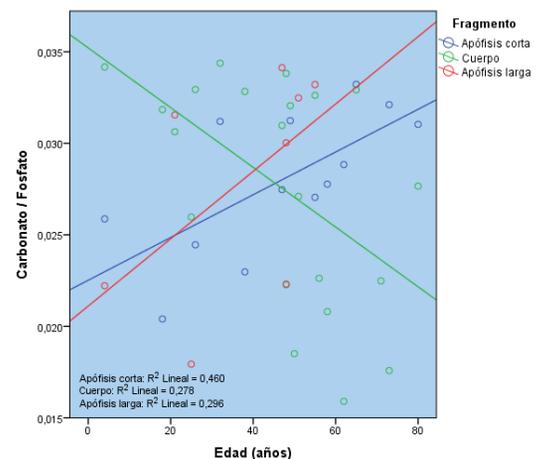


Figura 49. Distribución de Carbonato/Fosfato según la edad y por fragmento

En el análisis por evolución, no existen diferencias importantes con el transcurso de la enfermedad, (NS). No obstante, se comprueba que la apófisis larga aumenta su relación Mineral/matriz ($p=0,036$) y Carbonato/Fosfato ($p=0,036$) si han pasado más años desde el inicio de la clínica. Se comparan aquí sólo dos grupos de evolución puesto que en el resto de categorías no se conservaba, ya que en todos los yunques había sido destruida (Tabla 24).

	< 5 años Media (DE)	5-10 años Media (DE)	10-20 años Media (DE)	> 20 años Media (DE)	
Mineral/matriz	3,94 (2,02)	3,92 (0,34)	4,30 (2,08)	4,46 (2,16)	NS
Carbonato/Fosfato	0,027 (0,006)	0,032 (0,001)	0,028 (0,005)	0,029 (0,005)	NS

Tabla 23. Resultados globales según el tiempo de evolución.

	< 5 años Media (DE)	5-10 años Media (DE)	10-20 años Media (DE)	> 20 años Media (DE)	
Mineral/matriz	2,49 (0,63)	-	6,03 (2,36)	-	$p=0,036$
Carbonato/Fosfato	0,025 (0,006)	-	0,033 (0,001)	-	$p=0,036$

Tabla 24. Resultados de apófisis larga según el tiempo de evolución.

En el estudio por grado de destrucción, se aprecia un descenso en la relación Mineral/matriz a medida que avanza –o es más agresiva– la destrucción ósea, (NS). Existe un descenso menos expresivo en la relación Carbonato/Fosfato a medida que avanza la destrucción ósea, (NS). Comparando el grado 1 (conserva las tres apófisis) con el grado 4 (sólo conserva el cuerpo) se aprecia más el descenso en la relación Mineral/matriz (NS) y en la de Carbonato/Fosfato ($p=0,036$).

	Grado 1 Media (DE)	Grado 2 Media (DE)	Grado 3 Media (DE)	Grado 4 Media (DE)	
Mineral/matriz	4,75 (2,07)	4,48 (2,02)	3,60 (1,90)	2,37 (0,50)	NS
Carbonato/Fosfato	0,030 (0,004)	0,028 (0,006)	0,027 (0,005)	0,021 (0,002)	NS

Tabla 25. Resultados globales según el grado de destrucción.

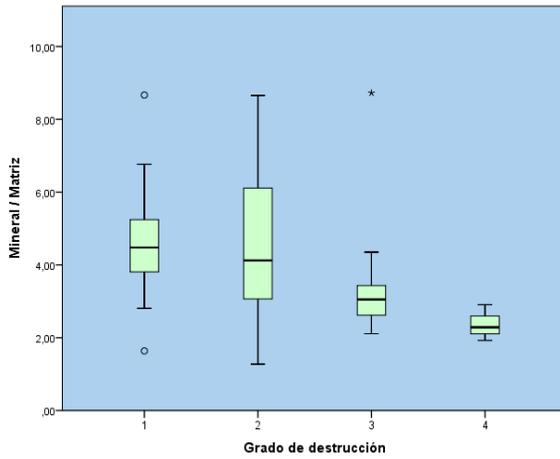


Figura 50. Valores de Mineral/matriz según el grado de destrucción.

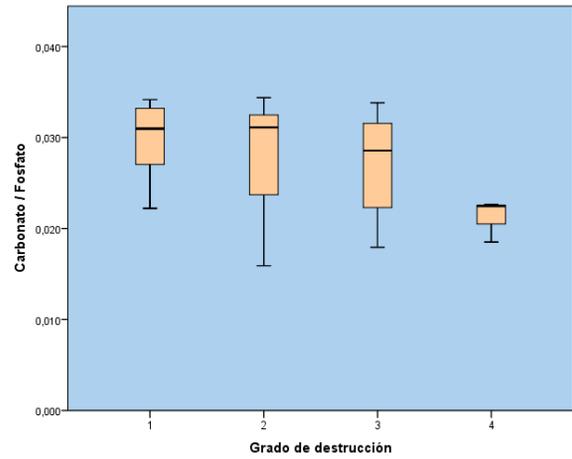


Figura 51. Valores de Carbonato/Fosfato según el grado de destrucción.

Si se realiza un análisis aislado del cuerpo del yunque, presente en todos los grupos, se revelan resultados significativos en el cociente Mineral/matriz. No así, en este caso en el Carbonato/Fosfato.

	Grado 1 Media (DE)	Grado 2 Media (DE)	Grado 3 Media (DE)	Grado 4 Media (DE)	
Mineral/matriz	6,89 (1,71)	4,59 (1,68)	3,30 (0,70)	2,37 (0,50)	p=0,005
Carbonato/Fosfato	0,033 (0,002)	0,028 (0,007)	0,028 (0,004)	0,021 (0,002)	NS

Tabla 26. Resultados del cuerpo del yunque según el grado de destrucción.

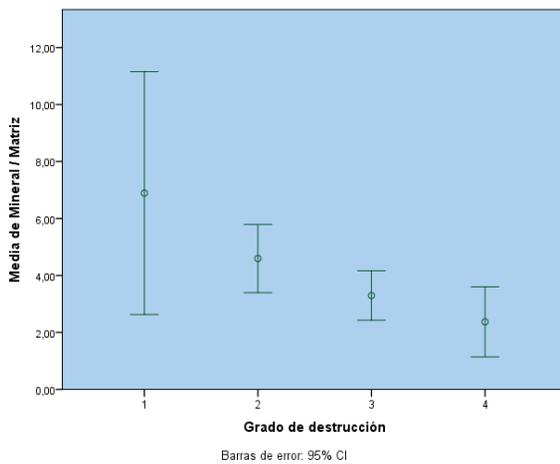


Figura 52. Medias de Mineral/matriz en el cuerpo del yunque según el grado de destrucción.

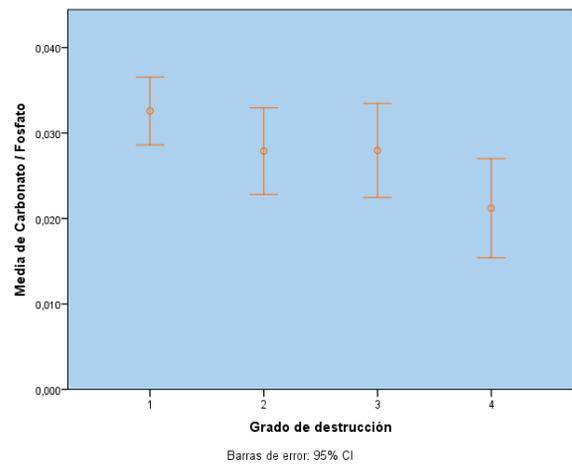


Figura 53. Medias de Carbonato/Fosfato en el cuerpo del yunque según el grado de destrucción.

6.1.5 Estudio sobre Otitis Media Crónica

Se estudiaron 35 yunques procedentes de cirugía de oído medio de pacientes diagnosticados de otitis media crónica no colesteatomatosa (OMC).

En el estudio óptico inicial se objetivaron daños provocados por la enfermedad en algunos yunques. En 4 casos se había producido la lisis completa de la apófisis larga, mientras que en otros 2 sólo persistía un remanente del cuerpo. Por esta razón, tras la segmentación de los huesos, de los 35 pacientes se obtienen 97 fragmentos que conforman la muestra.

6.1.5.1 Variables demográficas: edad y sexo

El rango de edad fue de 10 a 76 años, con una media de 46,1 (DE 15,7). La mediana se situó en 49 años (RI 38–46,5). La variable no sigue una distribución normal (Figura X).

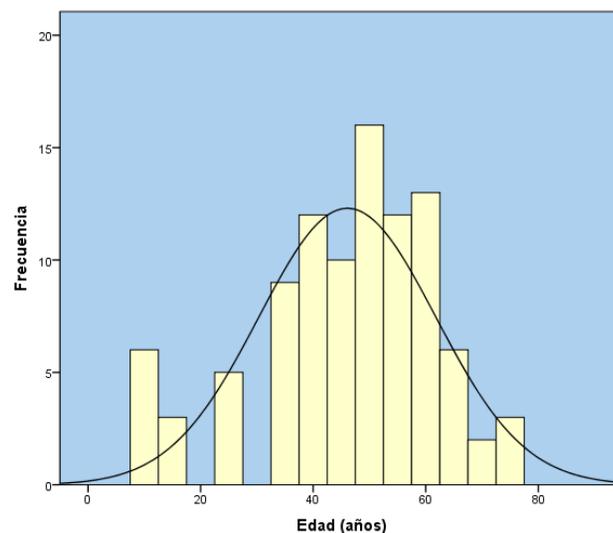


Figura 54. Histograma de frecuencias.

La distribución por sexos fue de 36 muestras de hombres (37,1%) frente a 61 de mujeres (62,9%).

Utilizando el punto de corte en la edad descrito anteriormente, se forman dos grupos: el de edad menor de 60 años ($n=77$, 79,4%) y el de edad mayor o igual a 60 años ($n=20$, 20,6%).

En el análisis inferencial no se aprecia relación entre la variable sexo y la edad del paciente (NS), aunque se comprueba que la distribución de sexos en cada grupo de edad es asimétrica ($p=0,001$).

Grupo de edad			Sexo		Total
			Hombres	Mujeres	
< 60 años	Recuento	22	55	77	
	Porcentaje	28,6%	71,4%	100,0%	
	≥ 60 años	Recuento	14	6	20
		Porcentaje	70,0%	30,0%	100,0%
Total	Recuento	36	61	97	
	Porcentaje	37,1%	62,9%	100,0%	

Tabla 27. Distribución de la variable *sexo* en cada grupo de edad.

6.1.5.2 Variables topográficas: fragmento

En 4 pacientes con Otitis Media Crónica se había destruido la apófisis larga, en otros 2 sólo se conservaba el cuerpo del yunque.

La división de estos yunques resulta en la formación de tres grupos según su topografía:

Fragmento	Frecuencia	Porcentaje
1. Apófisis corta	33	34,0%
2. Cuerpo	35	36,1%
3. Apófisis larga	29	29,9%
Total	97	100,0%

Tabla 28. Frecuencia de los fragmentos resultado de la división de las muestras.

Tal y como se muestra en la Tabla 29, la distribución por edad es similar en los tres grupos. Tampoco hay diferencias en la distribución de los grupos de edad por cada fragmento. Lo mismo ocurre con el sexo, que no posee diferencias de distribución por cada fragmento.

	1. Apófisis corta (n=33)	2. Cuerpo (n=35)	3. Apófisis larga (n=29)		
Media de edad (años)	46,1 ± 16,0	46,4 ± 15,7	45,72 ± 16,0	NS	
Grupo de edad	< 60 años	26 (33,8%)	28 (36,4%)	23 (29,9%)	NS
	≥ 60 años	7 (35,0%)	7 (35,0%)	6 (30,0%)	
Sexo	Hombres	12 (33,3%)	14 (38,9%)	10 (27,8%)	NS
	Mujeres	21 (34,4%)	21 (34,4%)	19 (31,1%)	

Tabla 29. Variables demográficas en relación con el fragmento.

6.1.5.3 Variables clínicas: evolución, diagnóstico secundario

Según la evolución de la enfermedad se identificaron, se establecen cuatro grupos de muestras según la evolución, tal y como se expresa en la Tabla 30.

	Frecuencia	Porcentaje
Menos de 5 años	15	15,5%
Entre 5 y 10 años	30	30,9%
Entre 10 y 20 años	36	37,1%
Más de 20 años	16	16,5%
Total	97	100,0%

Tabla 30. Frecuencia de los grupos de la variable *evolución*.

En este caso no se aprecia una correlación entre el tiempo de evolución de la enfermedad y la edad del paciente, (NS). Tampoco entre el grupo de edad y la evolución, aunque hay que resaltar que entre las muestras de menos de 5 años de evolución no había ningún paciente igual o mayor a 60 años, (NS). La predominancia del sexo femenino observada previamente no es uniforme en todos los grupos de evolución, siendo minoritaria en el grupo 2 ($p < 0,001$). El fragmento se distribuye de forma homogénea en todos los grupos, (NS).

Además del diagnóstico de OMC, se realizó un diagnóstico complementario según los hallazgos obtenidos en la exploración clínica y quirúrgica:

- *Esclerosis timpánica* en 12 pacientes (35,3%).
- *Supuración crónica* en 8 pacientes (23,5%).
- *Perforación timpánica* en 20 pacientes (58,8%).

Anterior	4	11,8%
Posterior	6	17,6%
Subtotal	10	29,4%

- *Atelectasia timpánica* en 10 pacientes (29,4%).

Grado 1	0	0%
Grado 2	1	2,9%
Grado 3	5	14,7%
Grado 4	4	11,8%

Dado que los resultados del análisis por estos parámetros no fueron relevantes, no se incluyen los datos estadísticos

6.1.5.4 Variables químicas: Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato

Los valores de Mineral/matriz fueron de 4,77 de media (DE 2,54), mientras que los resultados globales de Carbonato/Fosfato fueron de 0,028 de media (DE 0,007), ambas con una distribución no normal.

No existe correlación entre la edad y los parámetros químicos analizados, (NS). Esta característica se repite por cada uno de los fragmentos, (NS). Tampoco son importantes las diferencias de Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato entre ambos grupos de edad, (NS).

Las distribuciones de ambos parámetros no se diferencian significativamente entre uno y otro sexo, (NS).

En este caso, al contrario que en los estudios anteriores, se encontraron diferencias significativas en las medias de las relaciones Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato entre los 3 fragmentos tal y como se refleja en la Tabla 31.

	Apófisis corta Media (DE)	Cuerpo Media (DE)	Apófisis larga Media (DE)	
Mineral/matriz	5,51 (3,21)	5,13 (2,04)	3,55 (1,80)	p=0,011
Carbonato/Fosfato	0,028 (0,007)	0,029 (0,005)	0,026 (0,007)	p=0,023

Tabla 31. Variables químicas según fragmento.

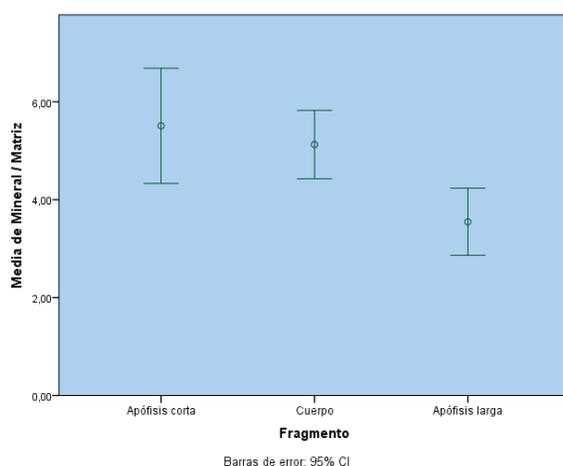


Figura 55. Media de Mineral/matriz según el fragmento.

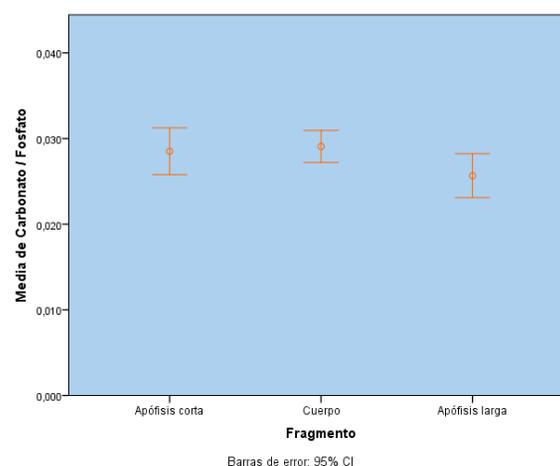


Figura 56. Media de Carbonato/Fosfato según el fragmento.

Se encontraron diferencias en las medias de los parámetros químicos entre los grupos de evolución de la enfermedad. En la relación Mineral/matriz no hubo significación estadística entre los diferentes grupos, (NS). Por el contrario, en el cociente Carbonato/Fosfato sí se apreciaron diferencias entre las medias de los grupos ($p=0,038$). Aun así, no se comprueba una linealidad en los resultados (Fig. 57, 58).

	< 5 años Media (DE)	5-10 años Media (DE)	10-20 años Media (DE)	> 20 años Media (DE)	
Mineral/matriz	4,75 (2,94)	3,96 (2,44)	4,94 (2,24)	5,95 (2,68)	NS
Carbonato/Fosfato	0,031 (0,004)	0,025 (0,008)	0,028 (0,007)	0,030 (0,003)	$p=0,038$

Tabla 32. Resultados según el tiempo de evolución.

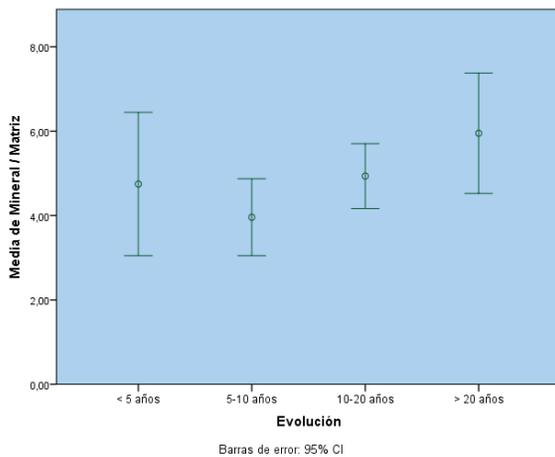


Figura 57. Media de Mineral/matriz según la evolución.

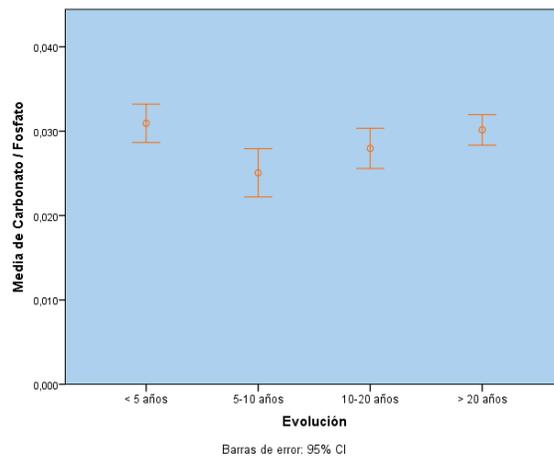


Figura 58. Media de Carbonato/Fosfato según la evolución.

Como se mencionó anteriormente, no se encontraron diferencias importantes en las variables químicas según la presencia de diagnósticos secundarios como timpanosclerosis, supuración crónica, perforación o atelectasia.

6.2 ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y ANÁLISIS DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (SEM-EDX)

6.2.1 Estudio de la relación Ca/P en el hueso yunque

6.2.1.1 Variables demográficas: edad y sexo

Para este estudio se utilizó una muestra de 62 yunques procedentes de pacientes con un rango de edad de 2 a 82 años. La media se situó en 45,5 años, con una desviación estándar de 21,1 años. La distribución cumple los criterios de normalidad (Fig. 59).

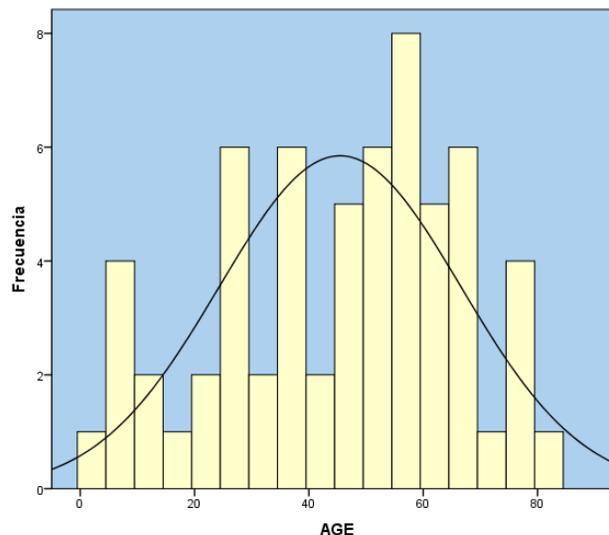


Figura 59. Histograma de frecuencias de edad.

La distribución por sexos fue de 31 mujeres (50%) frente a 31 varones (50%).

No existe una diferencia significativa en la edad de los pacientes en función de su sexo (hombres $44,3 \pm 22,2$ años, mujeres $46,6$ años $\pm 20,3$; NS).

6.2.1.2 Variables clínicas: patología

De la muestra de 2 pacientes, 16 de ellos eran huesos sanos (procedentes todos ellos de cirugías de implante coclear), 12 se extrajeron de oídos con colesteatoma y 28 procedían de pacientes con otitis media crónica.

	Frecuencia	Porcentaje
Sanos	23	37,1%
Colesteatoma	15	24,2%
Otitis Media Crónica	24	38,7%
Total	62	100,0%

Tabla 33. Distribución de los pacientes según la patología.

No existen diferencias importantes en las medias de edad de los diferentes grupos clínicos, (NS). Tampoco la distribución por sexos se diferencia de forma significativa en los tres grupos, (NS).

6.2.1.3 Variables químicas: relación Calcio/Fósforo

La media de la relación Ca/P en la muestra analizada fue de 1,67 (DE 0,30). El valor mínimo fue de 1,238 y el máximo de 2,337. La muestra sigue una distribución normal (Fig. 60).

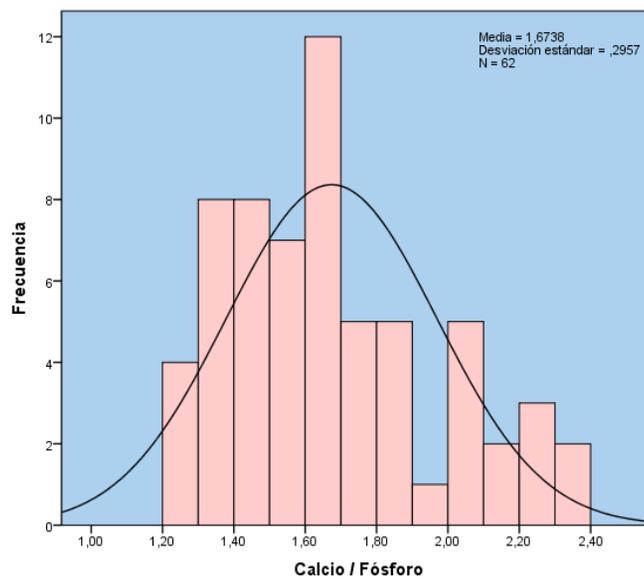


Figura 60. Histograma de frecuencias de Ca/P

La media de Ca/P fue de 1,66 (DE 0,32) en el grupo de hombres y de 1,68 (DE 0,50) en de mujeres, (NS).

La relación Ca/P parece mantenerse con la edad del paciente tal y como se observa en el gráfico de dispersión, (NS).

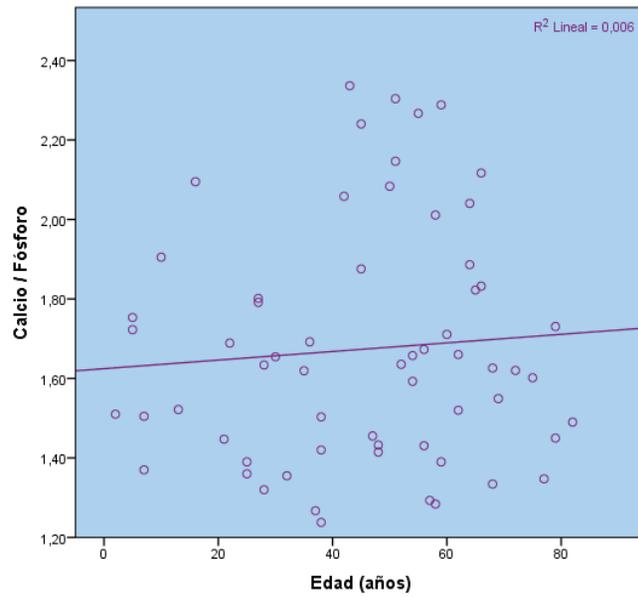


Figura 61. Distribución de los valores Ca/P según la edad

La media del cociente Calcio/Fósforo en los huesos sanos fue significativamente menor que en los patológicos, tal y como se expone en la Tabla 34. Entre las dos patologías no existieron diferencias importantes, (NS).

	Sanos Media (DE)	Colesteatoma Media (DE)	Otitis Media Crónica Media (DE)	
Calcio/Fósforo	1,53 (0,24)	1,72 (0,29)	1,78 (0,30)	p=0,009

Tabla 34. Medias de Ca/P según los grupos de patología.

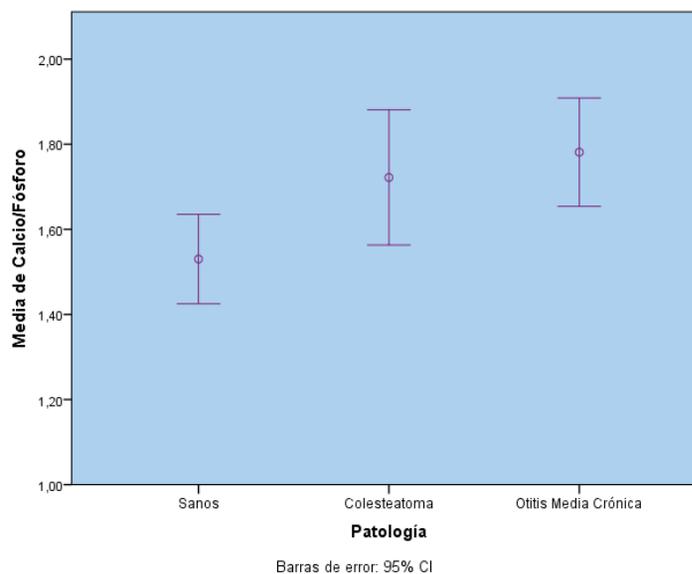


Fig 62. Resultados de Ca/P según los grupos de patología

6.2.2 Estudio de la relación Ca/P en la porción distal de la rama larga del yunque

6.2.2.1 Variables demográficas: edad y sexo

Para este experimento se estudiaron 26 yunques de pacientes con un rango de edad de 5 a 68 años. La media fue de 44,12 años (DS 17,49). Esta variable sigue una distribución normal (Fig. 63).

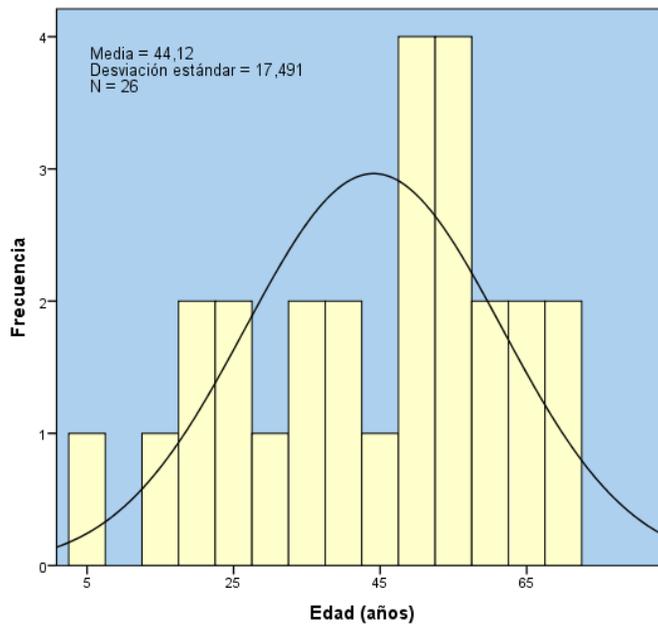


Figura 63. Histograma de frecuencias de la variable edad.

La distribución por sexos fue de 12 hombres (46,2%) frente a 14 mujeres (53,8%).

Entre los varones la media de edad se situó en $43,0 \pm 17,5$ años, mientras que en el grupo de mujeres la edad se promedió en $45,1 \pm 18,0$ años. No existen diferencias significativas entre ambos grupos, (NS).

6.2.2.2 Variables clínicas: patología

El grupo de los huesos sanos estaba compuesto por 10 piezas (38,5%), mientras que se dispusieron 16 huesos patológicos (61,5%) con un diagnóstico de Otitis Media Crónica en el otro grupo.

En el grupo de huesos sanos la media de edad se situó en $39,7 \pm 21,8$ años, mientras que en el grupo de huesos patológicos la media estuvo en $46,9 \pm 14,3$ años, (NS).

La distribución por sexos difiere entre el grupo de huesos sanos, donde predomina el sexo masculino (60%) y el grupo de yunques patológicos, donde ocurre lo contrario (62,5% de sexo femenino). Aun así, las diferencias no son importantes para el estudio, (NS).

		Sexo		Total
		Hombres	Mujeres	
Sanos	Recuento	6	4	10
	Porcentaje	60,0%	40,0%	100,0%
OMC	Recuento	6	10	16
	Porcentaje	37,5%	62,5%	100,0%
Total	Recuento	12	14	26
	Porcentaje	46,2%	53,8%	100,0%

Tabla 35. Tabla de contingencia de patología y sexo.

Se recogieron datos en la historia clínica sobre el comienzo de la sintomatología de cada uno de los pacientes, hallando así el tiempo estimado de evolución de la enfermedad (Tabla 36).

		Frecuencia	Porcentaje
SANOS		10	38,5
PATOLÓGICOS (evolución)	<5 años	1	3,8
	5-10 años	5	19,2
	10-20 años	6	23,1
	>20 años	4	15,4
Total		26	100,0

Tabla 36. Distribución según la evolución de la enfermedad.

Dentro del grupo de huesos patológicos, 12 de ellos tenían perforación timpánica (46% del total) y otros cuatro no. La media de edad no difirió de forma significativa entre el grupo de perforados y el de no perforados ($47,3 \pm 14,5$ y $39,7 \pm 21,8$; NS). Tampoco la distribución de la variable sexo tuvo diferencias de consideración entre los dos grupos, (NS).

6.2.2.3 Variables químicas: relación Calcio/Fósforo

La media de la relación Ca/P fue de $1,80 \pm 0,40$. El valor mínimo fue de 1,24 y el máximo llegó a 2,82. La mediana se situó en 1,69 (1,46 – 2,12). La variable no sigue una distribución normal (Figura 64).

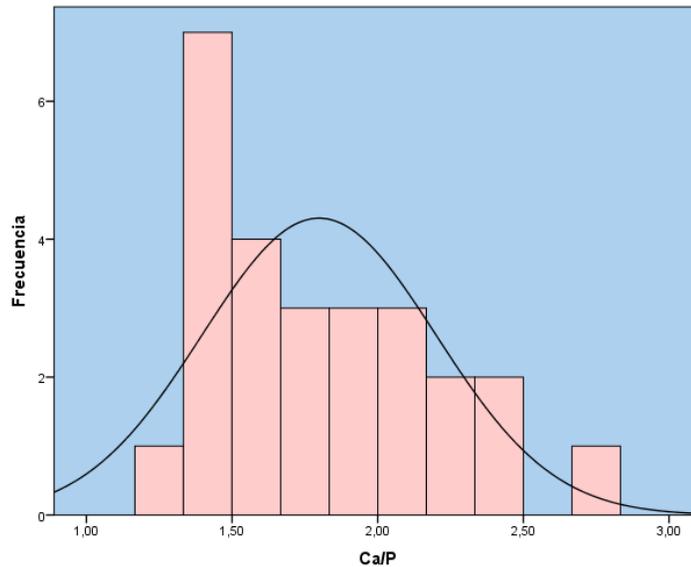


Figura 64. Histograma de frecuencias de Ca/P

No se observaron diferencias en las medias de Ca/P ambos sexos. La relación Ca/P parece homogénea a lo largo de las diferentes edades estudiadas (Fig. 65).

En este estudio la relación entre Calcio y Fósforo no cambia en la apófisis larga de los yunques que sufren procesos inflamatorios crónicos. No hay diferencias significativas entre el grupo de sanos y enfermos (Tabla 38).

Tampoco se aprecian cambios importantes según el tiempo de evolución de la enfermedad (NS), ni con la presencia de perforación (NS).

	Hombres	Mujeres	
	Mediana (RI)	Mediana (RI)	
Calcio/Fósforo	1,62 (1,42-2,26)	1,69 (1,53-1,99)	NS

Tabla 37. Valores de Ca/P según la variable sexo.

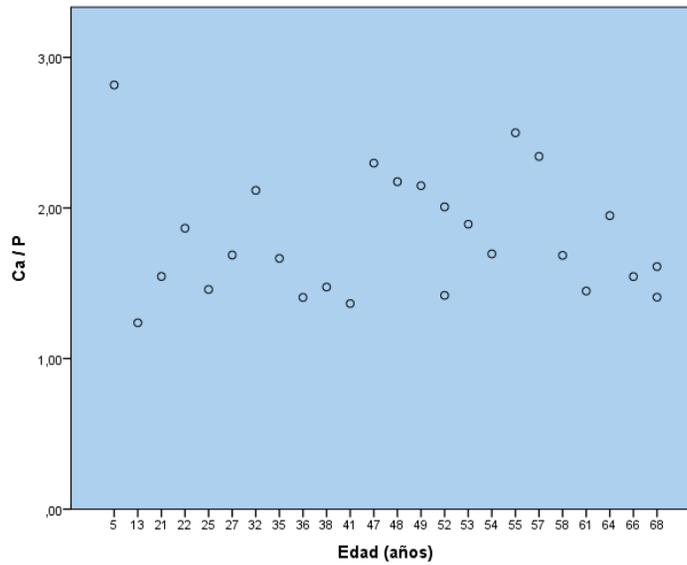


Figura 65. Distribución de Ca/P por edad

	Sanos	Patológicos	
	Mediana (RI)	Mediana (RI)	
Calcio/Fósforo	1,61 (1,46–2,17)	1,78 (1,43–2,11)	NS

Tabla 38. Valores de Ca/P según la variable patología.

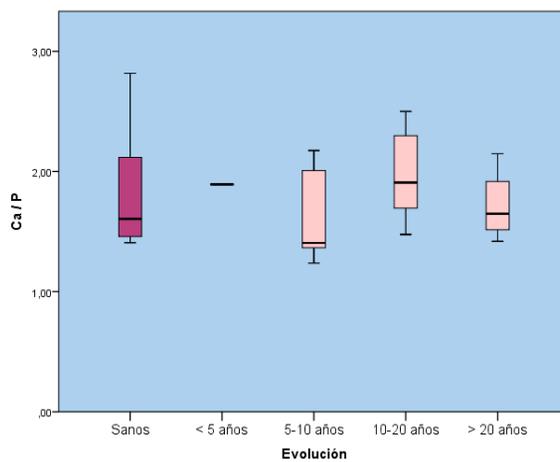


Figura 66. Distribución de Ca/P por grupos de evolución

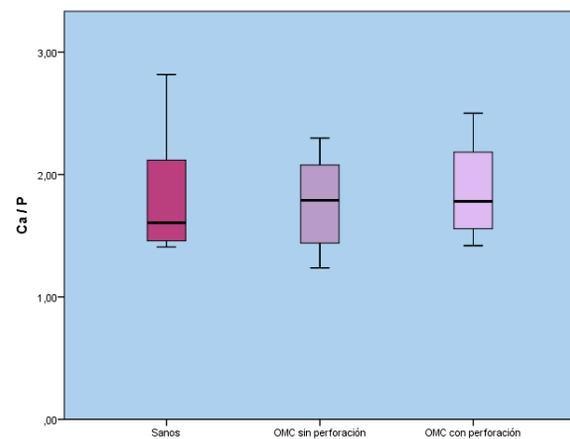


Figura 67. Distribución de Ca/P según la presencia de perforación

6.2.3 Estudio SEM-EDX del yunque normal

La muestra de 23 yunques normales procedía de pacientes con edades comprendidas entre los 2 y los 82 años, con una media de edad de $40,7 \pm 26,1$ años. Los huesos fueron extraídos de 9 mujeres (39,1%) y 14 varones (60,9%). La distribución por edad y sexo se representa en las Figuras 68 y 69.

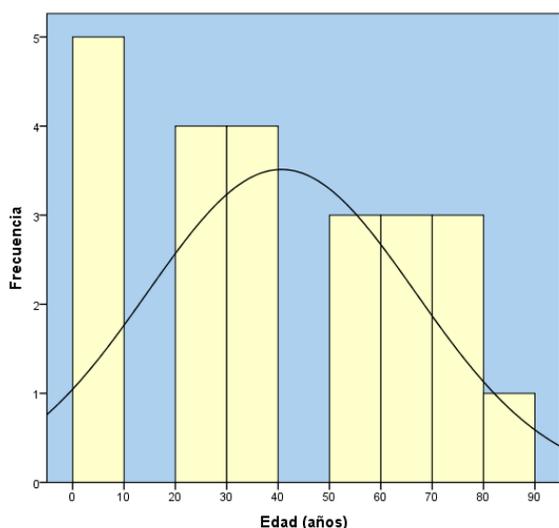


Figura 68. Histograma de frecuencias

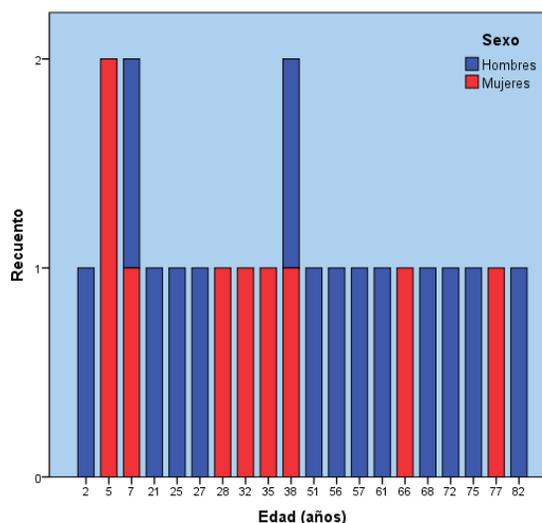


Figura 69. Distribución de sexo por edad.

6.2.3.1 Análisis de superficie

Características anatómicas

En términos generales, los yunques analizados poseen una morfología similar entre sí con unas dimensiones estables a lo largo de la edad del paciente. Existe cierta variabilidad en la forma de la apófisis corta que –en ocasiones– presenta un aspecto más alargado con una hendidura en la parte inferior, entre ésta y el cuerpo del yunque. La *crus longum* nace del cuerpo del yunque, bajo la articulación incudomaleolar, en un cono grueso que pronto se adelgaza hasta que distalmente aparece la apófisis lenticular en su cara medial. La longitud de la apófisis larga y su grosor, sí que difiere significativamente de unos a otros pacientes, aunque no parece tener relación con el sexo o la edad del individuo.

La apófisis lenticular es la estructura del yunque que más diverge morfológicamente en las piezas examinadas. Tanto por su forma (con la superficie articular redonda, oval, etc..) como por su tamaño, se observan diferentes disposiciones (Figs. 70–73). Por lo general, la apófisis lenticular nace del punto más distal de la *crus longum* (Fig. 74), pero otras veces lo hace antes (Fig. 75).

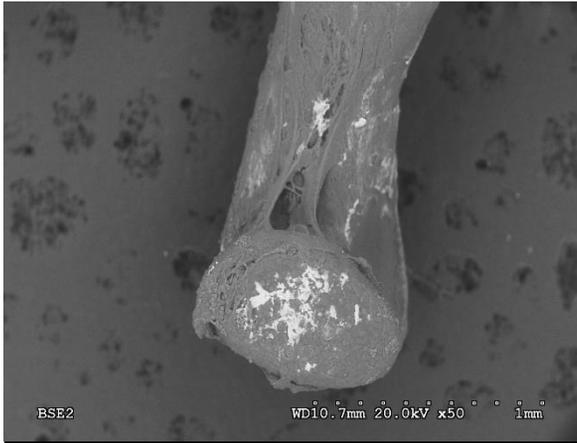


Figura 70. Ap. lenticular de un hombre de 57 años.

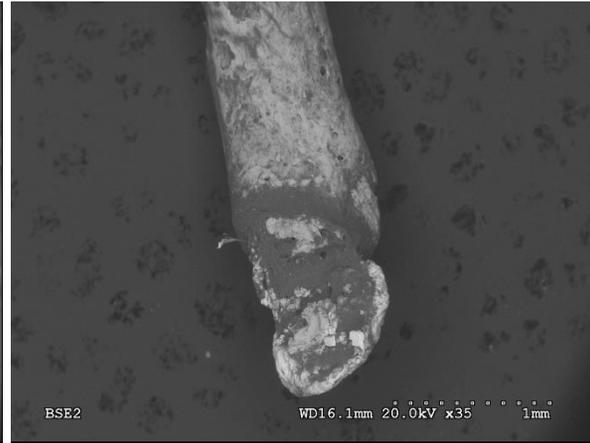


Figura 71. Ap. lenticular de un hombre de 21 años.

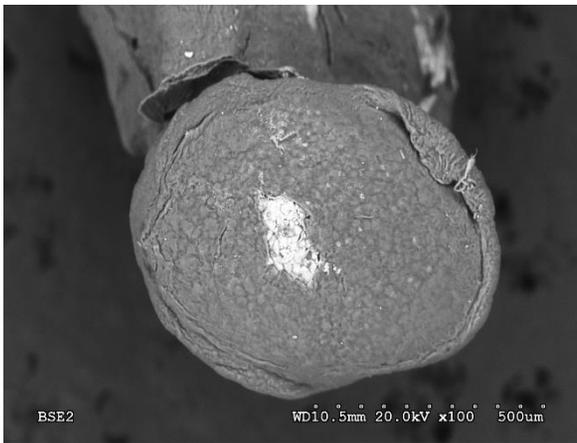


Figura 72. Ap. lenticular de una mujer de 66 años.

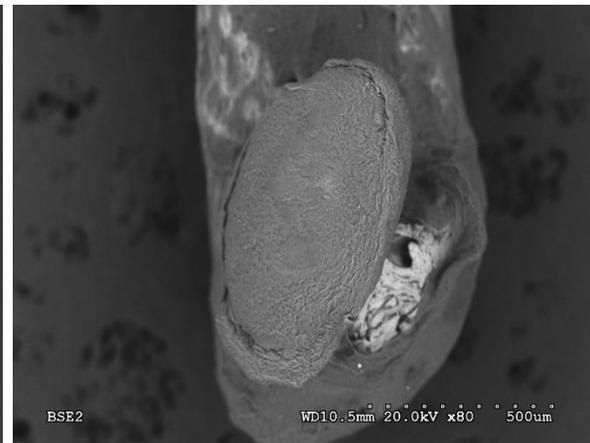


Figura 73. Ap. lenticular de una mujer de 32 años.

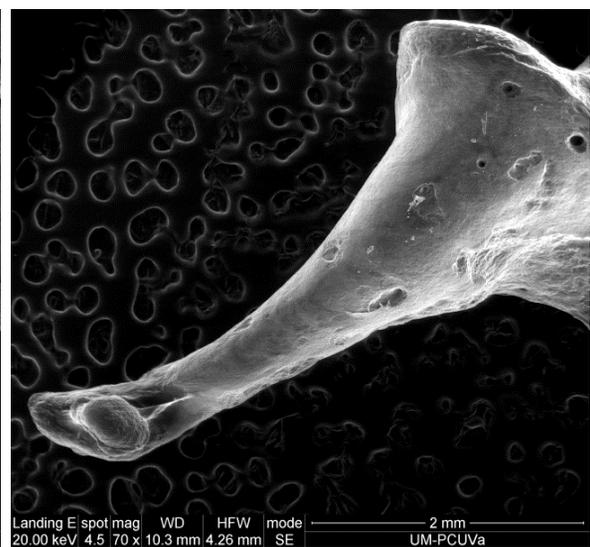
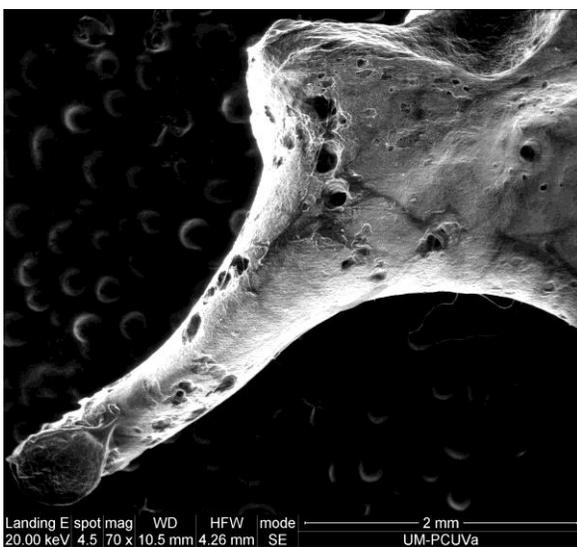


Figura 74-75. Dos yunques donde la apófisis lenticular se “acopla” a diferente nivel en el extremo de la rama larga del yunque.

Características histológicas

La inspección de la superficie revela fundamentalmente –bajo una cubierta de tejido de revestimiento– una estructura fibrilar compleja, que domina la mayor parte del hueso. El empleo de energía retrodispersada (BSED) para generar la imagen permite la visualización de forma más nítida del tejido óseo mineralizado y, así, apreciar su textura y sus cambios, en aquellas partes en las que la cubierta conectiva del pericondrio (Fig. 76) se ha eliminado por completo.

Esta estructura fibrilar, que caracteriza la superficie del tejido óseo mineralizado en los huesos analizados, no aparece en las superficies articulares, en las que –bajo el cartílago– se aprecia un tejido óseo mucho más compacto, como se aprecia en la Figura 77.

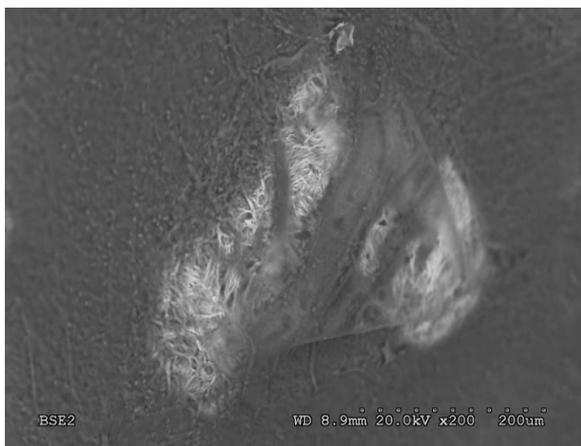


Figura 76. Detrás de las capas superficiales de mucosa, pericondrio y fibras de Sharpey se comienza a apreciar (con el uso de BSED) la estructura de fibras del tejido óseo rico en calcio.

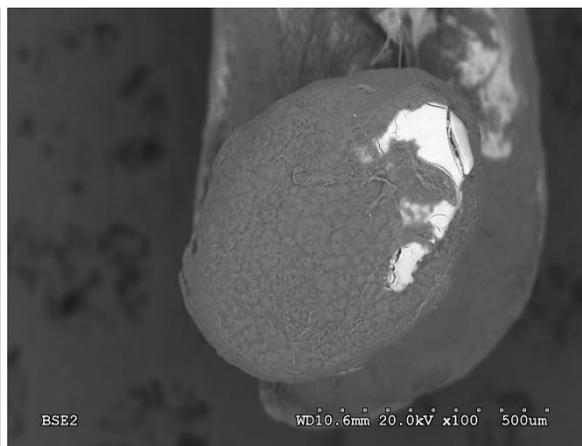


Figura 77. Apófisis lenticular. Bajo la cubierta de cartílago se aprecia un tejido óseo muy compacto y rico en calcio.

Tampoco esa distribución fibrilar está presente en las zonas de anclaje ligamentoso, especialmente en el ligamento posterior del yunque. Como se observa en las Figuras 78–79, en esta zona medial e inferior de la apófisis corta del yunque la superficie del tejido óseo se dispone con una forma en empedrado.

Los huesos están perforados de forma variable por vasos nutricios de diferente calibre y se presentan en cualquier área del hueso excepto en las superficies articulares y las uniones ligamentosas. Estos vasos recorren la superficie del osículo provocando ocasionalmente horadaciones en forma de surco y formando una red vascular que los nutre (Figs. 80–81). Algunos vasos poseen un grosor considerable y forman grandes cavernas en el interior del hueso (Fig. 83). Pero la mayoría son pequeños orificios vasculares distribuidos por todo el osículo, apreciándose una mayor confluencia en la zona más superior del cuerpo del yunque (Fig. 82).

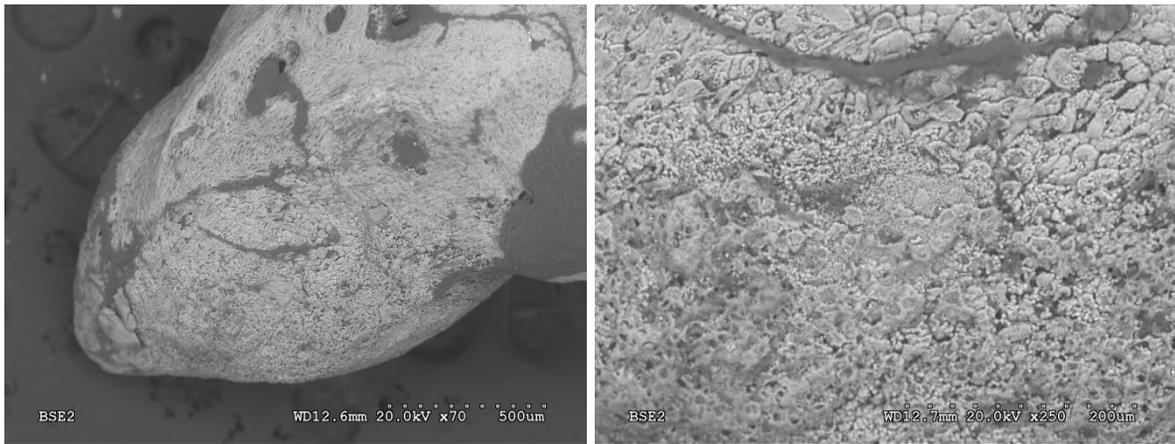


Figura 78-79. Zona de inserción del ligamento posterior del yunque en su apófisis corta. Detalle de la superficie del tejido óseo mineralizado.

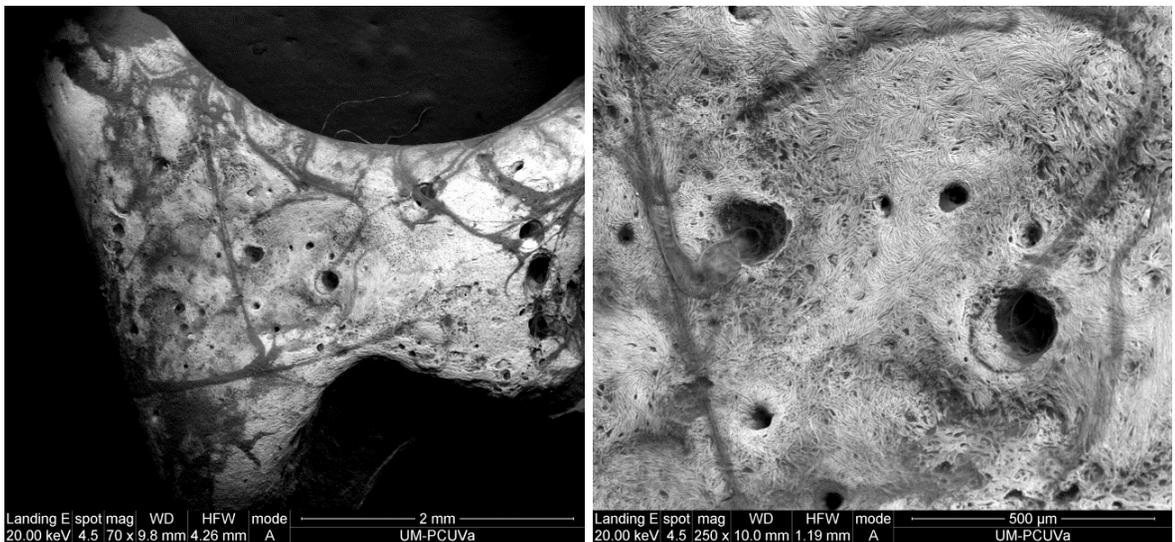


Figura 80-81. Yunque de un varón de 82 años con múltiples agujeros vasculares por donde penetra una serie de vasos que forman una red vascular que se puede apreciar en la imagen y su ampliación.

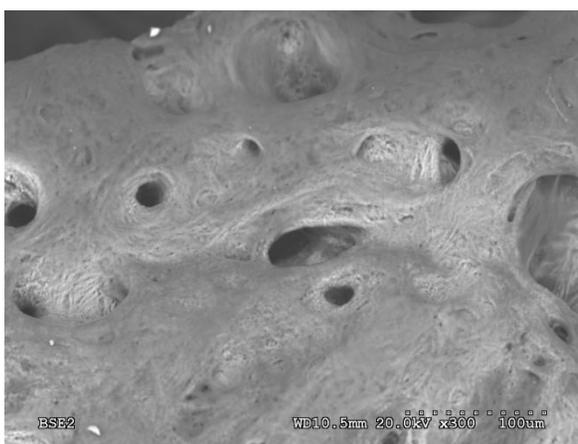


Figura 82. Agujeros vasculares múltiples en la cara superior del yunque.



Figura 83. Gran foramen vascular en la zona distal de la *crus longum*, justo antes de la apófisis lenticular.

En dos piezas se realizó un corte mecánico, a nivel de la unión de ambas apófisis –corta y larga– con el cuerpo, para observar la estructura interna. Se puede apreciar que la mayor parte del hueso es compacto, existiendo alguna laguna interna y los diversos canales vasculares que atraviesan el huesecillo de forma variable.

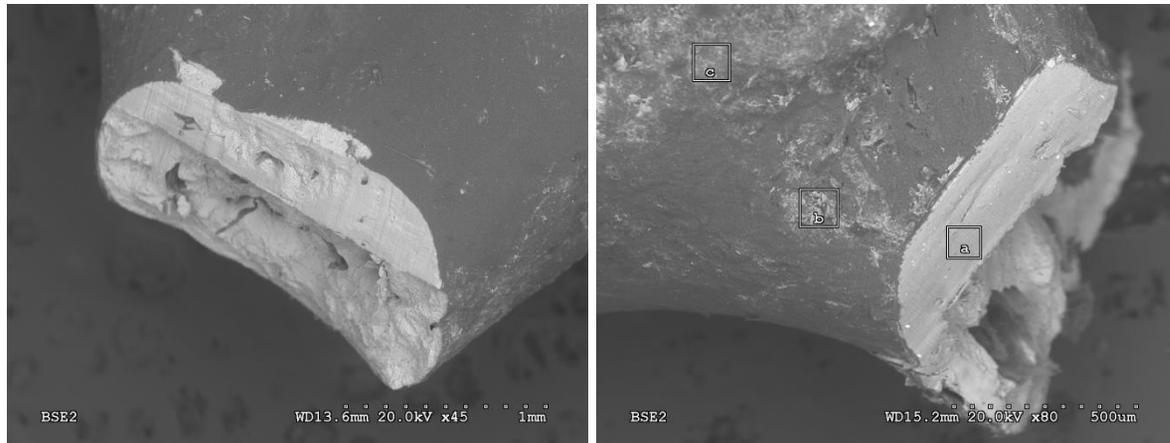


Figura 84–85. Cortes efectuados en la unión del cuerpo con la apófisis corta (a) y apófisis larga (b) del yunque, donde se aprecia el hueso compacto y los canales de su interior.

Estructura fibrilar

Por lo general las fibras se distribuyen aleatoriamente de forma entrecruzada (Fig. 86), repitiéndose este patrón por toda la superficie del hueso, exceptuando las áreas anteriormente descritas. En las zonas más estables del cuerpo estas fibras muestran una disposición algo más organizada, con figuras entrelazadas siguiendo patrones que se repiten como si un trabajo de cestería se tratase (Fig. 89). En la cara superior del yunque esta organización en entrelazado se combina con un patrón de valles y crestas.



Figura 86. Patrón fibrilar en el cuerpo del yunque.

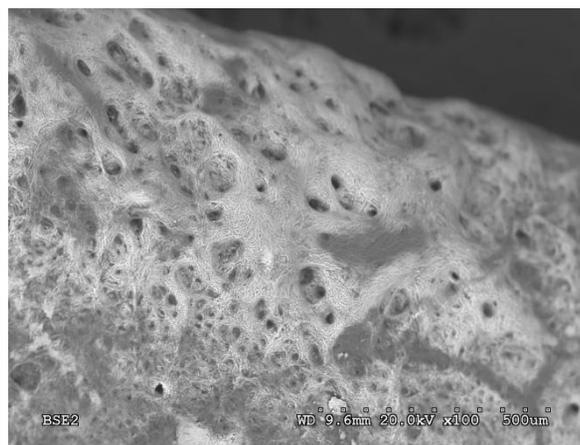


Figura 87. Patrón en crestas y valles de la cara superior en relación con numerosos orificios vasculares.



Figura 88. Patrón fibrilar aleatorio.

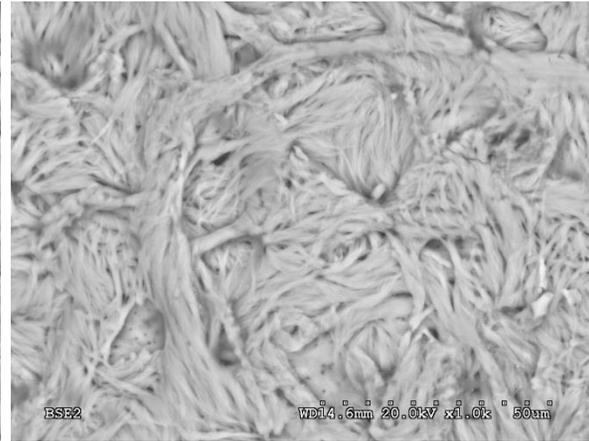


Figura 89. Las fibras se agrupan aquí formando capas de fibras entretreídas

Las fibras de colágeno calcificadas se disponen característicamente de forma circular alrededor de los agujeros vasculares. En algunos de ellos se puede apreciar que esta alineación entrelazada se continúa hacia el fondo del foramen vascular (Figs. 90–92). También siguen una disposición concéntrica alrededor de las superficies articulares, en especial en la faceta incudomaleolar (Fig. 94). En otras ocasiones aparecen organizadas de forma más lineal, paralelas entre ellas, especialmente en la apófisis larga. Esta disposición longitudinal no sólo ocurre en superficie, es un patrón generalizado en la *crus longum*, donde las fibras se organizan paralelas al eje principal de la apófisis. Este hecho se ha comprobado al visualizar zonas internas de la rama larga del yunque a través de agujeros vasculares (Fig. 83) y en zonas de remodelación de yunques sanos, así como en áreas de destrucción de huesos patológicos (se tratará más adelante).

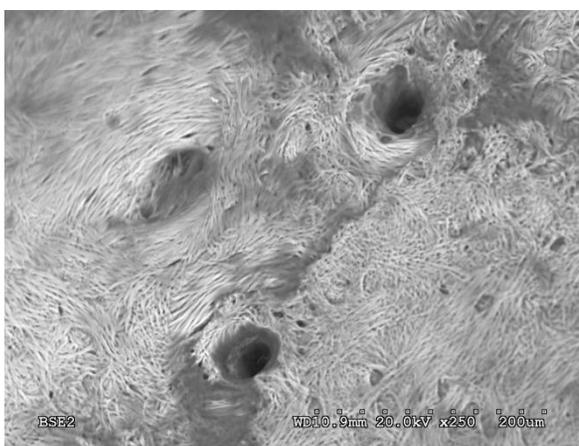


Figura 90. Foramina nutricia en el cuerpo del yunque.

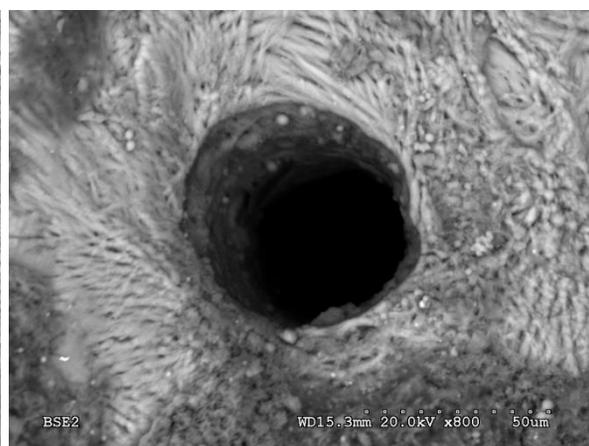


Figura 91. Fibras arrolladas alrededor de un agujero vascular.

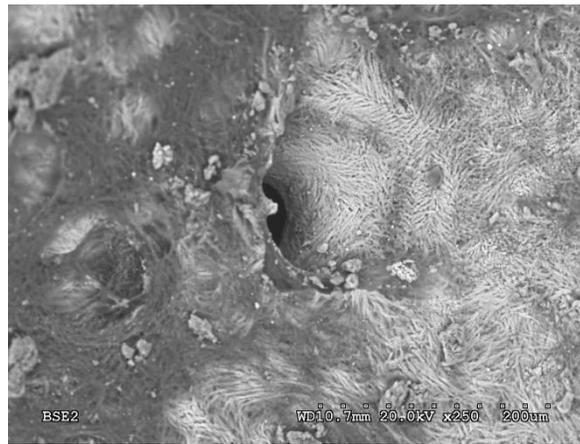


Figura 92. Las fibras entrelazadas se arrollan hacia el interior de este orificio vascular.

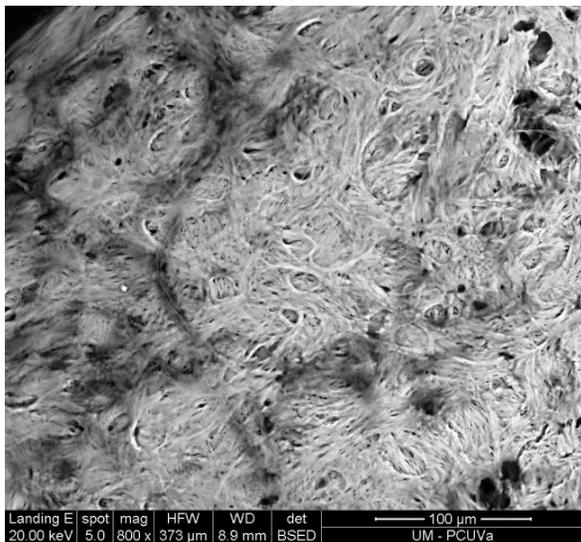


Figura 93. Tejido óseo estable con fibras que se disponen entrecruzadas en varias capas.

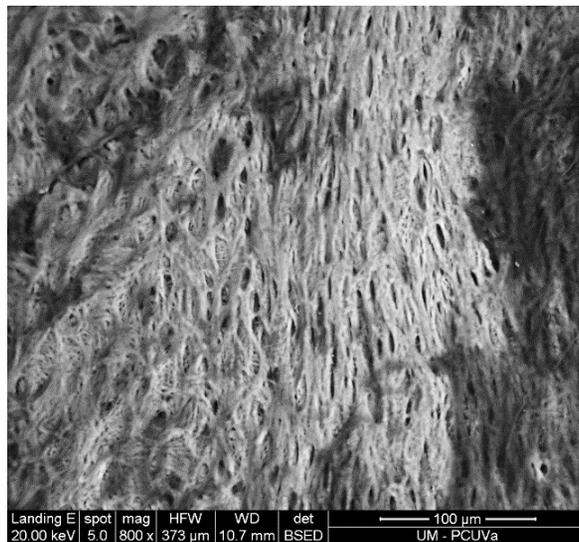


Figura 94. Fibras paralelas circunferenciales a la faceta de la articulación incudomaleolar (dcha).

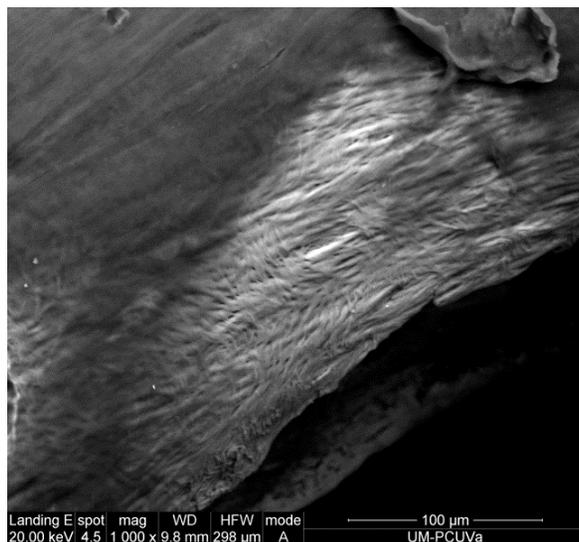
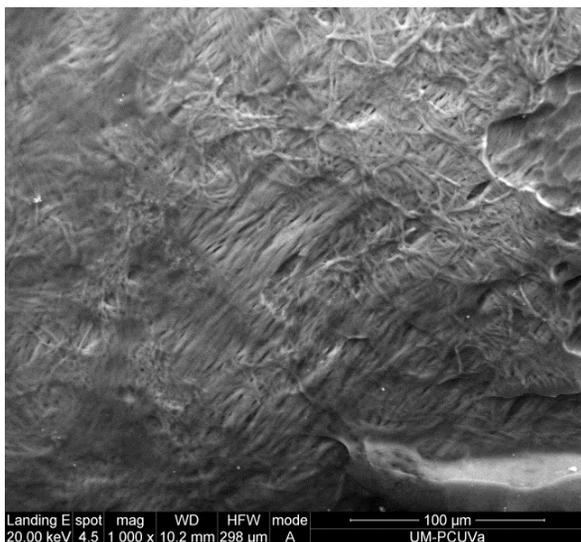


Figura 95-96. Patrón longitudinal de las fibras en la apófisis larga que se puede observar en esta pieza.

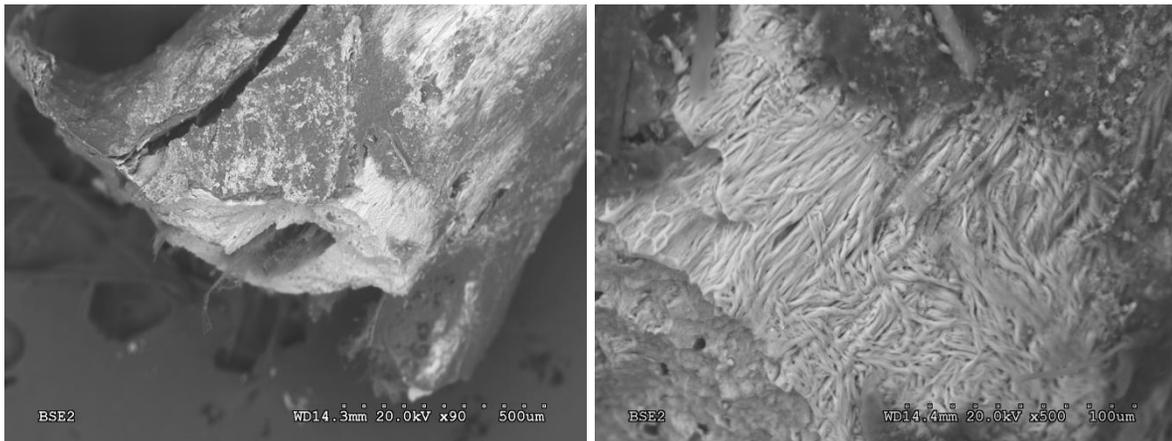


Figura 97-98. *Crus longum* fragmentada de la base del cuerpo donde se observa la disposición de las fibras paralelas y con la dirección que sigue la apófisis.

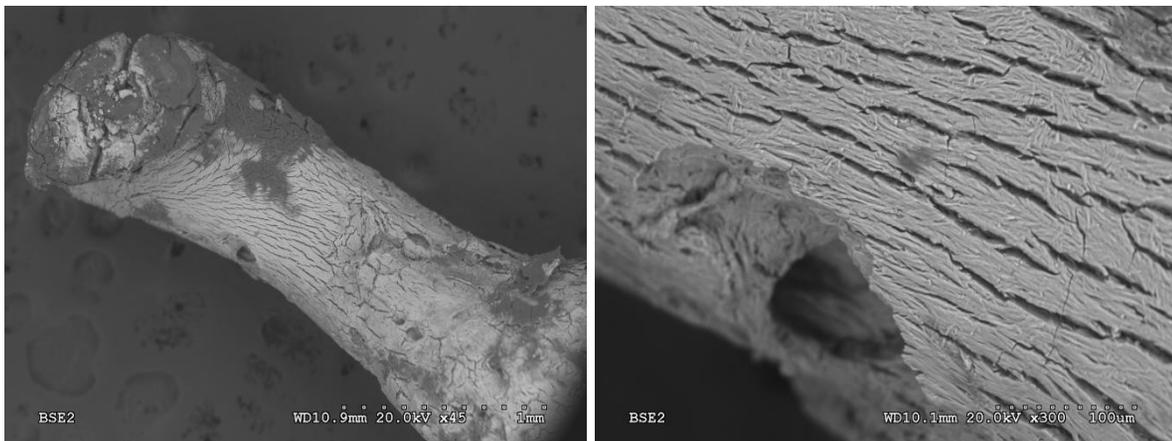


Figura 99-100. Pieza agrietada por un error en la preparación de la muestra. Obsérvese, en la cara medial de esta apófisis larga, la distribución paralela a su eje de las fibras resquebrajadas.

Además de la disposición fibrilar entrecruzada, se pudo observar en todas las piezas analizadas un patrón de resorción osteoclástica. La acción de los osteoclastos origina una serie de horadaciones características (lagunas de Howship). Estas lagunas de unas 10-20 micras de diámetro aparecen en grupos más o menos extensos en la superficie del hueso (Fig. 101) o en lagunas más profundas (Fig. 102).

La actividad resortiva se presenta en diferentes grados y en determinadas localizaciones preferentemente. El lugar más frecuente de resorción es la apófisis larga, seguida por la parte inferior del cuerpo, mientras que aparece menos intensamente en la apófisis corta y la parte craneal del osículo.

Las áreas de actividad osteoclástica son, según lo observado, más frecuentes en individuos jóvenes, en los que parece existir un recambio óseo más intenso (Figs. 103, 104). En los pacientes de mayor edad, la remodelación ósea no desaparece y se siguen observando lagunas de Howship, aunque algo menos numerosas.

Alrededor de los *foramina nutricia* también se pueden observar zonas de actividad osteoclástica, algo que está presente en todas las edades y afecta –sobre todo– a los orificios vasculares de cuerpo y *crus longum* (Figs. 105, 106).

El área más intensamente afectada por esta remodelación a lo largo de todas las edades es el extremo distal de la apófisis larga (Figs. 107–108). Aquí aparecen intensos focos resortivos osteoclásticos, que provocan en ocasiones grandes erosiones y cavidades.

Estas zonas de remodelación ósea pueden llegar a ser –en algunos casos– muy agresivas en apariencia. En ocasiones, esta agresividad en la apófisis larga llega a provocar la desconexión con la apófisis lenticular, hecho que sólo se ha observado en individuos mayores y no a edades jóvenes.

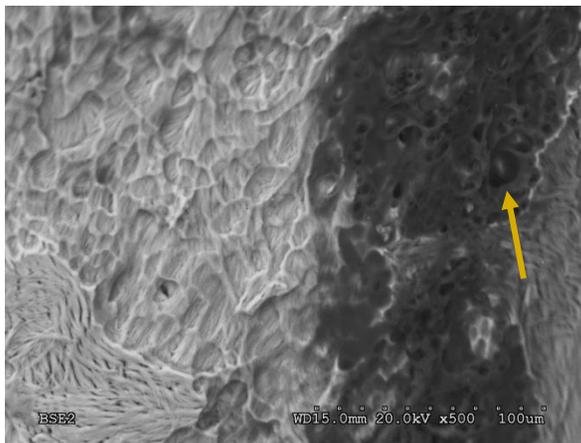


Figura 101. Área de acción osteoclástica superficial. Todavía se conservan elementos celulares que podrían corresponder a osteoclastos.



Figura 102. Zona de actividad osteoclástica con acción más profunda.

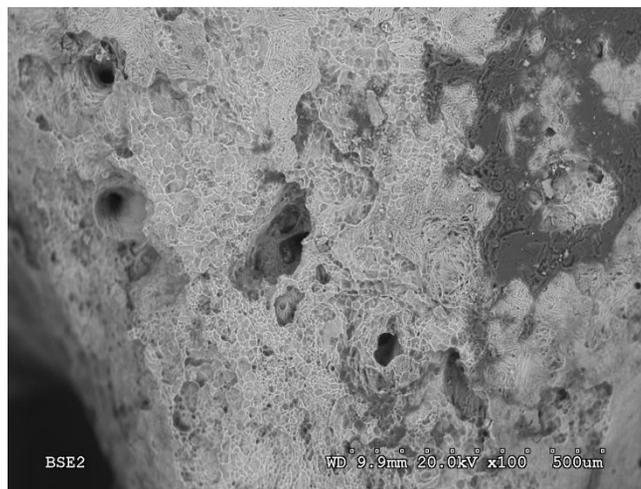
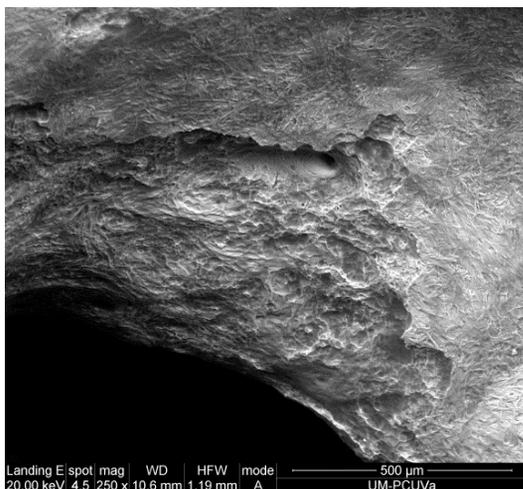


Figura 103–104. Remodelación ósea en el cuerpo del yunque de un varón de 2 años (izquierda) y otro de 23 (derecha).

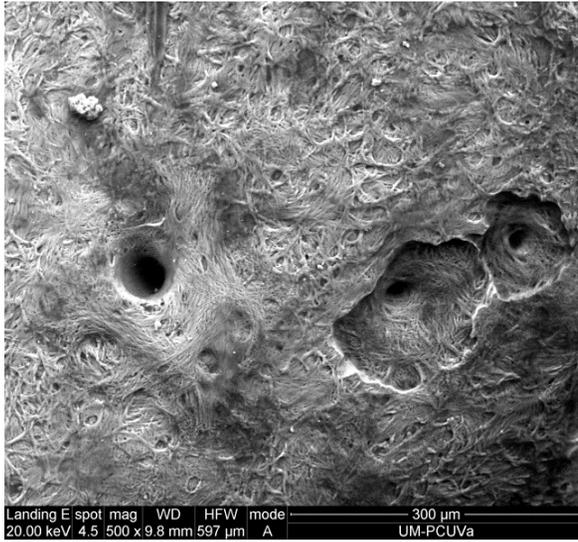


Figura 105. Remodelación de *foramina nutriticia* de un paciente de 2 años.

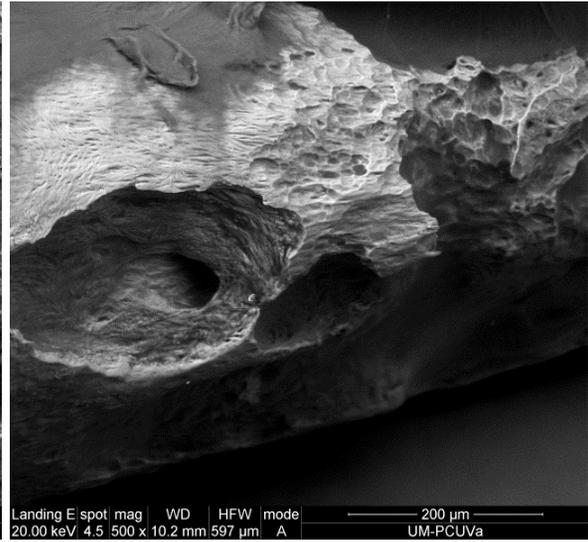


Figura 106. Gran destrucción alrededor de un orificio vascular en un paciente anciano.

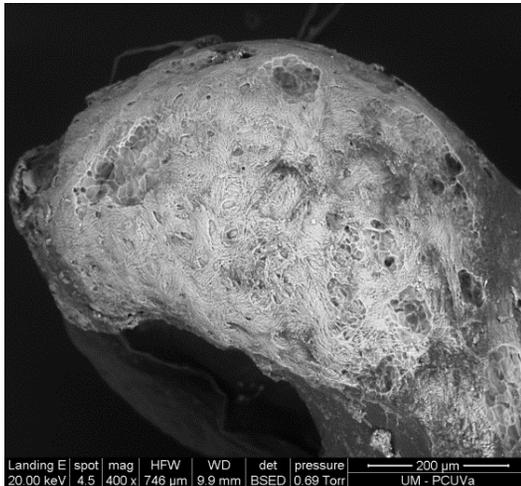


Figura 107. Focos osteoclasticos en la cara lateral del extremo distal de la apófisis larga.



Figura 108. Amplia área de destrucción en la *crura longum* de este paciente.



Figura 109. Tejido óseo desestructurado que aparece junto con lagunas resortivas en la rama larga del yunque.

En las zonas osteoclásticas intensas (apófisis larga) aparece ocasionalmente hueso desestructurado morfológicamente pero conservando fibras aparentemente normales (Fig. 109). Estas alteraciones son muy poco frecuentes en hueso sano (2 casos observados).

6.2.3.2 Resultados EDX

a) Se obtuvieron análisis EDX en diferentes áreas del hueso, apreciándose valores de media ligeramente más altos de Ca/P en zonas de la apófisis larga del yunque, aunque sin significación estadística.

b) Se realizó una comparación entre los análisis por energía dispersa que habían sido obtenidos en la superficie distal de la rama larga de 10 yunques normales con los 10 yunques que habían sido raspados en el extremo de la apófisis larga (cara medial).

Se obtuvieron unas medias de Ca/P de $1,51 \pm 0,22$ en superficie y $1,80 \pm 0,47$ bajo la primera capa de hueso (no significativo).

c) Se encontró azufre cuantificable en todos los huesos excepto en 7; un 70%. No se identifica suficientemente flúor en ninguna pieza.

d) No se apreciaron diferencias en la relación Ca/P entre zonas con patrón fibrilar y zonas de resorción osteoclástica en varias muestras analizadas.

e) En la zona de inserción del ligamento posterior del yunque el cociente Ca/P fue algo más elevado que en otras áreas.

6.2.4 Estudio SEM-EDX del yunque en Colesteatoma

Se estudiaron 15 yunques patológicos extraídos durante la cirugía del colesteatoma.

Los huesos procedían de 8 mujeres (53%) y 7 varones (47%), de edades comprendidas entre los 16 y los 79 años. La media de edad fue de 52 ± 18 años.

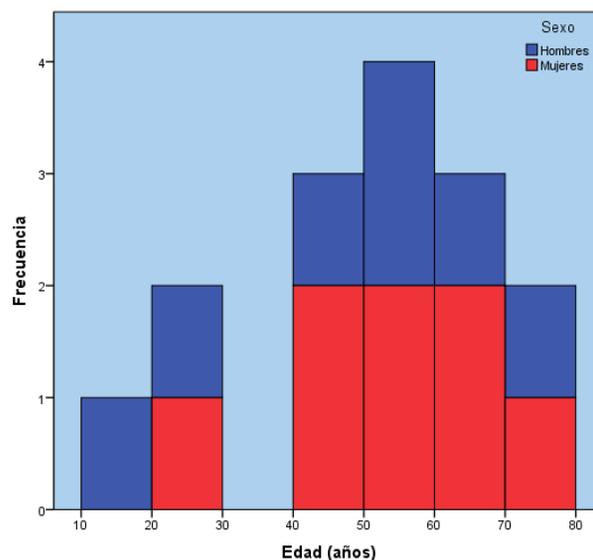


Figura 110. Distribución por edad y sexo de la muestra analizada.

Paciente	Porcentaje de erosión		
	Apófisis corta	Cuerpo	Apófisis larga
68	100%	50%	75%
71	100%	0%	100%
102	50%	25%	25%
156	0%	0%	25%
162	100%	0%	0%
172	50%	25%	25%
205	100%	25%	25%
211	0%	0%	66%
220	0%	0%	100%
229	0%	0%	66%
232	0%	0%	33%
281	100%	33%	100%
385	25%	25%	33%
386	50%	50%	100%
406	75%	50%	100%

Tabla 39. Porcentaje de erosión de las diferentes áreas del yunque por cada pieza.

Todos los casos correspondían a pacientes con un diagnóstico de colesteatoma que precisó de un tratamiento quirúrgico.

En el momento de la cirugía los pacientes describían diferentes tiempos de evolución desde el comienzo de la clínica. Cinco de ellos referían de 1 a 5 años de sintomatología, mientras que en un caso sólo llevaba un año de clínica. El resto, de 5 a 10 años (3), de 10 a 20 años (4) y más de 20 años (2) de problemas otológicos en su historia clínica.

Todos los huesos de este grupo tenían erosiones macroscópicas que fueron observadas durante la cirugía mediante el microscopio óptico. La zona más afectada fue la apófisis larga, que se encontraba ausente en cinco de ellos. La apófisis corta también se encontró totalmente lítica en otros cinco pacientes (Tabla 39).

6.2.4.1 Análisis de superficie

Son numerosas las áreas líticas que se pueden observar en los yunques dañados por colesteatoma (Figs. 112–114). La zona más habitual de destrucción, al igual que ocurre en la otitis media crónica, es la *crus longum* (incluyendo la apófisis lenticular). Algunas piezas presentan una erosión muy localizada en la apófisis corta, incluso con el resto del hueso macroscópicamente normal.

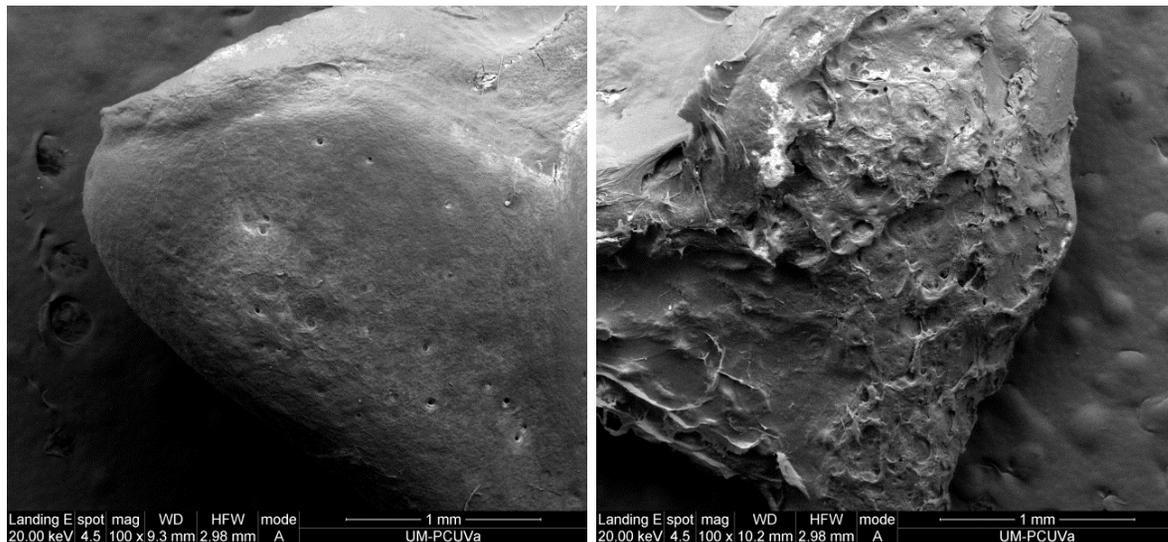


Figura 111–112. Imagen del cuerpo de un yunque normal (izquierda) y otro con colesteatoma (derecha). Obsérvese el grado de destrucción que provoca el colesteatoma en la zona de contacto.

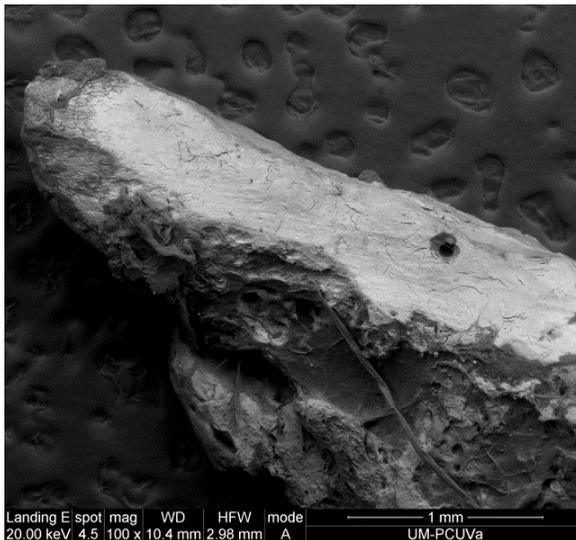


Figura 113. Apófisis corta con amplias áreas de destrucción por un colesteatoma.

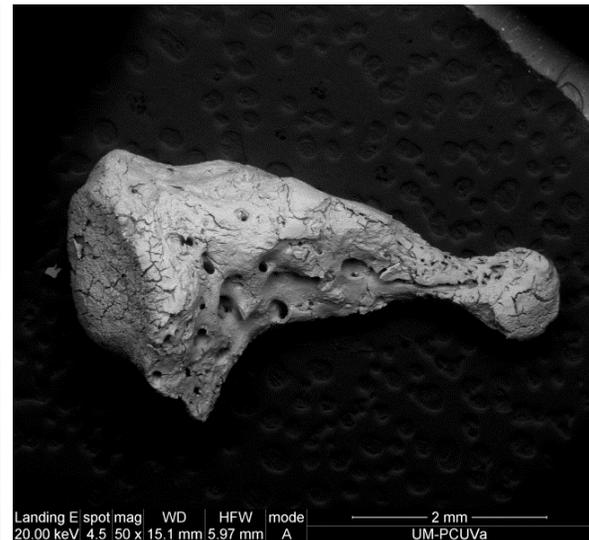


Figura 114. Resto de la porción craneal de un yunque masivamente destruido por un colesteatoma.

En la superficie ósea se pueden identificar, además del patrón fibrilar entrelazado del hueso normal, diferentes patrones de erosión en las zonas líticas. El hallazgo más habitual es un aumento de las lagunas osteoclásticas en las áreas de destrucción (Fig. 115). Estas lagunas son más o menos profundas, llegando a verse pequeños canales vasculares como una imagen en punteado (Fig. 116). Es la imagen más predominante en las zonas de mayor destrucción.

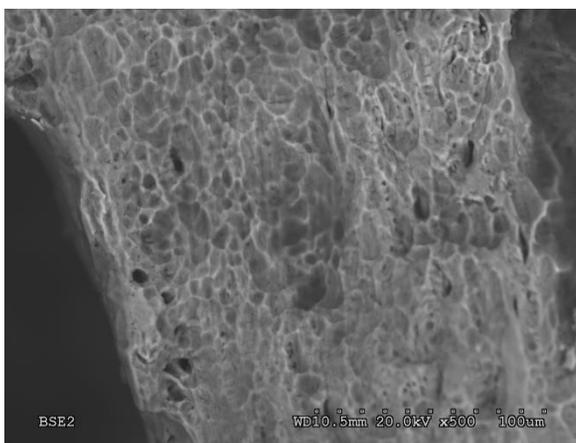


Figura 115. Gran área de destrucción con intensa actividad osteoclástica.

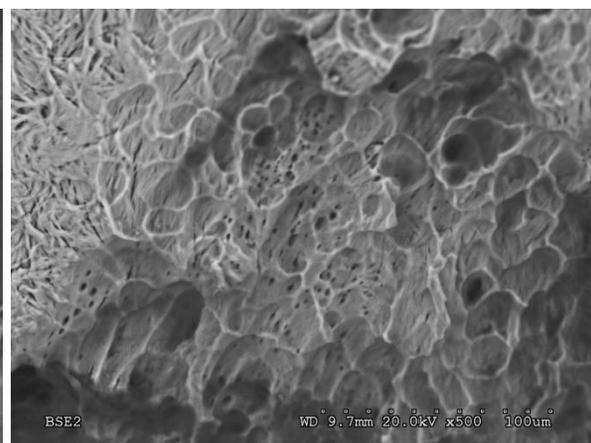


Figura 116. Focos osteoclásticos que penetran en profundidad del hueso, observándose un punteado que corresponde con los canales vasculares.

Los bordes de erosión en las zonas líticas son abruptos e irregulares, con amplios focos resortivos osteoclásticos. En algunos casos se encuentran pequeños fragmentos de hueso que pudieron desprenderse durante la cirugía debido a la fragilidad del tejido óseo en estas localizaciones.

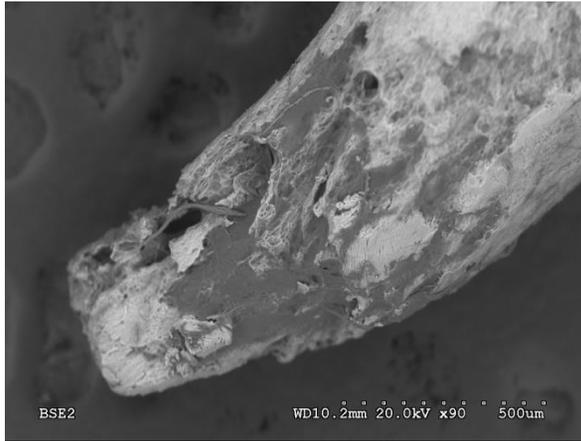


Figura 117. Área lítica en la apófisis larga en la que se aprecia una numerosa cantidad de bahías de resorción.

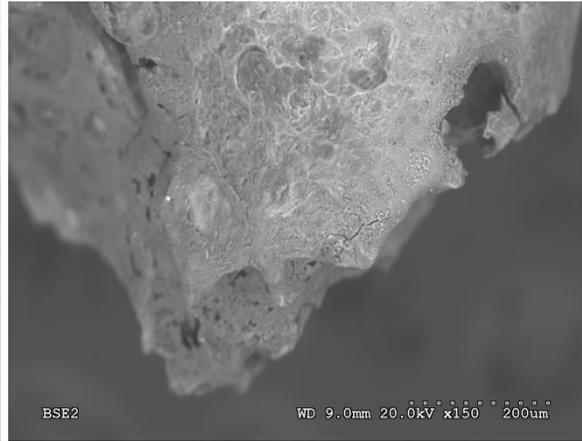


Figura 118. Pieza con lisis casi total de la *crus longum* con bordes abruptos y zonas de actividad osteoclástica extensas.

Además del aumento de la actividad osteoclástica, también aparece un patrón progresivo de lisis más superficial en el que las fibras entrelazadas que se han descrito van sufriendo un alisado aparentemente progresivo (Figs. 112, 121) hasta llegar a producirse una especie de *limado* de la superficie. Este aspecto –característicamente patológico– es descrito por algunos autores como “apomazado” (aspecto de piedra pómez) en el que se aprecia un punteado generalizado que se correspondería con orificios de los canalículos vasculares del tejido (Fig. 122).

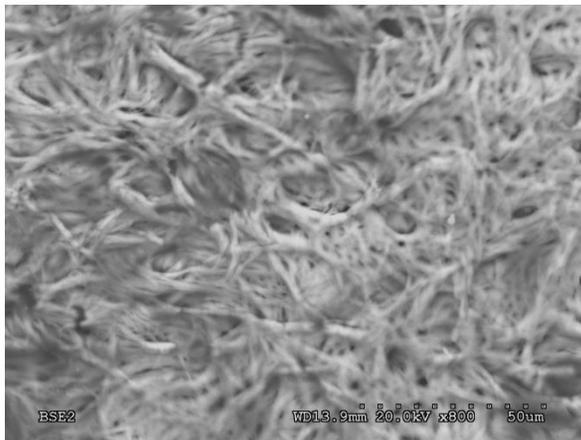


Figura 119. Patrón fibrilar normal.

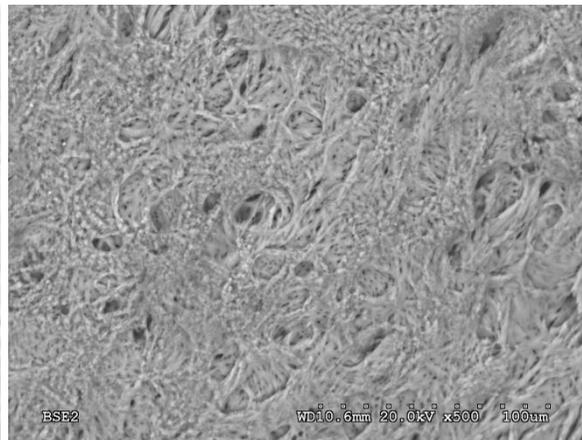


Figura 120. Área de erosión superficial donde aún se aprecian intactas capas más profundas de fibras.

Estas áreas apomazadas del hueso se encuentran aparentemente en las zonas de contacto con el colesteatoma o el epitelio de retracción timpánica, ya que suelen aparecer en la cara timpánica del yunque más que en su orientación medial.

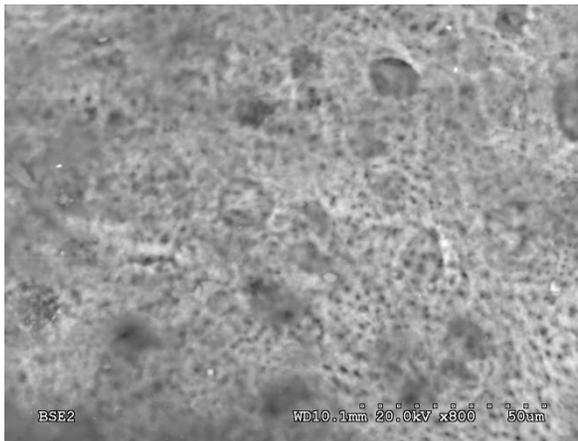


Figura 121. En esta pieza se observa cómo la erosión comienza a afectar a capas más profundas de fibras.

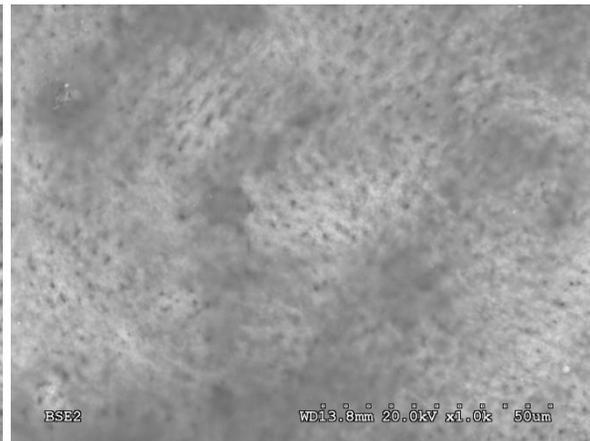


Figura 122. Área de apomazado en la que se ha regularizado la superficie, observando los orificios de los canalículos vasculares.

Otro tipo de daño que se observa en el hueso dañado por colesteatoma es la rotura de fibras. Este fenómeno ocurre adyacente a bahías de resorción frecuentemente (Fig. 123) pero puede observarse en áreas donde no hay actividad osteoclastica. También se aprecia una lisis de las fibras dispuestas alrededor de algunos agujeros vasculares, sin la presencia de osteoclastos (Fig. 124).

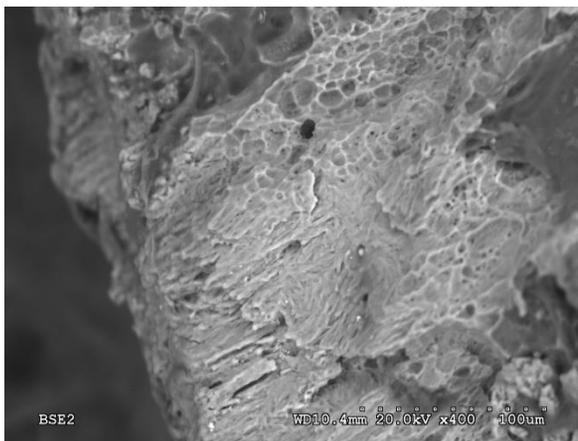


Figura 123. Rotura de fibras en el borde de amputación de una apófisis larga.

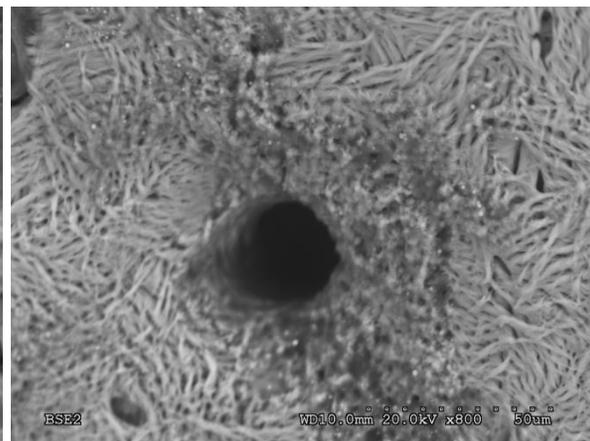


Figura 124. Lisis de fibras alrededor de un agujero vascular en el cuerpo de este yunque.

En algunos casos, cuando la destrucción del hueso es importante, las áreas líticas dejan ver cavidades amplias en la profundidad del hueso (Fig. 125). Si bien el yunque carece de hueso esponjoso en su interior, a veces se reconocen trabéculas, con fibras maduras dispuestas en la dirección del eje principal y sin el entrelazado que se observa en la superficie cortical del hueso normal (Fig. 126).

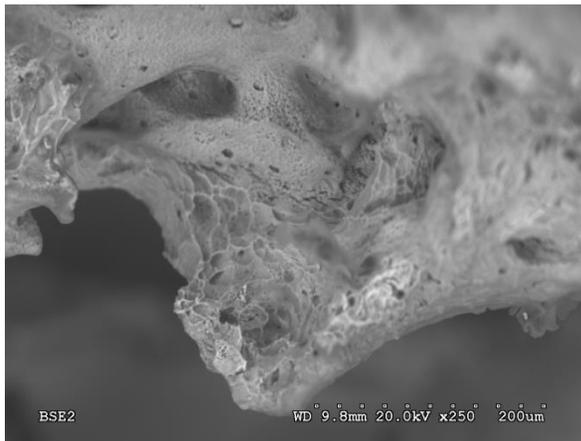


Figura 125. Cavidad provocada por un colesteatoma en una paciente de 27 años tras haber destruido por completo la apófisis corta.

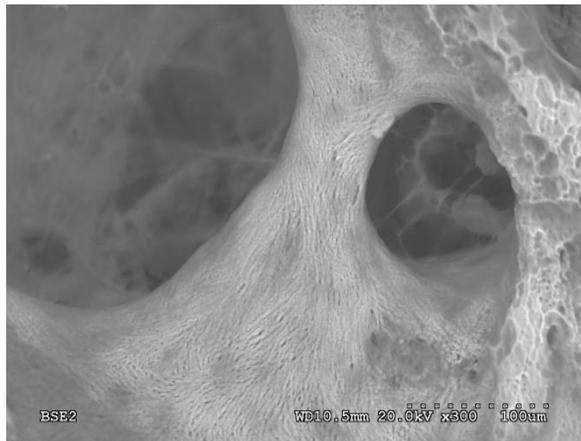


Figura 126. Gran caverna abierta en el cuerpo de un yunque en la que se aprecian fibras que se agrupan alineadas formando una trabécula.

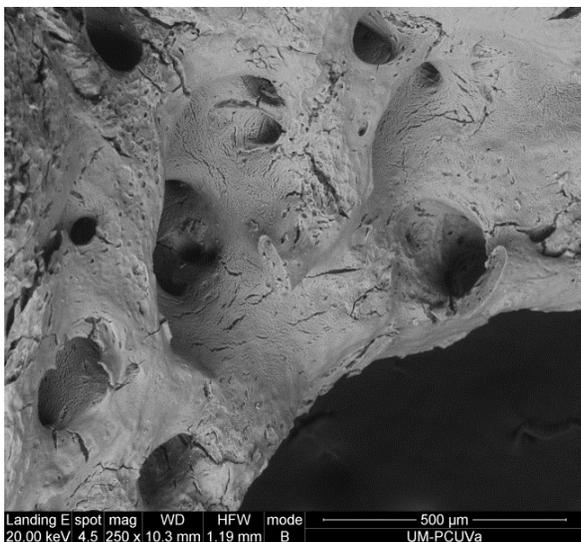
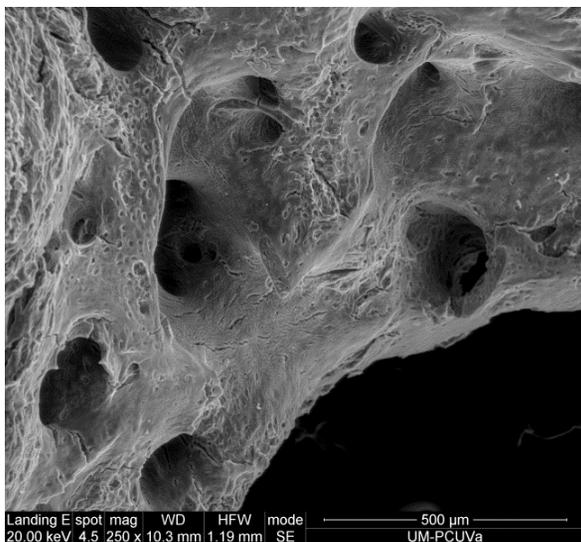


Figura 127-128. Cavitación en la región posterior del cuerpo fotografiada en modo SE (izquierda) y en modo BSED (derecha). Obsérvese la estructura pseudo-trabecular del interior del hueso.

En algunas zonas se observan todos estos patrones de destrucción ósea en relación a restos de tejido orgánico no mineralizado que corresponderían al límite del colesteatoma. En el caso particular de las Figuras 129 y 130 se aprecia el efecto combinado tanto de la acción osteoclástica como de otro mecanismo que origina el *apomazado* descrito anteriormente. La destrucción es tan agresiva que deja fragmentos de tejido óseo junto a unos bordes muy irregulares.

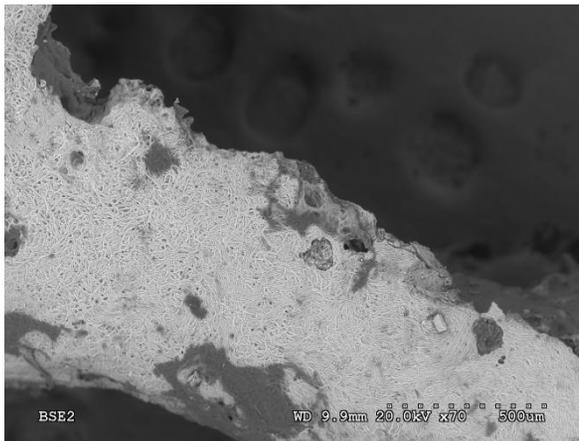


Figura 129. Borde de destrucción que afecta a la apófisis corta en un hombre de 54 años.

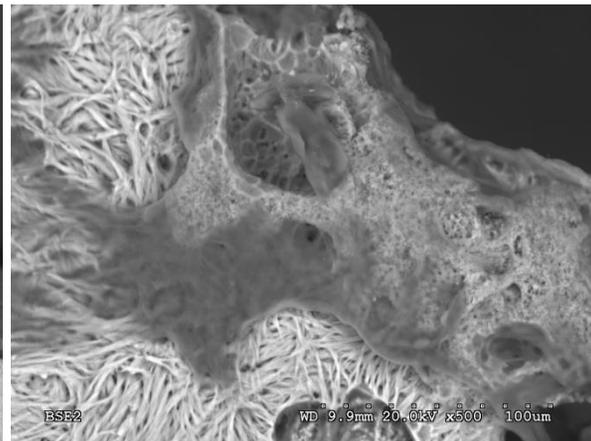


Figura 130. Detalle de la figura anterior donde se aprecia la destrucción osteoclástica y el apomazado junto con restos que corresponderían al límite del colesteatoma. Nótese la menor intensidad en el brillo del tejido destruido frente a las fibras normales.

Ocasionalmente en un paciente (el de mayor edad, 79 años), se observó que la destrucción del hueso había sido muy intensa. No solamente por el porcentaje de hueso eliminado sino también por los hallazgos que se encontraron en la superficie, en la que se aprecia una resorción masiva de tejido óseo, sin apenas encontrar fibras normales, extremadamente frágil, con bahías osteoclásticas muy amplias, extensas áreas de rotura de fibras y –dispersos por toda la superficie– cristales octaédricos característicos del oxalato cálcico dihidratado (confirmado mediante EDX).

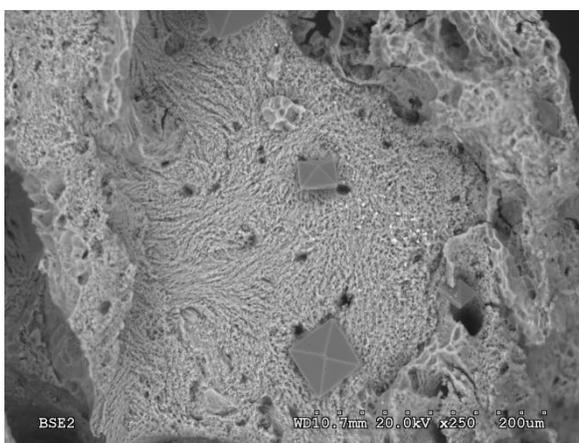


Figura 131. Cavitación en el cuerpo del yunque con fibras rotas, resorción osteoclástica y cristales de sales de calcio.



Figura 132. Cristal precipitado de sales cálcicas en este tejido óseo tan dañado.

6.2.4.2 Resultados EDX

- a) Se obtuvieron análisis EDX en diferentes áreas del hueso, apreciándose valores de media ligeramente más bajos de Ca/P en zonas distales de la apófisis larga del yunque, cuando se conservaba, aunque sin significación estadística.
- b) Se encontró azufre en cantidades cuantificables en todos los huesos excepto en 2 (83%; uno de ellos, el descrito anteriormente del paciente más anciano). Se detectó la presencia de flúor en 5 de los 12 pacientes (42%).
- c) Igual que en el hueso normal, no existen diferencias importantes en la relación Ca/P entre zonas con patrón fibrilar y zonas con osteoclastos. Por el contrario, en áreas en las que predomina un patrón de *apomazado*, la relación Ca/P es menor.
- d) Los cristales del paciente 172 fueron analizados con EDX, obteniendo unos porcentajes del 17% en C, 1,5% en P y 15,5% en Ca, que son los esperados para una mezcla de oxalato cálcico dihidratado y la hidroxiapatita subyacente:

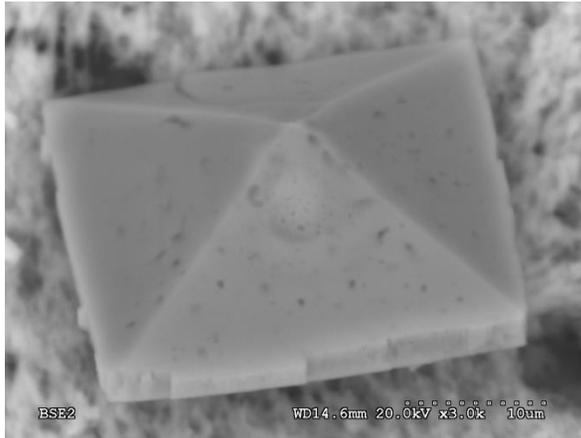


Figura 133. Cristal de oxalato cálcico dihidratado (Weddellita).

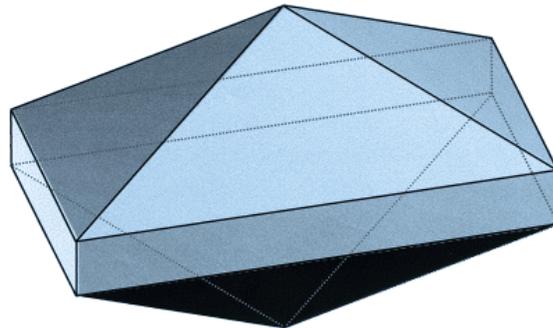


Figura 134. Representación bipiramidal del oxalato cálcico dihidratado (Lieske, 2001; modificado) [111].

6.2.5 Estudio SEM-EDX del yunque en Otitis Media Crónica

Se estudiaron 24 yunques patológicos procedentes de cirugías en pacientes con patología crónica de oído medio, diagnosticados de otitis media crónica no colesteatomatosa.

La distribución por sexos fue de 57% mujeres (14) y 43% hombres (10). La media de edad se situó en 47,3 años (DE 16,3).

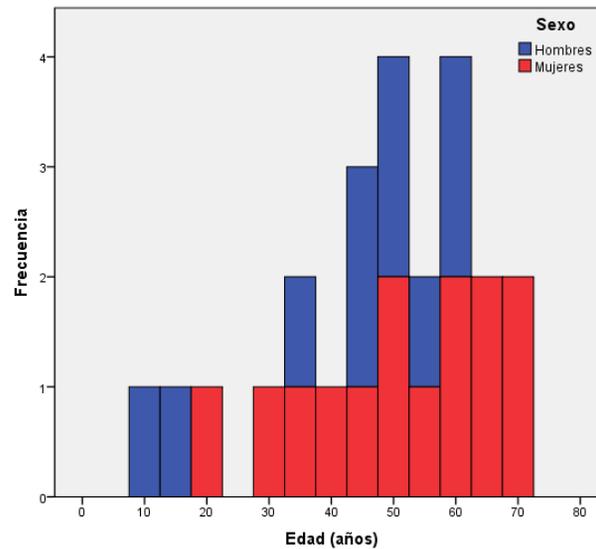


Figura 135. Distribución por edad y sexo de la muestra analizada.

En 15 de los 24 pacientes existía una perforación timpánica (63%). El resto (37%) tenía un diagnóstico de atelectasia timpánica.

Según el tiempo de evolución desde el comienzo de la clínica se hicieron cuatro grupos de estudio, tal y como se refleja en la tabla siguiente.

	Frecuencia	Porcentaje
<5 años	2	8,3%
5-10 años	6	27,0%
10-20 años	9	37,5%
>20 años	7	29,2%
Total	24	100%

Tabla 40. Grupos según el tiempo de evolución.

6.2.5.1 Análisis de superficie

A nivel macroscópico, se observan lesiones líticas en un 60,7% de los casos que, de forma variable, afectan a la apófisis larga del yunque (Fig. 136). Por el contrario, la morfología de tanto el cuerpo como la apófisis corta se encuentra conservada en la totalidad de los casos, no apreciándose áreas de destrucción muy evidentes.

A diferencia de lo observado en el colesteatoma, en la OMC los bordes de erosión son –en general– menos abruptos y las superficies de las áreas líticas están más redondeadas cuando se observan al detalle (Fig. 137).



Figura 136. Lisis distal de una apófisis larga.

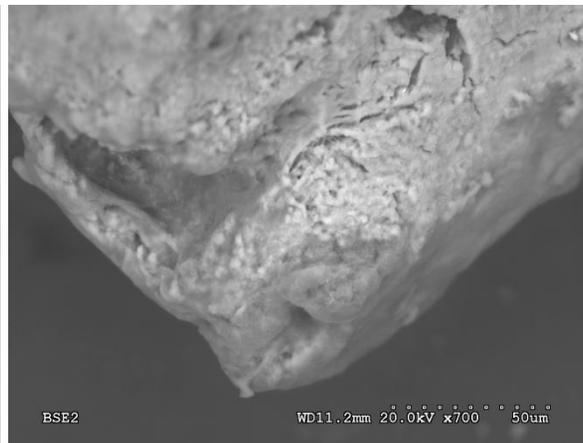


Figura 137. Detalle del borde de erosión, con la superficie redondeada.

De forma general, en los osículos analizados, predomina el patrón fibrilar entrelazado en la mayor parte del hueso. Las fibras se organizan aleatoriamente y se entrecruzan en capas como se ha descrito previamente. Pero existen diferentes puntos en las muestras en las que se aprecia un deterioro variable en la forma y disposición de estas fibras.

En las zonas líticas de la apófisis larga se distinguen imágenes en las que aparecen más roturas de fibras y la actividad osteoclástica que existe parece ser mucho menos intensa que en el caso del colesteatoma (Fig. 138). El grado de resorción osteoclástica que se observaba en el hueso normal y que parecía incrementarse en el caso del colestatoma, ahora parece estar mucho menos presente a pesar del daño osicular que se ha generado. Por el contrario son numerosas las imágenes en las que se aprecia la rotura de las fibras calcificadas del hueso (Fig. 139).

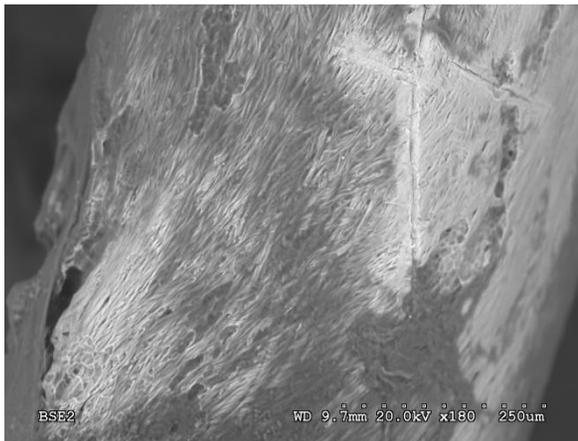


Figura 138. *Crus longum* que exhibe numerosas fibras longitudinales con bordes rotos (existen daños mecánicos provocados en la extracción quirúrgica).

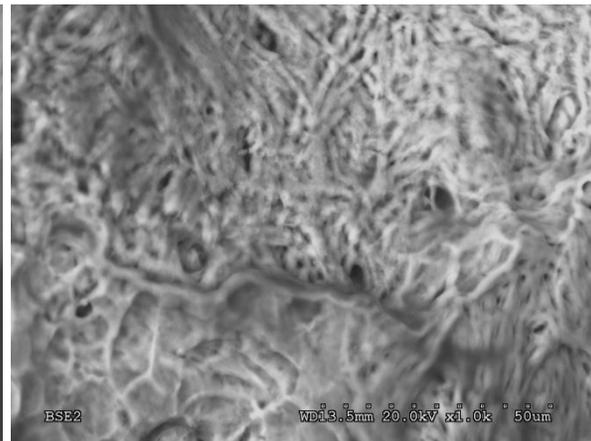


Figura 139. Áreas de resorción osteoclástica en la apófisis larga, junto a un patrón fibrilar normal.

En los huesos procedentes de pacientes con Otitis Media Crónica, además de en la zona de erosión de la apófisis larga, aparece también daño generalizado en otras áreas de la superficie del hueso, especialmente en el cuerpo. Las fibras se observan dañadas, rotas y desestructuradas, una imagen muy diferente al patrón entrelazado que debería dominar (Figs. 140, 141).



Figura 140. Cuerpo de un yunque con OMC en el que se aprecia un daño parcial en las fibras superficiales.

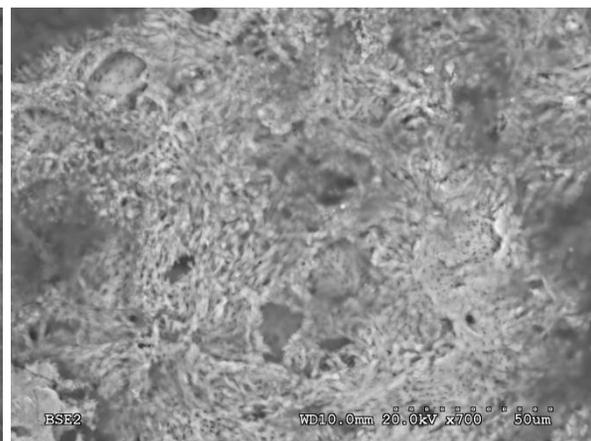


Figura 141. La imagen en entrelazado ya no se aprecia debido a la rotura múltiple de fibras superficiales en esta zona.

Este patrón patológico, en el que la imagen en entrelazado de las fibras se vuelve menos definida y de aspecto muchas veces amorfo, se repite en numerosos puntos de la superficie del hueso y está presente en mayor o menor medida en casi la totalidad de los casos.

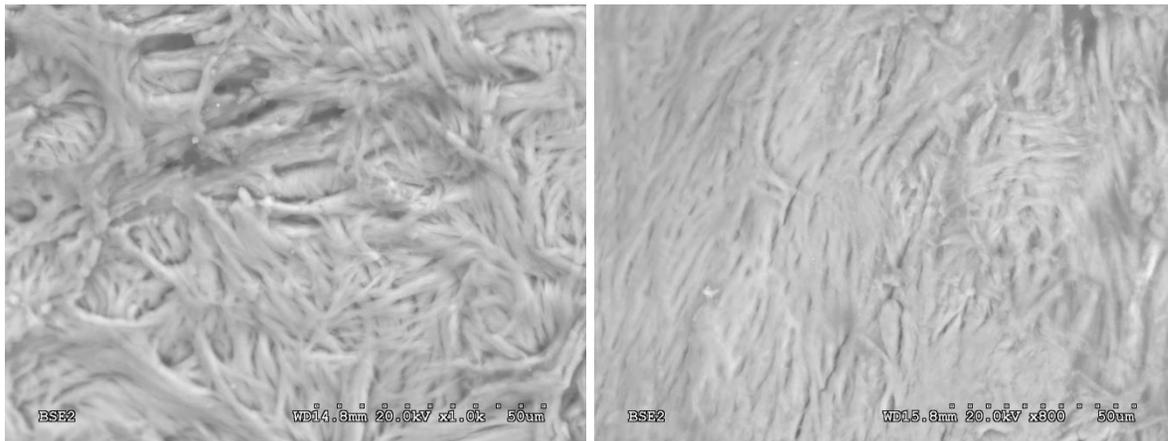


Figura 142-143. Patrón en entrelazado normal (izquierda) y zona de fibras deterioradas (derecha) encontradas en la misma región del cuerpo de un yunque.

Las regiones osteoclásticas son menores en número y extensión que en el hueso normal o en el caso de colesteatomas, aunque las características generales se mantienen. Las lagunas resortivas no difieren de las observadas en huesos sanos y sigue predominando la localización en la apófisis larga y alrededor de las zonas líticas aunque, en ocasiones, sea menos intensa.

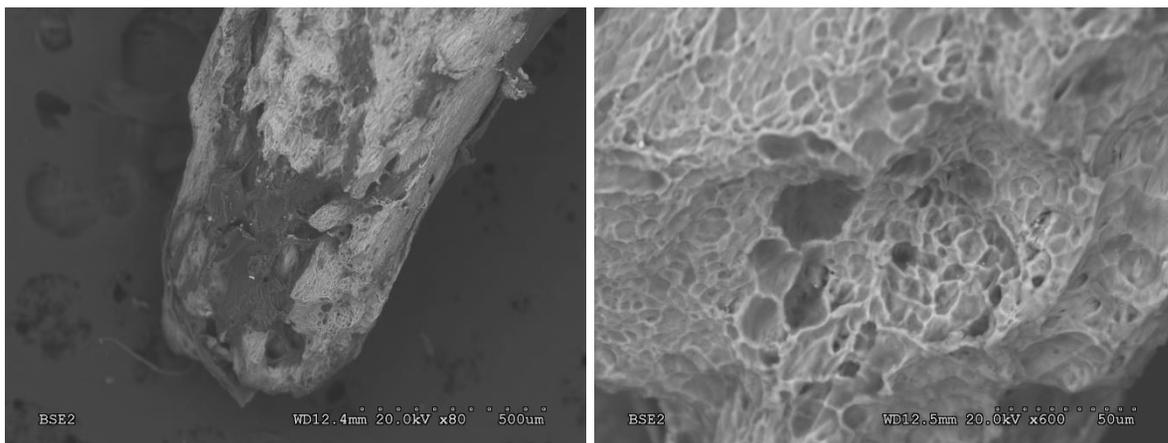


Figura 144. Amputación de una apófisis larga con focos resortivos.

Figura 145. Detalle de las lagunas de resorción en el borde lítico de la misma pieza.

Como ocurre en el colesteatoma aparece aquí también un mecanismo de lisis diferente al osteoclástico, en el que las fibras de la superficie se van deteriorando y puliendo en lo que denominábamos patrón de apomazado. Pero, a diferencia de lo que ocurría en la anterior ocasión, en muchas ocasiones aquí es menos limpio, más extenso (en superficie) y con más irregularidades. En algunos casos también aparecen cavitaciones si el daño es suficientemente grande, aunque no tan profundas como se observaron en el colesteatoma (Fig. 147).

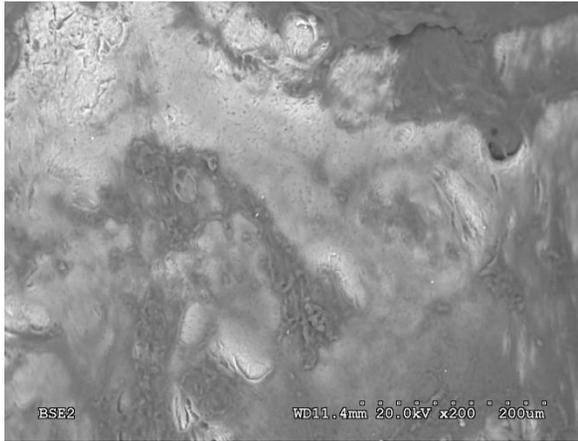


Figura 146. Extenso apomazado en la superficie del cuerpo del yunque bajo la capa de tejido no calcificado.

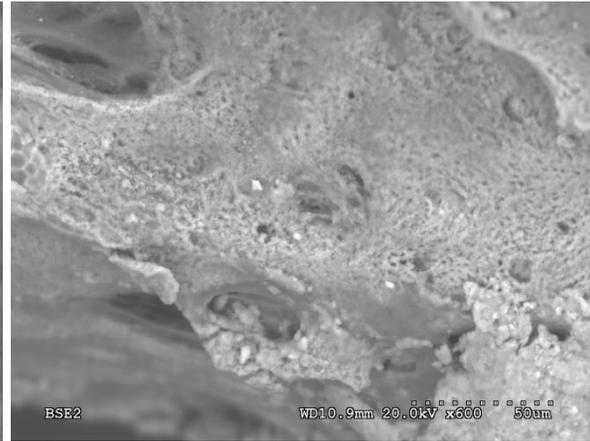


Figura 147. Apomazado irregular con cavitación en una apófisis larga.

En muchas muestras se observa un daño combinado en diferentes puntos, incluso sin zonas líticas importantes en la apófisis larga. Aparecen fibras rotas, actividad osteoclástica escasa, abundante apomazado y, como consecuencia de éste, imágenes en punteado que corresponden con los orificios de los canalículos vasculares que se dejan ver a medida que avanza la destrucción del tejido (Fig. 148). En algunas muestras no se produce sólo el deterioro de las fibras de superficie, sino una deformación de su aspecto (Fig. 149).

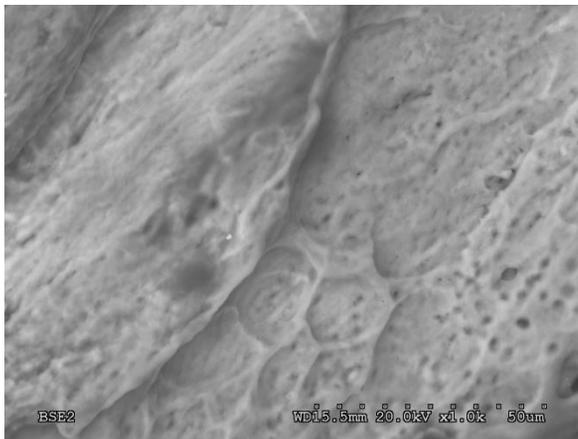


Figura 148. Bahías osteoclásticas sobre un fondo deteriorado con ausencia de fibras entrelazadas. Se observan los canalículos vasculares en profundidad.

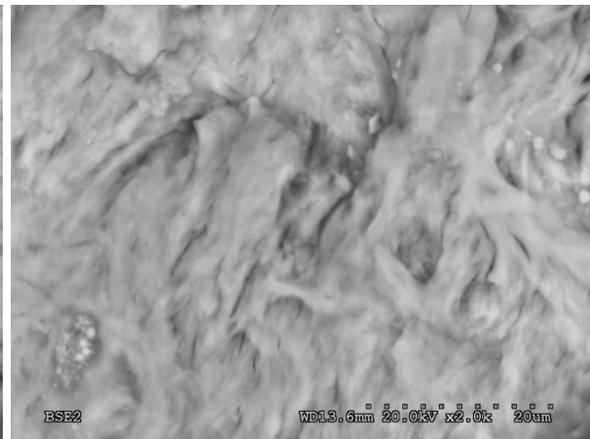


Figura 149. Patrón entrelazado deformado en la superficie del hueso.

En ocasiones el daño en la superficie del hueso es muy intenso y aparecen imágenes en “apolillado”, con múltiples cavitaciones superficiales y con zonas descamativas de tejido óseo (Figs. 150, 151). La actividad osteoclástica aquí aparece en mayor o menor medida pero no es acorde con el daño y –al observar la zona con mayores aumentos– no parece ser la responsable del daño profundo y –finalmente– la amputación total o parcial de la apófisis larga (Fig. 152).

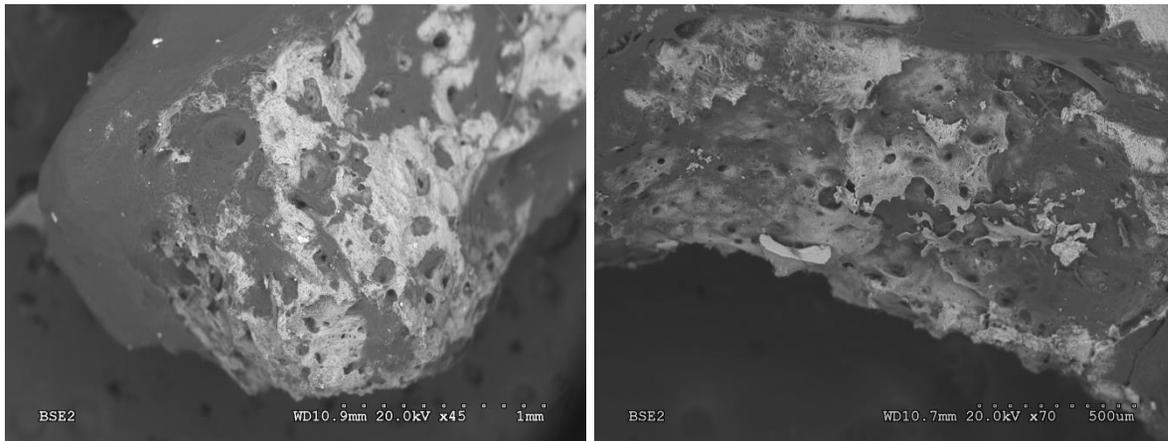


Figura 150–151. Áreas extensas de daño en la superficie de diferentes huesos con aspecto descamativo en forma de “apolillado”.

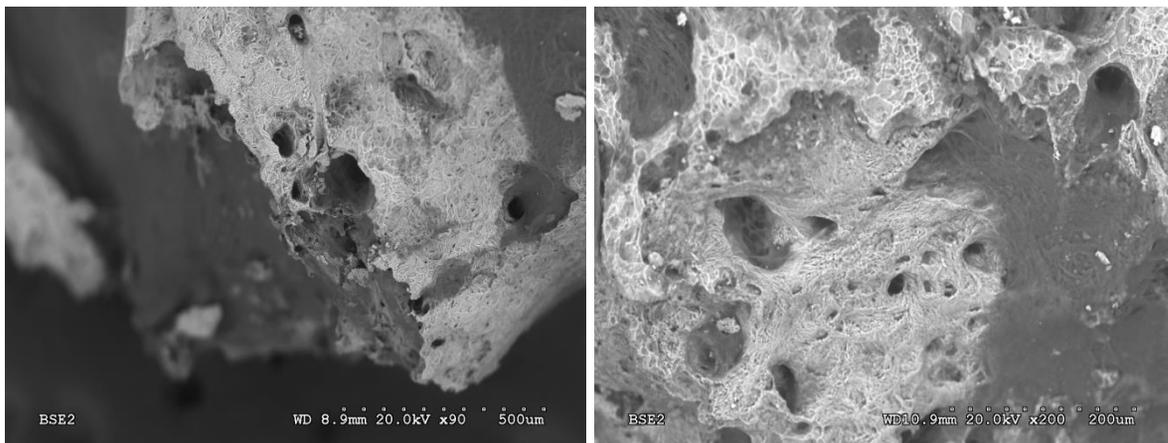


Figura 152–153. Amplias zonas de destrucción con una combinación de mecanismos, que llevan a la amputación total de la *crus longum*. La actividad osteoclástica aquí no es tan intensa como en casos similares originados por un colesteatoma.

Sin contar con las zonas de gran destrucción general, los orificios vasculares aparecen ocasionalmente en la OMC con una morfología muy irregular y actividad osteoclástica importante. Estas estructuras parecen estar lesionadas a pesar de no existir daños significativos en las inmediaciones y conservar la superficie el aspecto fibrilar habitual (Figs. 154, 155).

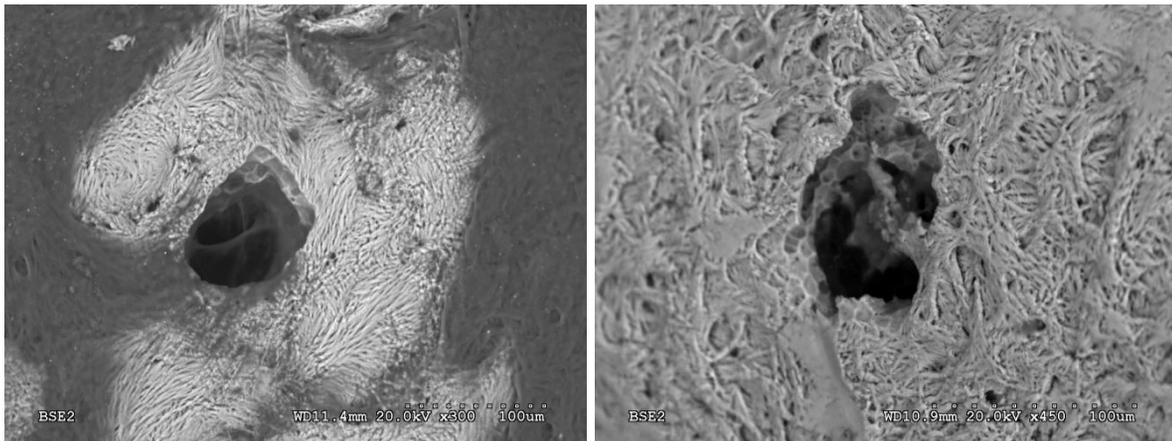


Figura 154-155. *Foramina nutricia* irregulares en áreas sin daños en la superficie, salvo la presencia de lagunas osteoclásticas en su interior.

Finalmente, un fenómeno muy relevante que se observa en muchos de los yunques de OMC analizados es la presencia de tejido óseo aparentemente neo-formado, de morfología irregular y desorganizada que aparece en la superficie de las zonas dañadas. En algunos casos se trata de una desorganización de la estructura morfológica de la zona, mostrando pequeñas deformidades a modo de prolongaciones o erupciones (Fig. 156). Otras veces, son verdaderos depósitos de sustancia amorfa calcificada que se extiende por algunas áreas de la superficie del hueso (Figs. 157, 158).

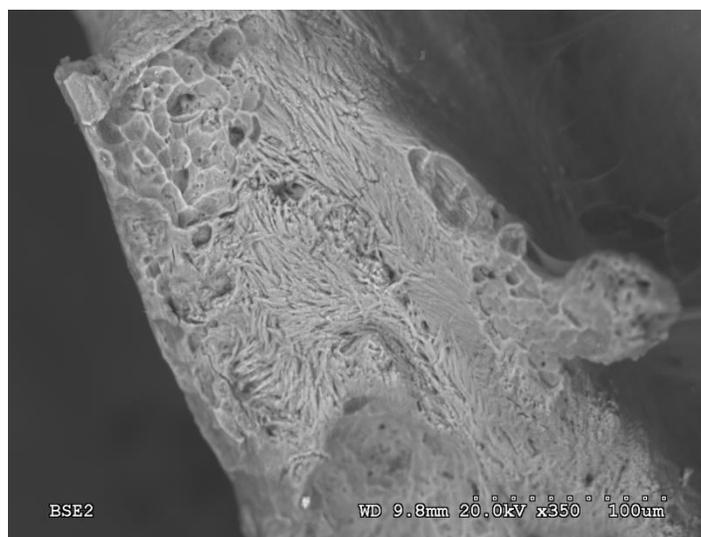


Figura 156. Cara lateral de la apófisis larga con áreas de resorción sobre una zona deformada con prolongaciones de tejido óseo anormal.

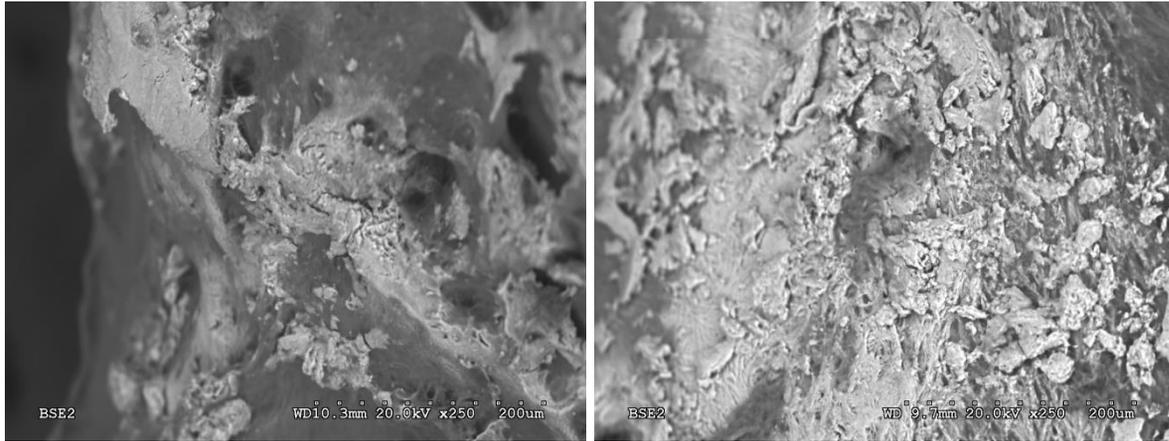


Figura 157-158. Sustancia amorfa calcificada en la superficie del hueso.

En algunas muestras, esta formación de tejido calcificado se dispone macroscópicamente y parece corresponder a fragmentos de timpanosclerosis que habían sido descritos durante la cirugía. En ellos sí se distinguen algunas fibras longitudinales, con cierta organización lineal, aunque lejos de la estructura de superficie del hueso normal y con una predominancia de tejido amorfo de aspecto arenoso.

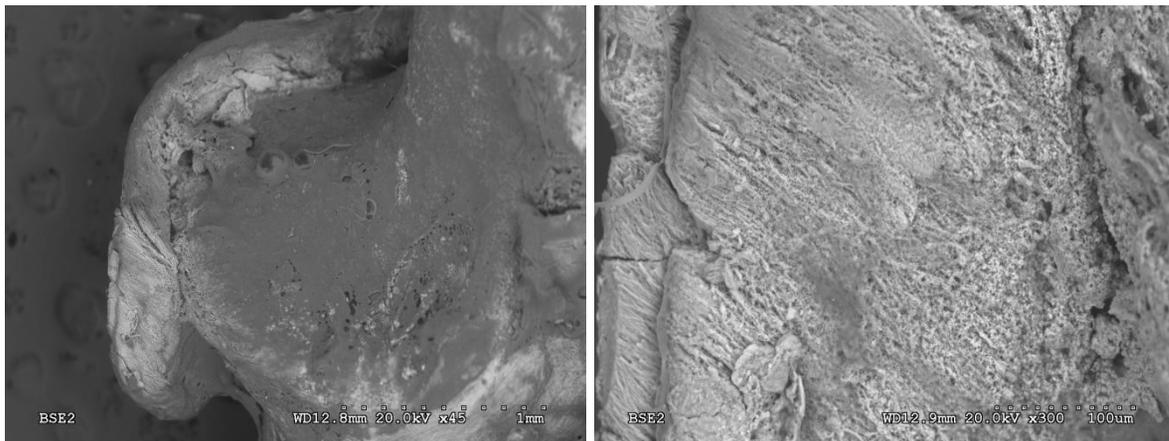


Figura 159-160. Formación irregular adherida al yunque en las inmediaciones de la faceta articular con el martillo (izquierda). Se observan las fibras longitudinales calcificadas que lo conforman (derecha).

6.2.5.2 Resultados EDX

- a) Se obtuvieron análisis EDX en diferentes áreas del hueso, apreciándose valores de media ligeramente más altos de Ca/P en zonas centrales del hueso, aunque no estadísticamente significativos.
- b) Se encontró azufre en un 46,4% de los casos. Aparece flúor en 35,7% de los huesos.
- c) En aquellos casos en los que aparece S y/o F, los valores de Ca/P son menores, aunque no tienen suficiente significación estadística.
- d) No hay una correlación en los cambios de Ca/P y el tiempo de evolución de la enfermedad.
- e) En las zonas descritas como placas de timpanosclerosis se aprecia una relación Ca/P más baja que en el hueso normal. En las zonas que aparece tejido óseo amorfo, aparentemente neoformado, los valores de Ca/P son variables (en algunos casos son menores que en el resto de hueso en y otros son mayores).

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.

■ **discusión**

7. DISCUSIÓN

El trabajo demuestra que las características químicas del hueso yunque cambian con los procesos de envejecimiento. También se deduce con este estudio que existen diferencias de la estructura mineral en determinadas regiones del osículo, como es la apófisis larga, en las que los cambios que se producen como consecuencia de procesos patológicos van a alterar la evolución normal del tejido.

Ninguna de las técnicas utilizadas en este trabajo logra demostrar diferencias importantes en las características químicas o estructurales entre hombres y mujeres. Parece que ambos sexos sufren cambios similares relacionados con la edad y que las modificaciones de dichas características que ocurren con los diferentes procesos patológicos, no se diferencian de forma significativa.

7.1 ESTUDIO MEDIANTE FTIR

Diferentes trabajos han evidenciado la existencia de cambios en la estructura del tejido óseo en relación con la edad, tanto en modelos animales como en seres humanos. En estudios con ratas se ha observado que con la edad aumenta la mineralización y la cristalinidad del hueso, disminuyendo sus propiedades elásticas [112]. En primates también se ha comprobado que la relación Mineral/matriz aumenta rápidamente en los primeros años de vida y desciende en los últimos. A su vez, la relación Carbonato/Fosfato aumenta progresivamente con la edad del animal [113, 114].

En un estudio mediante espectroscopía Raman sobre fémur en hombres, Yerramshetty [115] encuentra un aumento en la mineralización del hueso a partir de la sexta década de la vida. Este hallazgo coincide con nuestras observaciones en hueso yunque, en las que se puede apreciar un aumento en la relación M/m en mayores de 60 años, comparados con los más jóvenes. Estos cambios son especialmente evidentes en la apófisis larga del yunque, que es –además– la zona que más remodelación ósea sufre a lo largo de la vida [81].

En numerosos estudios se han demostrado diferencias en el comportamiento de diversas zonas y tipos de hueso. El hueso cortical posee unas características diferentes al hueso trabecular. Además, el tejido óseo en remodelación cambia sus propiedades a medida que lo hace el proceso de maduración. Existe un aumento progresivo en las relaciones M/m y C/P hasta que la madurez del hueso alcanza su máximo. Una vez que el hueso es “adulto” los parámetros se mantienen constantes, a menos que exista un proceso patológico que altere ese equilibrio [116].

En nuestro estudio, sin precedentes en la literatura, la tendencia a aumentar el índice M/m a medida que lo hace la edad se frena o modifica en caso de que existan procesos inflamatorios crónicos que afecten al hueso.

De los datos globales obtenidos con FTIR no se infieren unas diferencias importantes si se comparan los yunques sanos con los patológicos, tanto en el caso de colesteatoma como de OMC. Pero un análisis más pormenorizado evidencia diferencias sustanciales y permite especular sobre las causas de esta homogeneización global. Parece que el aumento de la mineralización del yunque a partir de los 60 años ocurre en menor medida en pacientes con colesteatoma, y mucho menos diferencias se encuentran en la otitis media crónica.

El incremento de la carbonatación observado en los pacientes mayores, se invierte especialmente en la otitis media crónica. Aunque los resultados no sean muy significativos, parece que esta entidad origina un aumento del cociente C/P en jóvenes, pero posteriormente, y al contrario que en hueso normal, un descenso en la carbonatación a medida que aumenta la edad.

En un reciente estudio mediante espectrografía de infrarrojos, de los pocos existentes en oído, el índice de mineralización fue significativamente más alto en yunque comparado con hueso cortical femoral, mientras que la madurez fue significativamente menor en el primero [72].

En nuestro estudio se ha realizado una comparación con 6 muestras de hueso cortical craneal (temporal y frontal). También encontramos que el cociente fosfato/amida I es mayor en los osculos que en el hueso cortical, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. La apófisis larga es la que tiene valores más similares a los del grupo control. Al contrario que en el estudio de Duboeuf, el índice carbonato/fosfato es significativamente menor en los yunques analizados que en el hueso cortical craneal.

7.2 ESTUDIO MEDIANTE EDX

Nuestro estudio coincide con las investigaciones de Tohno [85] en que las diferencias entre ambos sexos no son significativas. La relación masa Ca/P que encuentra es de 2,17 en hombres y de 2,18 en mujeres. Tampoco se apreciaron cambios en la relación Ca/P con la edad, como en nuestro caso.

En nuestro trabajo se obtienen unas medias de la relación Ca/P de 1,53 en el análisis global de superficie, significativamente menores que en el estudio citado. No obstante, en el análisis que realizamos de la capa subperióstica de la rama larga del yunque los valores son de 1,8 en hueso normal, algo más cercanos a los estudios publicados [84, 85]. Parece que nuestro análisis de superficie detecta menos Ca/P que cuando lo hacemos en profundidad.

Nuestra investigación sí revela diferencias significativas entre el hueso normal y el patológico, especialmente en colesteatomas y OMC con perforación timpánica, en los que los valores de Ca/P aumentan, al contrario que en los estudios de Bagger-Sjöback a los que habíamos hecho referencia con anterioridad [83].

La aparición de S en el proceso de mineralización se debe a las glicosaminas sulfatadas y normalmente desciende a medida que la mineralización progresa. Aunque Tohno [85] no encuentra cambios relevantes en las concentraciones de azufre en las muestras – probablemente porque todos los individuos tienen más de 40 años–, en el trabajo de Sánchez-Fernández [84] sí que se aprecia una relación inversa entre Ca/P y la presencia de azufre en el proceso de osificación. Nosotros encontramos azufre en el 70% de los huesos sanos, en un 83% de los colesteatomas, pero solamente un 46,4% en OMC. Este hallazgo nos hace pensar en la posible alteración de la formación de hueso nuevo en respuesta a la agresión que supone el proceso inflamatorio crónico. Al contrario que en el colesteatoma, en el que el hueso parece defenderse formando más tejido óseo normal, en la OMC el proceso de reparación está disminuido, es más errático e ineficaz, con formación de estructuras amorfas, frágiles y desorganizadas, como se observa al microscopio. Coincidimos también con Tohno en que cuando aparece azufre en los resultados analíticos, los valores de Ca/P son menores, aunque sólo lo observamos en OMC.

Otro elemento que aparece en hueso patológico es el flúor que está presente en un 42% en colesteatoma y en un 35,7% de OMC. En el hueso normal no se ha encontrado de forma significativa en ninguna de las piezas analizadas. El flúor es un agente que se puede unir a los cristales de apatita (sustituye al ion $-OH$) provocando un aumento de tamaño y una disminución de la solubilidad. Esto puede tener consecuencias en las características elásticas del hueso, ya que la incorporación de flúor incrementa la cristalinidad mineral [117].

Los valores de Ca/P que obtenemos mediante EDX en la superficie del hueso normal son significativamente menores que en el hueso patológico. Cifras similares a estos últimos son las que se obtienen en las medidas de profundidad en hueso normal. Una conclusión a la que llegamos en vista a tales resultados, y a la gran variabilidad que hemos encontrado, es que las medidas con EDX no son útiles en términos generales y sus cifras hay que considerarlas con cautela. Esto es debido probablemente a la existencia de niveles de mineralización muy diferentes en función del grado de madurez del tejido óseo [118, 119].

Por este razonamiento, creemos que el daño de la superficie que ocurre en hueso patológico nos dan medias de Ca/P similares (discretamente menores en colesteatoma) a las obtenidas bajo el raspado de la superficie. Pero cuando se analiza la capa superficial del hueso normal, que está en continua remodelación, el contenido de calcio es menor. Podría pensarse que la capa superficial del hueso –que con nuestra técnica de preparación se conserva fielmente– posee tejido en formación con una más baja calcificación que en las partes profundas, más antiguas, que se exponen artificialmente en el hueso normal, y debido al daño del tejido en el hueso patológico.

7.3. ESTUDIO SOBRE YUNQUE NORMAL

7.3.1 Estructura

En los yunques sanos analizados en nuestros estudios se aprecia una cierta estabilidad en la morfología del hueso, si bien se distingue una mayor variabilidad en la zona más delicada del osículo. La *crus longum* difiere de unos pacientes a otros en el ángulo de proyección o el grosor, pero es la apófisis lenticular la que mayor diversidad de morfologías y disposiciones exhibe en nuestras observaciones.

La apófisis lenticular ha sido un tema de controversia durante muchos siglos en la anatomía del oído. Es descrita en tratados clásicos de anatomía como un hueso independiente [120]. Intentos de demostrar la conexión con el yunque de este elemento no consiguieron convencer a toda la comunidad científica del siglo XIX [121, 122]. Incluso en el siglo XX se ha defendido la existencia de este cuarto hueso [20], pero a día de hoy es incuestionable la conexión de estas dos estructuras [123]. Otra cuestión es si se sigue considerando adecuada la denominación que posee. La calificación de lenticular debería corresponderse con una estructura biconvexa pero eso no es así: esta apófisis consiste en un pedículo que nace de la porción medial y distal de la rama larga del yunque y una estructura plana que se recubre de cartílago y que formará parte de la articulación incudostapedial [12]. Existen modelos computerizados que demuestran la flexibilidad de esta estructura y la contribución a la micromecánica de la articulación [124].

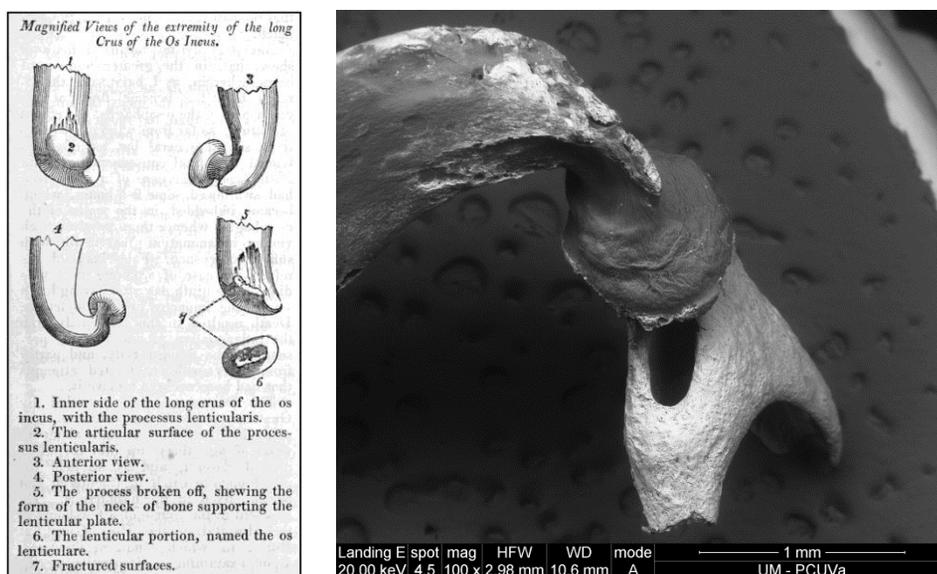


Fig 161. A la izquierda, ilustración de Soemmerring (1806) [125]. A la derecha, detalle de la unión entre apófisis larga y lenticular en una fotografía obtenida con SEM-BSED.

Aunque también se ha comprobado cierta variabilidad en la disposición de la apófisis corta, de acuerdo con los resultados de este trabajo, la apófisis larga es el elemento crítico de la estructura del yunque. De las características morfológicas, es la que más difiere entre unos y otros ejemplares, con mucha más variabilidad en la longitud, ángulo, grosor y curvatura que el resto de partes rígidas del hueso. Esta diversidad morfológica no parece estar relacionada con el sexo o la edad del paciente.

7.3.2 Vascularización

Existen numerosos canales vasculares de calibre muy diverso distribuidos por todo el hueso, excepto en las superficies articulares y las uniones ligamentosas. La red vascular que nutre al yunque puede observarse en algunas muestras analizadas. En algunos casos los orificios son de un diámetro considerable y pueden dejar ver grandes cavernas en el interior del hueso. En la mayoría, la extensa perforación por pequeños orificios en la superficie nos habla de las características microvasculares de la nutrición del hueso. La vascularización del yunque sigue un patrón diferente a otros elementos esqueléticos habituales [21]. Los vasos submucosos que discurren por la superficie del osículo penetran en el espesor del hueso formando una intrincada red de canales y canalículos que atraviesa la integridad del yunque [26, 126]. Una región importante, por las implicaciones fisiopatológicas que puede tener, es la correspondiente a la apófisis larga y lenticular y su relación con la articulación incudoestapedia. En esta última localización las estructuras reciben un aporte sanguíneo de las arterias que discurren por el tendón del músculo estapedia, vasos estapediales y vasos que descienden por la apófisis larga –en superficie y en profundidad– hasta anastomosarse en conjunto [127,128].

En este trabajo se analiza fundamentalmente la morfología y las alteraciones que sufre el yunque en su superficie, pero se comprobó en varios cortes realizados en dos piezas la existencia de estos canales vasculares en la profundidad del hueso. Con iguales resultados, los procesos patológicos que habían llevado a la destrucción de una parte considerable de ciertas regiones del osículo también permitieron observar este entramado vascular interno que, especialmente en el cuerpo central, pudo ser inspeccionado al microscopio en varios casos. Los orificios por los que penetran los vasos que nutren el tejido óseo profundo son de diferente calibre, están dispuestos de forma aleatoria y no se pudo comprobar ningún patrón específico o localización estable en las muestras analizadas aunque sí se apreció una mayor confluencia en la zona más superior del cuerpo del yunque.

7.3.3 Estudio de superficie

Bajo las capas mucosa y perióstica del yunque, se encuentra el tejido óseo formado por fibras colágenas calcificadas parcialmente compactadas [75]. En el estudio microscópico se aprecia una predominancia de tejido fibrilar calcificado en la mayor parte de la superficie ósea. Estas fibras de colágeno forman un entrelazado característico que, en algunas zonas, adoptan caprichosos patrones como si un complicado trabajo de cestería se tratase. En ocasiones se aprecian valles en forma de nichos en cuyo interior podrían haberse encontrado células osteocíticas.

Este patrón fibrilar que domina la mayor parte del yunque, se organiza de forma más ordenada en ciertas localizaciones. Bajo las superficies articulares, el aspecto es mucho más uniforme dando cuenta de una mayor compactación del material protéico calcificado. Algo similar ocurre en la zona de inserción del ligamento posterior del yunque, donde la imagen en empedrado refleja la unión mucho más vigorosa de las fibras elásticas al tejido óseo. Alrededor de la faceta de la articulación incudomaleolar, las fibras se organizan de forma más paralela y circunferencial a aquélla. En los canales vasculares también ocurre algo similar, donde estos filamentos adquieren una disposición helicoidal hacia el interior del orificio.

Otra zona donde las fibras se disponen más ordenadas es en la apófisis larga, donde se organizan paralelas al eje principal. Esta característica se ha podido comprobar tanto en superficie como en profundidad gracias a la existencia de cavidades vasculares o, también, debido a la destrucción que las patologías crónicas de oído medio (en especial la Otitis Media Crónica) habían provocado en algunas piezas y que dejaba a la vista las fibras organizadas y truncadas por esa erosión.

Las fibras de colágeno en el tejido óseo se disponen de forma muy diversa según el tipo de hueso que sea, así como de su localización y función. Estas fibras se alinean generalmente paralelas a los huesos largos, especialmente aquellos que soportan cargas. Cambios en las fuerzas que se aplican sobre el tejido óseo llevan a una reorganización de las fibras de colágeno [129].

Cualquier proceso de reorganización que tenga lugar en un tejido en que han cristalizado sales de calcio va a requerir la destrucción previa de las fibras que lo contienen para más tarde iniciar un proceso de reconstrucción y formación de nuevas fibras en la orientación adecuada. En este proceso de remodelación interviene el osteoclasto, que produce la resorción del tejido óseo [130]. La acción de los osteoclastos origina una serie de horadaciones en el hueso denominadas bahías osteocásticas o lagunas de Howship [131]. En nuestro estudio se pueden ver estas lagunas de unas 10–20 micras de diámetro agrupadas en racimos más o menos extensos y que afectan a la superficie del hueso en diversas localizaciones, aunque también pueden estar presentes en zonas más profundas del hueso. Especialmente elevada es la presencia de zonas de resorción ósea en la parte inferior del cuerpo del yunque y la apófisis larga. También hemos notado, por los hallazgos al microscopio, una predilección por los agujeros vasculares, en los que se pueden apreciar partes más o menos extensas de remodelación de tejido.

7.3.4 Remodelación

El yunque alcanza su aspecto externo adulto alrededor de la semana 16 de gestación [132, 133] y, a continuación, se produce una osificación progresiva que no está completa en el momento del nacimiento. En los primeros meses de vida extrauterina existe todavía una cavidad medular en el cuerpo del yunque que será sustituida por tejido óseo compacto y canales vasculares, conservando esta estructura durante toda la vida [14].

A lo largo de los años el yunque sufre una serie de modificaciones, produciéndose pequeños cambios morfológicos en la mitad inferior, en forma de depresiones [15]. Es conocido que la superficie del osículo no se mantiene estable, sino que se remodela a lo largo de la vida. Estos cambios suceden con mayor frecuencia en la apófisis larga, donde existe un aumento de la actividad osteoclástica [77]. Se ha descrito un incremento de la resorción ósea del extremo distal de la *crus longum* y la apófisis lenticular relacionado con la edad, especialmente a partir de 60 años [79]. En este estudio de Lannigan encuentran una mayor destrucción de tejido en varones en la sexta década de la vida pero otros autores no están de acuerdo con esas diferencias en cuanto al sexo del individuo [81].

A la vista de nuestra investigación, las áreas de actividad osteoclástica en la superficie del yunque son más frecuentes en la parte inferior del cuerpo y la apófisis larga del yunque, aunque pueden verse por toda la extensión del hueso donde existe un patrón fibrilar de superficie. Y estos cambios se pueden apreciar con mayor frecuencia en individuos jóvenes, en los que parece existir un recambio óseo más intenso. En los pacientes de mayor edad, la remodelación ósea no desaparece y se sigue observando actividad osteoclástica, aunque menos extensa. Lo que sí se objetiva es un daño progresivo de la arquitectura ósea a nivel distal de la *crus longum* que, en ocasiones, provoca la desconexión con la apófisis lenticular, un hecho que se ha descrito espontáneamente en algún caso [134].

De acuerdo con los hallazgos obtenidos, parece existir una disminución –relacionada con la edad– de la actividad celular que interviene en el proceso de renovación ósea. La disminución de la actividad osteoclástica, no obstante, no es suficiente para equilibrar el descenso en la formación de hueso nuevo. Todo ello provoca un aumento de las áreas líticas que, como consecuencia del desequilibrio destrucción–formación ósea, se originan sobre la apófisis larga del yunque.

El equilibrio entre destrucción y reparación del tejido óseo depende de muchos elementos, entre los cuales destacan los factores hormonales responsables del metabolismo óseo sistémico [135]. Por esta razón deberían explicarse cambios generales en la composición del hueso, pero no sería suficiente para aclarar las peculiaridades topográficas a las que hacemos referencia. Además, hemos comprobado que la mineralización aumenta de forma generalizada en el yunque con el paso de los años y la mayor parte de alteraciones del metabolismo fosfocálcico provocan un efecto contrario, como ocurre en la osteoporosis [136]. Por esta razón, no podemos asignar un papel a los cambios hormonales en las transformaciones que hemos podido documentar.

El que exista una remodelación más intensa en la apófisis larga podría deberse simplemente a factores anatómicos, ya que es una de las zonas más estrechas de la cadena. Pero el estribo tiene estructuras más finas y, salvo en el cuello, es muy rara su erosión [81], así que deben existir otras causas. La teoría vascular puede encajar aquí de alguna manera, pues existe una delicada red que nutre la zona de la articulación incudoestapedial [128] y que podría limitar de alguna manera la vascularización de la apófisis larga. La actividad celular, no obstante, disminuiría en el caso de un menor aporte sanguíneo al tejido [137] y hemos comprobado que existe una extensa actividad osteoclástica en la región. Por lo tanto, no parece que el factor vascular juegue un papel importante en la especial remodelación que sufre la *crus longum*.

Como se apuntó anteriormente, las fibras de tejido óseo se alinean dependiendo de las fuerzas que se ejercen sobre el hueso siguiendo lo que se conoce como la Ley de Wolff [138]. Aunque no se conocen bien estos mecanismos se propone en algunos casos la existencia de un “mecanostato”, o sistema capaz de regular la cantidad de masa ósea en función, por una parte, de la sobrecarga mecánica detectada, y, por otra, de las necesidades de resistencia del momento [139]. La *crus longum incudis* es una zona en la que existen numerosas fuerzas de tracción y torsión en la transmisión sonora y, aunque los estudios publicados se centran más en la biomecánica de la articulación incudo-estapedial, algún trabajo demuestra la influencia que tienen estas fuerzas de torsión en el equilibrio del tejido óseo [140]. Hay que tener en cuenta también la participación activa e intermitente de los músculos del oído medio, que alteran la biomecánica de la cadena osicular, y que modifican las fuerzas de torsión que existirían en la apófisis larga del yunque. La acción de estos músculos disminuye con la edad [141] por múltiples factores algo que, unido a la rigidez que se puede inducir debido a cambios en las cápsulas articulares, hace que –probablemente– estas fuerzas de torsión disminuyan en esta zona a la vez que lo hace la necesidad de un *turnover* elevado. Otro hallazgo que se relaciona con estos fenómenos torsionales es la aparición –en la apófisis larga de algunos especímenes– de hueso desestructurado morfológicamente, algo que ocurre tanto en huesos normales como en los patológicos.

7.3.5 Cambios relacionados con la edad

Hemos hablado ya de los cambios morfológicos que sufre el yunque –o más específicamente ciertas zonas de él– en relación con la remodelación a medida que el sujeto envejece. Uno de los objetivos de esta tesis es relacionar los hallazgos que se obtienen al microscopio con los resultados de los análisis químicos respecto a las características de la estructuras protéica y mineral del hueso. He aquí los resultados de estas averiguaciones.

Existen algunos trabajos que estudian la relación de la edad con el contenido mineral del hueso en base a análisis elemental de calcio y fósforo, no encontrando diferencias entre individuos jóvenes y mayores [142, 143]. También se ha afirmado que el martillo mantiene su composición mineral desde edades medias de la vida hasta la senectud [85]. Pero son la mayoría de los estudios los que sostienen todo lo contrario: que el contenido mineral del tejido óseo se incrementa con la edad hasta que alcanza un máximo [144] y que sufre modificaciones en la composición y la cristalinidad a lo largo de la vida [145]. Además, existe una serie de cambios en la hidroxiapatita del hueso a medida que el organismo envejece, produciéndose una sustitución con iones carbonato [113–115]. Los cambios en estas características no sólo aparecen con la edad del individuo, sino también con la edad del tejido [146, 147]. El hecho de que el hueso esté en constante cambio, y que esté constituido por una mezcla de tejido óseo nuevo y antiguo, hace que los resultados de las mediciones puntuales sean muy diversos [148]. En períodos de rápido crecimiento o alta remodelación del hueso existe una mineralización menor del tejido; mientras que con la edad, a medida que el hueso se estabiliza, la mineralización aumenta [149].

La mineralización del yunque parece aumentar a medida que lo hace la edad, tal y como demuestra este trabajo. Más aún, a partir de la sexta década de la vida se produce un cambio importante en la proporción entre la fracción mineral del tejido óseo, fundamentalmente hidroxiapatita, y la estructura orgánica, formada en su mayor parte por colágeno tipo I. Esta variación se hace a favor de la parte mineral que –a su vez– también sufre modificaciones. En el estudio con FTIR se evidenció que los individuos de igual o más de 60 años tenían un índice M/m un 58% más que los pacientes jóvenes. No existe descripción en la literatura que describa este hecho en ningún elemento de la cadena osicular, sino que se postulaba que la cantidad de mineral en los huesecillos era constante a lo largo de la vida [85, 150]. Estos estudios medían la relación Ca/P y vienen a coincidir con nuestros resultados con EDX, en los que no se logra detectar diferencias del cociente Calcio/Fósforo para jóvenes y ancianos. Es, quizás, una técnica inadecuada puesto que hemos tenido en cuenta mediciones puntuales en varias localizaciones del hueso y, como hemos dicho anteriormente, el tejido óseo se compone de diversas áreas de madurez en las que la mineralización es distinta [116]. Los resultados de Ca/P que hemos obtenido en hueso profundo, más maduro, corroboran esta teoría.

Una razón que explica el incremento de la mineralización con la edad es el aumento de la madurez del tejido óseo al disminuir la renovación o *turnover* óseo con el paso de los años [151]. Esta hipótesis encaja con nuestras observaciones con SEM, en las que se ha visto un descenso

en la actividad de remodelación del hueso, con menos presencia de osteoclastos a la par que un aumento en el deterioro del hueso.

El índice Carbonato/Fosfato también se incrementa en etapas avanzadas de la vida, lo que habla de una transformación en las características de las sales cálcicas que componen el hueso. La carbonatación se asocia, por lo general, a un aumento en la cristalinidad y, en consecuencia, un incremento en la fragilidad del hueso [113–115]. Además, el tejido óseo es más frágil cuando el contenido mineral excede un valor crítico [152].

Los cambios que observamos en este estudio afectan a todo el hueso, pero es significativo que la mineralización y la carbonatación sucedan con más intensidad en la apófisis larga del yunque que en el resto del osículo. Recordemos además que, aunque no siendo estadísticamente significativo, hemos detectado valores superiores en el cociente Ca/P en la rama larga del yunque. Como se ha visto mediante SEM, la *crus longum* sufre a lo largo de la vida un proceso de remodelación activa muy intenso. Este recambio continuo de una gran parte de la superficie de la apófisis hace que la madurez del tejido de esta región sea menor y, por lo tanto, el depósito de sales cálcicas sea menor. En el experimento realizado con FTIR se evidencian valores menores en el cociente M/m en este fragmento que, si bien no tienen significación estadística, pueden ratificar esta teoría.

7.4. ESTUDIO SOBRE YUNQUE EN COLESTEATOMA

Es característico en el colesteatoma, y un signo diagnóstico fundamental, la destrucción ósea que provoca en las estructuras del oído [64, 154–158]. De especial interés para este estudio es el daño provocado por esta patología en la cadena osicular, hecho que tiene consecuencias sobre la función de estos elementos en la transmisión del sonido [159]. Uno de los objetivos de esta tesis es recabar información acerca del mecanismo de destrucción ósea que provoca el colesteatoma en los huesecillos del oído medio. Con las técnicas analíticas empleadas se ha logrado obtener una serie de datos que aportan nueva información sobre el fenómeno fisiopatológico por el que se llega a la destrucción del yunque en esta enfermedad.

Todos los casos que fueron estudiados correspondían a pacientes con un diagnóstico de colesteatoma realizado en la consulta otorrinolaringológica y que precisó, como es habitual, de un tratamiento quirúrgico con el objetivo de intentar eliminar las estructuras epiteliales alteradas responsables del daño en el oído medio, fundamentalmente. Pero uno de las dificultades a las que se enfrenta el cirujano en estos casos es el daño originado por esta patología en los elementos de la cadena osicular y que es responsable, en numerosas ocasiones, del déficit auditivo del paciente. La problemática surge al intentar devolver la transmisión sonora necesaria para este proceso sensorial [160]. En algunas ocasiones esto, lamentablemente, no es posible [161]. Los huesecillos de la cadena –en especial, el yunque– son elementos delicados en los que es difícil la reparación en casos de destrucción leve [162]. En caso de daño mayor, el uso de sus restos para la reconstrucción es no menos que controvertido en una patología que tiende de forma muy significativa a la recurrencia [163–165].

Uno de los problemas metodológicos al que nos enfrentamos en este trabajo fue el intentar conocer el momento en el que se inicia el proceso patológico que estamos estudiando. De la historia clínica se puede recoger el período aproximado del inicio de los síntomas, bien sean de tipo inflamatorio o auditivo. Pero este momento, que para el clínico puede ser importante, para el paciente resulta complejo de identificar con una mínima precisión. Es, por ello, por lo que los datos sobre el tiempo de evolución deben tomarse con cautela. Más aún si consideramos que, como el análisis de los datos revela, se hallan en relación directa con la edad del paciente, lo cual constituye un factor de confusión significativo.

De los remanentes osiculares analizados, el 99,1% presentaban alteraciones morfológicas de diversa consideración en forma de lisis o destrucción de diferentes partes del hueso. La zona que con mayor frecuencia se hallaba afectada, fue la *crus longum*, erosionada en la mayor parte de los pacientes, aunque no en todos ellos. En algunos casos el colesteatoma había producido una destrucción selectiva de la apófisis corta, permaneciendo indemnes –macroscópicamente– el resto de regiones.

La región del yunque más afectada en los procesos inflamatorios del oído medio es la apófisis larga [166] pero, en el caso del colesteatoma no es infrecuente observar lesiones en el cuerpo o la apófisis corta de forma aislada, sin que se produzcan daños en el resto del hueso [167].

Los mecanismos de destrucción ósea del colesteatoma han sido estudiados en numerosas ocasiones [153, 154, 168–171] pero a día de hoy sigue sin conocerse completamente el proceso por el que el tejido óseo, tanto de los huesecillos del oído medio como el resto de estructuras óseas del temporal, es depuesto por esta enfermedad. Por un lado se ha intentado explicar por un proceso expansivo del propio colesteatoma [21, 172]. Hay autores que sugieren un mecanismo químico [173] como responsable del efecto lítico sobre el hueso, directamente provocado por el colesteatoma. Otros pensaban que el daño era generado por el proceso inflamatorio que tiene lugar en el oído medio, independientemente de si existe colesteatoma o no [174]. A día de hoy se considera un problema aun no resuelto completamente. Se conoce que la resorción de tejido óseo, además de estar relacionada con factores inflamatorios y mecánicos, se asocia a factores humorales como interleukinas [175], colagenasa [176], interferón-beta, citoquinas [177], proteína relacionada con parathormona o la queratina [55], liberados por la matriz del colesteatoma [56, 178]. La regulación de la actividad celular del tejido óseo parece jugar un papel importante en el proceso de lisis. El equilibrio entre destrucción osteoclástica y renovación de las fibras colágenas por parte del osteoblasto parece estar alterado por efecto del colesteatoma [179].

En nuestro trabajo mediante SEM hemos encontrado un aumento franco de la actividad osteoclástica en las zonas de destrucción del colesteatoma. Este hallazgo ha sido muy evidente en los casos de colesteatomas aticales con erosión de la apófisis corta y en cuerpo del yunque. Para muchos autores, la localización del colesteatoma influye en la destrucción del yunque, especialmente el atical [165]. Como se mencionaba anteriormente, estas áreas superiores del osículo sufren una remodelación mucho más baja en situaciones de normalidad y la presencia de osteoclastos es menor que en el resto de regiones. En los casos que existe una agresión local por esta enfermedad, la actividad resorptiva celular se aumenta claramente. De la intensa remodelación que ocurre en estas localizaciones da cuenta el hecho de encontrar superficies irregulares y bordes abruptos en las zonas líticas, incluso con desprendimiento de fragmentos de hueso.

Pero este aumento de la resorción ósea puede no ser el verdadero mecanismo por el que el colesteatoma provoca el daño en el hueso, sino más bien una consecuencia de ello. Existe cierta controversia sobre si la actividad osteoclástica está aumentada o disminuida globalmente en la otitis media colesteatomatosa [80, 180–184]. En nuestro caso podemos afirmar que la actividad osteoclástica está aumentada claramente en las zonas de agresión y de forma general en el osículo.

Pero además, y especialmente en las zonas de contacto con el colesteatoma, se observan lesiones completamente diferentes en las que se produce una agresión sobre las fibras colágenas provocando su rotura y descomposición, tal y como se observa en las áreas de pulido o apomazado ampliamente detectadas en nuestra investigación. Por este mecanismo se produce otro daño añadido que también se detecta en las observaciones al microscopio, que es el vascular. Numerosos canales vasculares quedan expuestos tras esta lisis superficial que se produce en muchas regiones de apomazado. Pero es importante resaltar que otros muchos foramina nutricia en otras localizaciones exhiben la rotura de las fibras superficiales de hueso que lo rodean, lo que habla de una lesión vascular generalizada. Algunos autores [185] piensan

que el proceso inflamatorio que habitualmente acompaña al colesteatoma origina un daño vascular que limita el aporte de iones carbonato, lo que provoca una decarbonatación del tejido. Este hecho ha sido comprobado en nuestros estudios sólo en el núcleo del hueso y no tanto en el resto de su anatomía, pero muy en relación significativa con el grado de agresividad del colesteatoma.

En un completo estudio de Wong [76] con microscopía electrónica de barrido, se postula que la erosión ósea del colesteatoma ocurre en etapas y se invocan mecanismos de presión e inflamatorios. En hueso dañado por colesteatoma el apomazado que describen estos autores es muy característico de la zona de contacto del colesteatoma y supone el hallazgo de una forma de destrucción no mediada por células a la que se suma la que está provocada por el osteoclasto. A nuestro entender, el daño que se produce en el colesteatoma es el resultado de una acción química/bioquímica y el desequilibrio del *turnover* óseo. El osteoclasto probablemente no sea responsable directo de la destrucción del hueso; su frecuente presencia en la proximidad del colesteatoma es el resultado de un primer paso en la reparación del tejido óseo que no se completa por el osteoblasto, bien por la agresividad del pseudotumor o, quizás, por la inhibición de su actividad. La alteración de la función celular y la desestabilización del balance óseo parece ser más evidente en el caso de otitis media crónica, tema que se tratará posteriormente.

Aunque la presencia de lagunas de resorción osteoclástica es incuestionable según nuestros hallazgos, no deja de ser cierto que existe otro mecanismo de destrucción oscular en el que se produce una destrucción de las fibras y una probable decalcificación a raíz de los resultados. La teoría ácida de Walsh [173] como medio de destrucción a través de la decalcificación tiene un reflejo en nuestro estudio con EDX, ya que se observa una disminución del cociente Ca/P en las áreas de apomazado (y no en las lagunas osteoclásticas) con respecto al hueso normal.

La destrucción del tejido óseo del yunque ocurre progresivamente pero a velocidad muy variable de unos pacientes a otros. Como se denota en el capítulo anterior, el grado de destrucción no se relaciona de forma evidente con la edad del sujeto, salvo en el caso de la apófisis larga, cuya destrucción es más frecuente en individuos de más de 60 años.

En algunos casos en los que existe un daño muy importante de la estructura ósea y se ha comprometido, muy probablemente, la vascularización del tejido, el sistema de reparación colapsa provocando que las sales de calcio, removidas intensamente de las fibras de colágeno, precipiten en forma de cristales. Aunque este fenómeno sólo se haya visto en un caso (en el que se descartaron problemas renales de base), es muy significativo que los cristales correspondan a oxalato cálcico dihidratado, un precipitado de sales cálcicas que predomina en medios ácidos [111].

De los hallazgos con FTIR se deduce que el aumento de la mineralización y carbonatación que sucede a medida que avanza la edad se frena, incluso se invierte en el centro del osículo (cuerpo), en pacientes con colesteatoma. Cuando se analiza el grado de destrucción que provoca la enfermedad, son más patentes estos cambios.

Los datos que se obtienen con el análisis por tiempo de evolución quedan muy probablemente enmascarados por los cambios que se producen en el osículo en relación con la edad del

paciente y que fueron descritos en el hueso normal. El cociente M/m y el C/P aumentan a medida que avanza la enfermedad y –de forma dominante– al aumentar la edad. Es especialmente significativo en la apófisis larga, que parece seguir una evolución similar a la de un paciente sano.

Hay que llamar la atención sobre un factor importante, que es el hecho de que con esta técnica espectrográfica se analizan los remanentes de hueso y que en un grupo numeroso no se conservaban por la destrucción localizada en el área correspondiente. Por ello es importante tener en cuenta los datos que nos ofrece el cuerpo del yunque, con un sentido inverso a todos los cambios que se producen de forma normal.

Parece que el hueso, tras una agresión por parte del colesteatoma, se defiende aumentando el *turnover* óseo en las áreas lesionadas. El desajuste entre destrucción y nueva formación de hueso a favor del primero provoca la progresiva destrucción de la arquitectura normal del yunque. Por otro lado, en las zonas no afectadas por el problema, no parece existir grandes cambios en un primer momento y el tejido evoluciona como lo haría en situación normal. Pero lentamente, en el núcleo del hueso se va provocando una desmineralización progresiva, probablemente debido a la descalcificación que tiene lugar en el medio ambiente ácido que caracteriza al colesteatoma [58]. Ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, isobutirato, butirato y isovalerato) que se han descrito en la matriz del colesteatoma pueden alcanzar el hueso gracias a un incremento de permeabilidad asociado a mecanismos inflamatorios. Parece que el componente inorgánico del hueso se disuelve (disociándose en iones calcio, fosfato, carbonato e hidroxilo) debido a las condiciones de acidez provocando la desmineralización del hueso [71]. Según estos autores, a medida que la desmineralización progresa, la concentración de iones en el exudado aumenta y, en ocasiones, hidroxapatita u otro tipo de sal cálcica se precipita en dicho exudado.

7.5. ESTUDIO SOBRE YUNQUE EN OTITIS MEDIA CRÓNICA

Para el estudio en Otitis Media Crónica sin colesteatoma, se utilizaron 24 yunques de pacientes a los que se intervino quirúrgicamente en cirugías de tipo funcional. Este tipo de patologías conforma un grupo heterogéneo de procesos cuyo nexa en común es la existencia de un proceso inflamatorio crónico en el oído medio. El análisis agrupó a 15 pacientes con perforación timpánica central y a 9 con un diagnóstico de proceso adhesivo crónico.

Del análisis macroscópico se advierte la especial predilección de las lesiones líticas en la apófisis larga de los yunques analizados, circunstancia que comparte con el otro grupo de patología inflamatoria crónica. Pero, al contrario que en el colesteatoma, en este caso no se observan áreas de destrucción importantes en el resto de topografía del osículo, algo que ocurría con relativa frecuencia en la otitis media colesteatomatosa.

En muchos estudios descriptivos, y la experiencia clínica lo demuestra, se comprueba que en la OMC se producen menos lesiones osiculares que en el caso de la patología colesteatomatosa. Los defectos de la *crus longum* son los más frecuentemente encontrados en estas patologías, siendo de muy diversa extensión [186].

Los defectos líticos de la cadena suelen ser más frecuentes en el caso de las otitis crónicas con perforación timpánica. Las perforaciones totales y posteriores parecen tener un efecto erosivo mayor en los osículos [187]. En nuestro estudio, por el contrario, no se han observado diferencias significativas –tanto con el uso de técnicas espectrográficas como con el empleo de microscopía– entre el daño osicular patente en las otitis medias perforadas como en el caso de patologías inflamatorias con tímpanos cerrados.

Otra diferencia que caracteriza los hallazgos que se obtienen en OMC es la existencia de menos irregularidades en los bordes de erosión, hecho que sugiere una menor agresividad en el mecanismo de destrucción ósea. Esta erosión parece tener un componente celular más escaso ya que, según nuestras observaciones, la actividad osteoclástica es significativamente menor en este caso. La existencia de numerosas roturas de fibras colágenas en varios puntos de la superficie del osículo, así como el reconocimiento de deformidades de la estructura fibrilar, sumado a la presencia de un patrón apomazado en diferentes localizaciones, son varias manifestaciones que caracterizan la alteración de la microestructura en estos procesos inflamatorios crónicos. Estos determinantes hallazgos hacen pensar en la existencia de un fallo en la remodelación ósea.

Existe, como en el caso de la otitis colesteatomatosa, un daño vascular que se refleja en el deterioro de los orificios vasculares examinados en múltiples localizaciones del hueso. Parece existir una alteración generalizada en la vascularización del yunque que, si bien no es tan agresiva localmente como en el caso del colesteatoma, conlleva un daño difuso y progresivo en todo el osículo.

Se ha otorgado un papel muy importante a la célula osteoclástica en la patogenia del daño osicular en OMC; algunas veces, de forma exclusiva [78]. Algunos autores se basan en que el osteoclasto es la única célula capaz de provocar la resorción ósea [188]. Pero también se han invocado otras células involucradas en el daño del tejido óseo en otitis crónicas, como los mastocitos [189]. En muchos estudios se investiga el mecanismo de destrucción ósea desde un punto de vista general, aglutinando todos los procesos inflamatorios del oído medio, incluido el colesteatoma [190]. Con este último comparte las teorías del daño provocado por factores enzimáticos como la colagenasa [191] o la fosfatasa ácida, a la que se ha otorgado bastante importancia [192, 193].

El efecto de la OMC sobre el tejido óseo se define en muchos casos como una osteomielitis [194] y se han relacionado numerosos agentes infecciosos capaces de provocar tanto la inflamación del tejido óseo, como su erosión [195]. Se ha investigado la existencia de biofilms presentes en otitis media crónica supurativa, colesteatoma y –en menor medida– en otitis media crónica no supurativa [196].

En nuestra investigación no podemos otorgar ese papel tan activo al osteoclasto en los casos de OMC. En el caso de colesteatoma sí veíamos que la resorción celular estaba aumentada en las áreas de destrucción, pero también se apreciaban mecanismos diferentes de lisis ósea. Otro hallazgo en contra de la proliferación osteoclástica que aportamos es que cuando el daño al tejido avanza en profundidad se observan al microscopio electrónico superficies sin la presencia de lagunas de Howship. En su lugar se visualiza un patrón de fibras rotas o el apomazado al que nos hemos referido en varias ocasiones.

Pero en nuestro caso, además de la disminución de la resorción osteoclástica que observamos, una característica importante en la OMC frente al colesteatoma es la progresiva deformación de la micro-arquitectura de la superficie osicular. Existe, por tanto, un problema en la formación de tejido óseo de manera que las nuevas fibras de colágeno son morfológicamente irregulares y el proceso de mineralización no se realiza correctamente. La teoría de que en las OMC exista un daño en la matriz extracelular se justifica en la existencia de tejido óseo aparentemente neo-formado de características amorfas en lugar del patrón fibrilar habitual. Esta manifestación ha sido recogida ampliamente en varios pacientes con otitis media crónica en los que, además de la sustancia mineral irregular se aprecian también placas de tejido hialino degenerado y calcificado que parecen corresponder a fragmentos de timpanosclerosis. En estas placas se distinguen algunas fibras con cierta organización lineal en algunos casos, aunque suele predominar un tejido de aspecto arenoso y desorganizado.

La estructura protéica de las placas de timpanosclerosis ha sido investigada identificando colágeno tipo I como el principal componente de la matriz [197]. Pero su estudio es muy complejo por la gran variedad de situaciones y tejidos que se pueden calcificar progresivamente en el oído medio [198].

El análisis espectrográfico evidencia un marcado descenso de los cocientes Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato que tiene lugar primordialmente en la apófisis larga del yunque. En esta

localización, la principal afectada en este grupo de patologías, se produce una aparente desmineralización de las fibras colágenas que, según nuestra teoría, están alteradas en la OMC.

La disminución de la mineralización del hueso es un fenómeno característico de la osteoporosis [89]. En cambio, la carbonatación se mantiene normal [116]. La osteomalacia es otra situación en la que –igualmente– disminuye el cociente M/m [136]. La densidad mineral del hueso está relacionada directamente con la resistencia mecánica, y su disminución se asocia a un aumento del riesgo de fracturas [199]. Esto explicaría la rotura de fibras aumentada y la lisis no mediada por células que defendemos en este trastorno. La calidad del hueso se altera en la osteoporosis a nivel de las interacciones entre los cristales minerales y las fibras de colágeno [200]. Algo similar puede ocurrir en el yunque durante los procesos crónicos que hemos estudiado.

Demostramos que en la apófisis larga de los yunques con OMC también tiene lugar una descarbonatación, algo que no aparece en la osteoporosis. Pero en ciertas circunstancias donde existen fenómenos inflamatorios como la osteomielitis, y bajo el concurso de un ambiente ácido, los minerales de fosfato de calcio tales como apatita descarbonatada y la brushita pueden precipitar sobre la superficie del hueso [201]. En nuestro estudio con EDX se obtuvieron relaciones Ca/P muy diversas en las mediciones del tejido amorfo encontrado, signo muy probable de la variedad de especies minerales que lo conforman.

Dentro de la remodelación ósea, en el proceso de remineralización de las nuevas fibras colágenas intervienen varios factores, como la carga de la matriz, el pH o proteínas no-colágeno como la osteonectina [202]. En el tejido óseo la formación y mineralización de la matriz extracelular es un proceso complejo que depende de interacciones moleculares [203]. Nuestra tesis es que en los procesos inflamatorios crónicos se alteran estas interacciones y dan lugar a un proceso de remineralización anómalo, en el que se forma tejido óseo irregular, se depositan sales cálcicas de diferente composición fuera de la matriz protéica y se produce una mineralización de diferentes áreas de degeneración hialina formando las placas de timpanosclerosis, cuyo contenido en calcio varía.

Si bien en el caso de la otitis media crónica con colesteatoma se tuvo la dificultad de inferir el tiempo de evolución de la enfermedad, fue aún más complejo el situar el inicio de la sintomatología en estos pacientes con historia imprecisa de patología crónica de oído medio. No obstante, se intentó clasificar a los pacientes según el tiempo de evolución desde el comienzo de los síntomas auditivos y/o inflamatorios.

De los resultados obtenidos del análisis por la evolución de la enfermedad, de gran heterogeneidad y complejos de interpretar, se alcanza una conclusión esencial que retorna al planteamiento inicial: la OMC es un conglomerado de procesos inflamatorios con etiopatogenias muy diversas que llevan al deterioro de los elementos de la cadena osicular –en nuestro caso, el yunque– a través de mecanismos diversos y, en muchas ocasiones, combinados.

De forma general, lo que sí se aprecia con nuestros estudios es que en OMC, el aumento de M/m y de C/P –que habíamos demostrado en yunque normal– resulta frenado. En osteoporosis

también se ha descrito un descenso en el contenido de carbonato que va apareciendo a medida que lo hace la edad [112].

En definitiva, la alteración de la función celular y la desestabilización del *turnover* óseo parece ser más evidente en el caso de las OMC, donde se observa una menor actividad osteoclástica, rotura de abundantes fibras, un proceso de desmineralización de la matriz y la neformación de tejido calcificado de forma errática y desestructurada.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.

■ conclusiones

8. CONCLUSIONES

De la interpretación de los resultados obtenidos se pueden extraer varias conclusiones. Estas son las más importantes:

- Las características químicas del yunque cambian con la edad, produciéndose un aumento en la Mineralización y en la Carbonatación. Las diferencias son más evidentes a partir de la sexta década de la vida.
- No existen diferencias de la microarquitectura ósea ni de la composición de la matriz extracelular del yunque entre ambos sexos.
- No existen diferencias significativas de la composición de la matriz extracelular entre las diferentes partes del yunque normal, salvo a partir de la segunda década de la vida, donde se produce un aumento de las relaciones Mineral/matriz y Carbonato/Fosfato.
- La apófisis larga es la estructura que más remodelación ósea sufre, disminuyendo ésta a lo largo de la vida. Este proceso se altera con los trastornos inflamatorios crónicos del oído medio, siendo esta *crus longum* la zona más frecuentemente dañada por aquéllos.
- El Colesteatoma invierte los cambios observados en la composición de la matriz extracelular del cuerpo del yunque normal en individuos mayores de 60 años.

- El mecanismo de destrucción ósea en el Colesteatoma es una combinación de agentes físicos y bioquímicos que actúan localmente y alterando el metabolismo óseo y su vascularización, y que los procesos de remodelación/cicatrización no son capaces de contener.
- El grado de Mineralización del yunque descende más cuanto mayor sea la agresividad del Colesteatoma.
- Los procesos inflamatorios crónicos del oído medio (excluyendo el Colesteatoma) producen un daño celular que altera la vascularización y el proceso de remodelación del yunque.
- La Otitis Media Crónica simple produce una desmineralización y descarbonatación de la apófisis larga del yunque especialmente.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.

■ **bibliografía**

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Killion MC, Dallos P. Impedance matching by the combined effects of the outer and middle ear. *J. Acoust. Soc. Am.* 1979;66:599.
2. Gil-Carcedo LM, Vallejo LA, Gil-Carcedo E. Anatomía del oído medio. En: Gil-Carcedo LM, Vallejo LA, Gil-Carcedo E, eds. *Otología*, 2ª edición. Madrid: Ed. Médica Panamericana;2004:13-39.
3. Deaver JB. *Surgical Anatomy: A Treatise on Human Anatomy in Its Application to the Practice of Medicine and Surgery*. Vol. 3. No. 8. Philadelphia: F Blakiston's Sons & Co., 1901-1903.
4. Mallo M. Embryological and genetic aspects of middle ear development. *Int J Dev Biol.* 1998;42:11-22.
5. Anson BJ, Bast TH. Developmental anatomy of the temporal bone and auditory ossicles in relation to some problems in endaural surgery. *Laryngoscope.* 1958;68:1380-8.
6. Gray H. *Anatomy of the Human Body*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918.
7. Allis EP. On the Homologies of the Auditory Ossicles and the Chorda Tympani. *J Anat.* 1919;53:363-370.
8. Wolff D, Bellucci RJ. The human ossicular ligaments. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1956; 65:895.
9. Okamoto M, Sato M, Kirikae I. Studies of the acoustic reflex. II. Experimental studies on the function of the tensor tympani muscle. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1954;63:950-9.
10. Yates AL. The Anatomy of the Middle Ear: (Section of Otology). *Proc R Soc Med.* 1936;29:837-840.
11. Bellucci RJ, Wolff D. The incus, normal and pathological. *Arch Otolaryngol.* 1966 ;83:413-9.
12. Chien W, Northrop C, Levine S, et al. Anatomy of the distal incus in humans. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2009;10:485-96.
13. Anson BJ, Donaldson JA. *The Surgical Anatomy of the Temporal Bone and Ear*. Philadelphia: WB Saunders Co., 1967.
14. Yokoyama T, Iino Y, Kakizaki K, Murakami Y. Human temporal bone study on the postnatal ossification process of auditory ossicles. *Laryngoscope.* 1999;109:927-30.
15. Ghorayeb BY, Graham MD. Human incus long process depressions in the surface of the normal ossicle. *Laryngoscope.* 1978;88:1184-9.
16. Naujoks JH, Kempf HG. Histology and morphometry of explanted ear ossicles in man. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg).* 1986;65:374-6.
17. Gulya AJ. *Anatomy of the temporal bone with surgical implications*. 3rd ed. Informa Healthcare. New York;2007.
18. Seki M, Miyasaka H, Edamatsu H, Watanabe K. Changes in permeability of stria vessels following vibration given to auditory ossicle by drill. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2001;110:122-6.

19. Gussen R. The human incudomalleal joint. Chondroid articular cartilage and degenerative arthritis. *Arth Rheum* 1971; 14:465.
20. Pal'chun VT, Magomedov MM. Some anatomical features of the long process of the incus. *Vestn Otorinolaringol.* 1997;19-20.
21. Nager GT, Nager M. The arteries of the human middle ear, with particular regard to the blood supply of the auditory ossicles. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1953;62:923-49.
22. Hamberger CA, Wersaell J. Vascular supply of the tympanic membrane and the ossicular chain. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1964;188:308+.
23. Lannigan FJ, O'Higgins P, McPhie P. The vascular supply of the lenticular and long processes of the incus. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1993;18:387-9.
24. Lindeman H. Some histological examinations of the incus and stapes with special regard to their vascularization. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1964;188:319+.
25. Anson BJ, Harper DG, Hanson JR. Vascular anatomy of the auditory ossicles and petrous part of the temporal bone in man. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1962;71:622-31.
26. Anson BJ, Harper DG, Winch TR. Intra-osseous blood supply of the auditory ossicles in man. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1964;73:645-58.
27. Anson BJ, Winch TR. Vascular channels in the auditory ossicles in man. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1974;83(2):142-58.
28. Lim DJ. Functional morphology of the lining membrane of the middle ear and eustachian tube. An overview. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1974; 83:5.
29. Hentzer E. Ultrastructure of the normal mucosa in the human middle ear, mastoid cavities, and Eustachian tube. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1970; 79:1143.
30. Grippaudo M. Histopathological studies of the ossicles in chronic otitis media. *J Laryngol Otol.* 1958;72:177-89.
31. Sarrat R, Garcia Guzman A, Torres A. Morphological variations of human ossicula tympani. *Acta Anat (Basel).* 1988;131:146-9.
32. Cameron DA. The ultrastructure of bone. En: *The Biochemistry and Physiology of Bone*, Vol 1. Bourne GH, ed. New York: Academic Press;1972:191-236.
33. Steiniche T, Hauge EM. Normal Structure and Function of Bone. En: An YH, Martin KL, eds. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Totowa: Humana Press;2003:59-72.
34. Einhorn TA. The bone organ system: form and function. En: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, eds. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press;1996:3-22.
35. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers," *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:3-12.
36. González J, Olmos JM. Fisiopatología de la osteoporosis y mecanismo de acción de la PTH. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2010;2:5-17.
37. Tate MLK. "Whither flows the fluid in bone?" An osteocyte's perspective. *J Biomech.* 2003;36:1409-24.
38. Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med.* 2014;20:449-59.

39. Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res.* 2002;17:77-90.
40. Tzaphlidou M. Bone architecture: collagen structure and calcium/phosphorus maps. *J Biol Phys.* 2008;34:39-49.
41. Qiu ZY, Cui Y, Tao CS, Zhang ZQ, Tang PF, Mao KY, Wang XM, Cui FZ. Mineralized Collagen: Rationale, Current Status, and Clinical Applications Materials. 2015;8:4733-50
42. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008;61:577-87.
43. Posner AS. Crystal chemistry of bone mineral. *Physiol Rev* 1969;49:760-792.
44. Kini U, Nandeesh BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. En: I. Fogelman et al. (eds.), *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg;2012:29-57.
45. Nicholls JJ, Brassill MJ, Williams GR, Bassett JH. The skeletal consequences of thyrotoxicosis. *J Endocrinol.* 2012;213:209-21.
46. Gil-Carcedo LM, Vallejo LA, Gil-Carcedo E. Otitis Media Crónica. En: Gil-Carcedo LM, Vallejo LA, Gil-Carcedo E, eds. *Otología*, 2ª edición. Madrid: Ed. Médica Panamericana;2004:181-197.
47. Sultana WA. Adhesive otitis media. An approach to its treatment. *Eye Ear Nose Throat Mon.* 1970;49:297-9
48. Ohnishi T, Shirahata Y, Fukami M, Hongo S. The atelectatic ear and its classification. *Auris Nasus Larynx.* 1985;12 Suppl 1:S211-3.
49. Seibert JW, Danner CJ. Eustachian tube function and the middle ear. *Otolaryngol Clin North Am.* 2006;39:1221-35.
50. Bhaya MH, Schachern PA, Morizono T, Paparella MM. Pathogenesis of tympanosclerosis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993;109:413-20.
51. Friedmann I, Galey FR. Initiation and stages of mineralization in tympanosclerosis. *J Laryngol Otol.* 1980;94:1215-29.
52. Young G. Aural cholesteatoma or cholesteatosis; a review. *J Laryngol Otol.* 1950;64:271-83.
53. Preciado DA. Biology of cholesteatoma: special considerations in pediatric patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2012;76:319-21.
54. Olszewska E, Rutkowska J, Özgirgin N. Consensus-Based Recommendations on the Definition and Classification of Cholesteatoma. *J Int Adv Otol.* 2015;11:81-7.
55. Olszewska E, Wagner M, Bernal-Sprekelsen M, Ebmeyer J, Dazert S, Hildmann H, Sudhoff H. Etiopathogenesis of cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004;261:6-24.
56. Kaneko Y, Yuasa R, Ise I, Iino Y, Shinkawa H, Rokugo M, Tomioka S, Shibahara Y. Bone destruction due to the rupture of a cholesteatoma sac: a pathogenesis of bone destruction in aural-cholesteatoma. *Laryngoscope.* 1980;90:1865-71.
57. Karma P, Palva A, Kärjä J. An analysis of mastoid cholesteatomas. *Laryngoscope.* 1977;87:1559-71.

58. Nguyen KH, Suzuki H, Ohbuchi T, Wakasugi T, Koizumi H, Hashida K, Baba R, Morimoto H, Doi Y. Possible participation of acidic pH in bone resorption in middle ear cholesteatoma. *Laryngoscope*. 2014;124:245–50.
59. Maniu A, Harabagiu O, Perde Schrepler M, Cătană A, Fănuță B, Mogoantă CA. Molecular biology of cholesteatoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2014;55:7–13.
60. Gunnel F. Degeneration of the chain of auditory ossicles in inflammatory processes of the middle ear. *Arch Ohren Nasen Kehlkopfheilkd*. 1958;173:336–40.
61. Chuden HG. Time factor in ossicular chain destruction in chronic otitis media. *HNO*. 1973;21:69–72.
62. Lisonek P. Scanning electron microscopic study of the damaged lenticular process of the incus. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med*. 1983;105:45–8.
63. Maynard J, Bumsted RM, Huang CC, Abramson M. Bone resorption in chronic otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1979;88:693–700.
64. Bretlau P, Sorensen CH, Jorgensen MB, Dabelsteen E. Bone resorption in human cholesteatomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1982;91:131–5.
65. Dana W, Mayo, Foil A, Miller, Robert W, Hannah. *Course Notes on the Interpretation of Infrared and Raman Spectra*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2003.
66. Colthup NB, Daly LH, Wiberley SE. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. 3rd edition. New York: Academic Press; 1990.
67. Stuart BH. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2004.
68. Dritsa V. FT-IR Spectroscopy in Medicine. En: Theophanides T, ed. *Infrared Spectroscopy – Life and Biomedical Sciences*. InTech;2012:271–88.
69. Goodhew PJ. *Electron microscopy and analysis*. London: Taylor & Francis, 2001.
70. Ojeda JL. *Métodos de microscopía electrónica de barrido en biología*. Santander: Universidad de Cantabria;1997:21–40.
71. Ohsaki K, Yamashita S, Fujita A, Masuda Y, Ueda S, Sugiura T, Tamura K, Shibata A. Mechanism of bone destruction due to middle ear cholesteatoma as revealed by laser-Raman spectrometry. *Am J Otolaryngol*. 1988;9:117–26.
72. Duboeuf F, Burt-Pichat B, Farlay D, Suy P, Truy E, Boivin G. Bone quality and biomechanical function: a lesson from human ossicles. *Bone*. 2015;73:105–10
73. Brownson RJ, Marovitz WF. Scanning electron microscopy of normal human ossicles. *Laryngoscope*. 1972;82:355–62.
74. Brownson RJ, Marovitz WF. Comparative scanning electron microscopy of rodent and human ossicles. *Laryngoscope*. 1972;82:598–606.
75. Hassmann E, Chodynicky S. Scanning electron microscopy of human ossicles. *Arch Otorhinolaryngol*. 1978;220:175–85.
76. Wong J, Stoney P, Hawke M. Ossicular erosion by cholesteatoma: investigation by scanning electron microscopy utilizing a new preparation technique. *J Otolaryngol*. 1991;20:216–21.
77. Lannigan FJ, O'Higgins P, McPhie P. Remodelling of the normal incus. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1993;18:155–60.

78. Lannigan FJ, O'Higgins P, McPhie P. The cellular mechanism of ossicular erosion in chronic suppurative otitis media. *J Laryngol Otol.* 1993;107:12–6.
79. Lannigan FJ, O'Higgins P, Oxnard CE, McPhie P. Age-related bone resorption in the normal incus: a case of maladaptive remodelling? *J Anat.* 1995;186:651–5.
80. Uno Y, Saito R. Bone resorption in human cholesteatoma: morphological study with scanning electron microscopy. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995;104:463–8.
81. Chen H, Okumura T, Emura S, Shoumura S. Scanning electron microscopic study of the human auditory ossicles. *Ann Anat.* 2008;190:53–8.
82. Milisavljevic D, Stankovic M, Zivic M, Radovanović Z, Stankovic P. Changes in auditory ossicles in rheumatoid arthritis: scanning electron microscopic study. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2010;267:363–6.
83. Bagger-Sjöback D, Haverling M, Hjerpe A, Mendel L. The mineral content of the middle ear ossicles. A radiologic and chemical study on normal and diseased ossicles. *Am J Otol.* 1987;8:8–13.
84. Sánchez-Fernández JM, Saint-Gerons S, Sánchez del Rey A. A microanalytical study on human auditory ossicles in normal and pathological conditions. *Acta Otolaryngol.* 1992;112:317–21.
85. Tohno Y, Tohno S, Utsumi M, Minami T, Ichii M, Okazaki Y, Nishiwaki F, Moriwake Y, Naganuma T, Yamada M, Araki T. Age-independent constancy of mineral contents in human vertebra and auditory ossicle. *Biol Trace Elem Res.* 1997;59:167–75.
86. Cuba-Chiem LT, Huynh L, Ralston J, Beattie DA. In situ particle film ATR FTIR spectroscopy of carboxymethyl cellulose adsorption on talc: binding mechanism, pH effects, and adsorption kinetics. *Langmuir.* 2008;24:8036–44.
87. Fuchs RK, Allen MR, Ruppel ME, Diab T, Phipps RJ, Miller LM, Burr DB. In situ examination of the time-course for secondary mineralization of Haversian bone using synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy. *Matrix Biol.* 2008;27:34–41.
88. Figueiredo MM, Gamelas JAF, Martins AG. Characterization of Bone and Bone-Based Graft Materials Using FTIR Spectroscopy. In: Theophanides T, ed. *Infrared Spectroscopy – Life and Biomedical Sciences.* InTech;2012:315–38.
89. Gadeleta SJ, Boskey AL, Paschalis E, Carlson C, Menschik F, Baldini T, Peterson M, Rimnac CM. A physical, chemical, and mechanical study of lumbar vertebrae from normal, ovariectomized, and nandrolone decanoate-treated cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone.* 2000;27:541–50.
90. Mendelsohn R, Paschalis EP, Boskey AL. Infrared spectroscopy, microscopy, and microscopic imaging of mineralizing tissues: spectra–structure correlations from human iliac crest biopsies. *J Biomed Opt.* 1999;4:14–21.
91. Boskey AL, Mendelsohn R. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vib Spectrosc.* 2005;38:107–114.
92. Pienkowski D, Doers TM, Monier-Faugere MC, Geng Z, Camacho NP, Boskey AL, Malluche HH. Calcitonin alters bone quality in beagle dogs. *J Bone Miner Res.* 1997;12:1936–43.

93. Rey C, Collins B, Goehl T, Dickson IR, Glimcher MJ. The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Calcif Tissue Int.* 1989 Sep;45(3):157-64.
94. Ou-Yang H, Paschalis EP, Mayo WE, Boskey AL, Mendelsohn R. Infrared microscopic imaging of bone: spatial distribution of CO₃(2-). *J Bone Miner Res.* 2001;16:893-900.
95. Paschalis EP, Mendelsohn R, Boskey AL. Infrared assessment of bone quality: a review. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469:2170-8.
96. Boskey AL, Wright TM, Blank RD. Collagen and bone strength. *J Bone Miner Res.* 1999;14:330-5.
97. Legros R, Balmain N, Bonel G. Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone. *Calcif Tissue Int.* 1987;41:137-44.
98. Carden A, Morris MD. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). *J Biomed Opt* 2000;5:259-68.
99. Boyde A, Jones SJ. Scanning electron microscopy of bone: instrument, specimen, and issues. *Microsc Res Tech.* 1996;33:92-120.
100. Bozzola JJ. Conventional Specimen Preparation Techniques for Scanning Electron Microscopy of Biological Specimens. En: Kuo J, ed. *Methods in Molecular Medicine*, vol. 369: *Electron Microscopy: Methods and Protocols*, 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2007:449-66.
101. Marshall D, Helfrich MH, ASpden RM. Scanning Electron Microscopy of Bone. En: Helfrich MH, Ralston SH, eds. *Methods in Molecular Medicine*, vol. 80: *Bone Research Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003:311-20.
102. Boyde A, Jones SJ. Back-scattered electron imaging of skeletal tissues. *Metab Bone Dis Relat Res.* 1983-1984;5:145-50.
103. Terrahe K, Fromme HG, Schulz J. Electron microscopy scanning examinations of the histology of the ear ossicles. *Z Laryngol Rhinol Otol.* 1970;49:733-42.
104. Marovitz WF, Brownson RJ. Scanning electron microscopy of rat ossicles and tympanic bulla. *Laryngoscope.* 1971;81:346-64.
105. Lisonek P. Scanning electron microscopic study of the long crus and lenticular process of the incus. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med.* 1983;105:39-43.
106. Lisonek P, Navratil J. Scanning electron microscopy of the damaged incus. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med.* 1983;105:49-52.
107. Djeric D, Savic D, Polic D. A scanning electron microscopic study of the incudostapedial joint. *Rev Laryngol Otol Rhinol.* 1987;108:463-6.
108. Vallejo Valdezate LA, Martin Gil J, Jose-Yacaman M, Martin Gil FJ, Gil-Carcedo LM, Herrero Laso JL. Otosclerosis and Van der Hoeven's syndrome: a contribution. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2001;52:85-93.
109. Vallejo-Valdezate LA, Martin-Gil J, Jose-Yacaman M, Martin-Gil FJ, Gil-Carcedo LM. Scanning electron microscopy images and energy-dispersive X-ray microanalysis of the stapes in otosclerosis and Van der Hoeve syndrome. *Laryngoscope.* 2000;110:1505-10.

110. Roomans GM, Dragomir A. X-Ray Microanalysis in the Scanning Electron Microscope. En: Kuo J, ed. *Methods in Molecular Medicine*, vol. 369: *Electron Microscopy: Methods and Protocols*, 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2007:507–28.
111. Lieske J, Toback FG, Deganello S. Sialic acid-containing glycoproteins on renal cells determine nucleation of calcium oxalate dihydrate crystals. *Kidney Int.* 2001;60:1784–91.
112. Akkus O, Adar F, Schaffler MB. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone.* 2004;34:443–53.
113. Gourion-Arsiquaud S, Faibish D, Myers E, Spevak L, Compston J, Hodsmann A, Shane E, Recker RR, Boskey ER, Boskey AL. Use of FTIR spectroscopic imaging to identify parameters associated with fragility fracture. *J Bone Miner Res.* 2009;24:1565–71.
114. Gourion-Arsiquaud S, Burket JC, Havill LM, DiCarlo E, Doty SB, Mendelsohn R, van der Meulen MC, Boskey AL. Spatial variation in osteonal bone properties relative to tissue and animal age. *J Bone Miner Res.* 2009;24:1271–81.
115. Yerramshetty JS, Lind C, Akkus O. The compositional and physicochemical homogeneity of male femoral cortex increases after the sixth decade. *Bone.* 2006;39:1236–43.
116. Boskey A, Mendelsohn R. Infrared analysis of bone in health and disease. *J Biomed Opt.* 2005;10:031102.
117. Freeman JJ, Wopenka B, Silva MJ, Pasteris JD. Raman spectroscopic detection of changes in bioapatite in mouse femora as a function of age and in vitro fluoride treatment. *Calcif Tissue Int.* 2001 Mar;68(3):156–62.
118. Boskey AL, Goldberg M, Kulkarni A, Gomez S. Infrared imaging microscopy of bone: illustrations from a mouse model of Fabry disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758:942–7.
119. Boskey AL. Assessment of bone mineral and matrix using backscatter electron imaging and FTIR imaging. *Curr Osteoporos Rep.* 2006;4:71–5.
120. Valsalva AM. *De Aure Humana Tractatus*. Bologna: Constantino Pisari; 1704.
121. Blumenbach JF. *A short system of comparative anatomy*. London: Longman, Hurst, Rees, and Orme; 1807.
122. Shrapnell HJ. On the Structure of the Os Incus. *London Medical Gazette.* 1832;12:171–4.
123. Graboyes EM, Hullar TE, Chole RA. The lenticular process of the incus. *Otol Neurotol.* 2011;32:1600–4.
124. Funnell WR, Heng Siah T, McKee MD, et al. On the coupling between the incus and the stapes in the cat. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2005;6:9–18.
125. Soemmerring ST. *Abbildungen des Menschlichen Hoerorganes*. Frankfurt: Varrentrapp and Wenner; 1806.
126. Smith AB. The blood supply of the incus. *J Laryngol Otol.* 1958;72:992–4.
127. Alberti PW. The blood supply of the incudostapedial joint and the lenticular process. *Laryngoscope.* 1963;73:605–28.
128. Alberti PW. The blood supply of the long process of the incus and the head and neck of stapes. *J Laryngol Otol.* 1965;79:966–70.

129. Suda K, Abe K, Kaneda K. Changes in the orientation of collagen fibers on the superficial layer of the mouse tibial bone after denervation: scanning electron microscopic observations. *Arch Histol Cytol.* 1999;62:231–5.
130. Jones SJ, Arora M, Boyde A. The rate of osteoclastic destruction of calcified tissues is inversely proportional to mineral density. *Calcif Tissue Int.* 1995;56:554–8.
131. Boyde A, Dillon CE, Jones SJ. Measurement of osteoclastic resorption pits with a tandem scanning microscope. *J Microsc.* 1990;158:261–5.
132. Richany SF, Bast TH, Anson BJ. The development and adult structure of the malleus, incus and stapes. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1954;63:394–434.
133. Anson BJ, Bast TH. Development of the incus of the human ear; illustrated in atlas series. *Q Bull Northwest Univ Med Sch.* 1959;33:110–9.
134. Choudhury N, Kumar G, Krishnan M, Gatland DJ. Atypical incus necrosis: a case report and literature review. *J Laryngol Otol.* 2008;122:1124–6.
135. Compston JE. Skeletal actions of intermittent parathyroid hormone: effects on bone remodelling and structure. *Bone.* 2007;40:1447–52.
136. Faibish D, Ott SM, Boskey AL. Mineral changes in osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res.* 2006;443:28–38.
137. Utting JC, Robins SP, Brandao-Burch A, Orriss IR, Behar J, Arnett TR. Hypoxia inhibits the growth, differentiation and bone-forming capacity of rat osteoblasts. *Exp Cell Res.* 2006;312:1693–702.
138. Salter R B. *Textbook of Disorders and Injuries of the Musculoskeletal System.* 1st ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1970
139. Ehrlich PJ, Lanyon LE. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos Int.* 2002;13:688–700.
140. Roberto M, Favia A, Lozupone E. Bone tissue kinetics in the surgically disarticulated dog incus. *Acta Otolaryngol.* 1993;113:181–6.
141. Wilson RH. The effects of aging on the magnitude of the acoustic reflex. *J Speech Hear Res.* 1981;24:406–14.
142. Trotter M, Peterson RR. Ash weight of human skeletons in per cent of their dry, fat-free weight. *Anat Rec.* 1955;123:341–58.
143. Obrant KJ, Odselius R. The concentration of calcium and phosphorus in trabecular bone from the iliac crest. *Calcif Tissue Int.* 1986;39:8–10.
144. Currey JD. The relationship between the stiffness and the mineral content of bone. *J Biomech.* 1969;2:477–80.
145. Hanschin RG, Stern WB. X-ray diffraction studies on the lattice perfection of human bone apatite (Crista iliaca). *Bone.* 1995;16:355–63.
146. Paschalis EP, Betts F, DiCarlo E, Mendelsohn R, Boskey AL. FTIR microspectroscopic analysis of normal human cortical and trabecular bone. *Calcif Tissue Int.* 1997;61:480–6
147. Boskey AL, DiCarlo E, Paschalis E, West P, Mendelsohn R. Comparison of mineral quality and quantity in iliac crest biopsies from high- and low-turnover osteoporosis: an FT-IR microspectroscopic investigation. *Osteoporos Int.* 2005;16:2031–8.
148. Boskey AL, Coleman R. Aging and bone. *J Dent Res.* 2010;89:1333–48.

149. Gryn timer M. Age and disease-related changes in the mineral of bone. *Calcif Tissue Int.* 1993;53:57-64.
150. Tohno Y, Utsumi M, Tohno S, Minami T, Moriwake Y, Yamada M, Okazaki Y. A constancy of mineral contents in human auditory ossicles. *Kaibogaku Zasshi.* 1997;72:531-4.
151. Frost HM. Dynamics of bone remodeling. En: Frost HM, Ed. *Bone biodynamics.* Springfield, IL: Charles C. Thomas; 1963.
152. Gao H, Ji B, Jager IL, Arzt E, Fratzl P. Materials become insensitive to flaws at nanoscale: lessons from nature. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:5597-600.
153. Sade J, Halevy A. The aetiology of bone destruction in chronic otitis media. *J Laryngol Otol.* 1974;88:139-43.
154. Sade J, Berco E. Bone destruction in chronic otitis media. A histopathological study. *J Laryngol Otol.* 1974;88:413-22.
155. Abramson M, Asarch RG, Litton WB. Experimental aural cholesteatoma causing bone resorption. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1975;84:425-32.
156. Thomsen J, Jorgensen MB, Bretlau P, Kristensen HK. Bone resorption in chronic otitis media. A histological and ultrastructural study. I. Ossicular necrosis. *J Laryngol Otol.* 1974;88:975-81.
157. Thomsen J, Jorgensen MB, Bretlau P, Kristensen HK. Bone resorption in chronic otitis media. A histological and ultrastructural study. II. Cholesteatoma. *J Laryngol Otol.* 1974;88:983-92.
158. Thomsen J, Bretlau P, Balslev Joergensen M. Bone resorption in chronic otitis media. The role of cholesteatoma, a must or an adjunct? *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1981;6:179-86.
159. Anniko M, Mendel L. Cholesteatoma. A clinical and morphological analysis. *Acta Otolaryngol.* 1981;91:275-83.
160. Portmann M. "Open" or "closed" technique in surgery of the middle ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1968;77:927-37.
161. Palva T, Palva A, Salmivalli A. Radical mastoidectomy with cavity obliteration. *Arch Otolaryngol.* 1968;88:119-23.
162. Watson GJ, Narayan S. Bone cement: how effective is it at restoring hearing in isolated incudostapedial erosion? *J Laryngol Otol.* 2014;128:690-3.
163. Subotic R, Femic B. Histological changes of incus with cholesteatoma in the attic. *Acta Otolaryngol.* 1991;111:358-61.
164. Ferekidis E, Nikolopoulos TP, Yiotakis J, Ferekidou E, Korres S, Manolopoulos L, Kandiloros D. Should we use ossicular remnants in ossicular reconstruction following cholesteatoma removal? *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006;68:243-6
165. Stankovic M. Applicability of autologous incus: the influence of age and localization of cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2007;264:995-8.
166. Mueller E. How does disruption of the long process of the incus originate in chronic otitis media? *Z Laryngol Rhinol Otol.* 1960;39:310-6.
167. Aslan A, Aslan GG. Considerations of isolated destruction of the short process of the incus in a case of cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2005;262:844-6.
168. Sade J. Epithelial invasion of intraossicular spaces. *J Laryngol Otol.* 1972;86:15-21.

169. Hochgesand K, Kastenbauer E, Hochstrasser K. Experimental studies on the question of the enzymatic destruction of the ossicular bones during middle ear. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)*. 1976;55:206–9.
170. Sade J, Berco E, Buyanover D, Brown M. Ossicular damage in chronic middle ear inflammation. *Acta Otolaryngol*. 1981;92:273–83.
171. Sade J, Fuchs C. Cholesteatoma: ossicular destruction in adults and children. *J Laryngol Otol*. 1994;108:541–4.
172. Tumarkin A. Attic cholesteatosis. *J Laryngol Otol*. 1958;72:610–9.
173. Walsh TE, Covell WP, Ogura JH. The effect of cholesteatosis on bone. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1951;60:1100–13.
174. Tanaka K, Terayama Y, Hirai T. Electron microscope study of bone lesion in cholesteatoma otitis. *Arch Otorhinolaryngol*. 1980;226:85–92.
175. Kurihara A, Toshima M, Yuasa R, Takasaka T. Bone destruction mechanisms in chronic otitis media with cholesteatoma: specific production by cholesteatoma tissue in culture of bone-resorbing activity attributable to interleukin-1 alpha. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1991;100:989–98.
176. Moriyama H, Honda Y, Huang CC, Abramson M. Bone resorption in cholesteatoma: epithelial-mesenchymal cell interaction and collagenase production. *Laryngoscope*. 1987;97:854–9.
177. Amar MS, Wishahi HF, Zakhary MM. Clinical and biochemical studies of bone destruction in cholesteatoma. *J Laryngol Otol*. 1996;110:534–9.
178. Suzuki C, Ohtani I. Bone destruction resulting from rupture of a cholesteatoma sac: temporal bone pathology. *Otol Neurotol*. 2004;25:674–7.
179. Cinamon U, Kronenberg J, Benayahu D. Structural changes and protein expression in the mastoid bone adjacent to cholesteatoma. *Laryngoscope*. 2000;110:1198–203.
180. Abramson M. Collagenase in the mechanism of action of cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1971;80:414.
181. Abramson M, Gross J. Further studies on a collagenase in middle ear cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1971;80:177–85.
182. Jung JY, Pashia ME, Nishimoto SY, Faddis BT, Chole RA. A possible role for nitric oxide in osteoclastogenesis associated with cholesteatoma. *Otol Neurotol*. 2004;25:661–8.
183. Hamzei M, Ventriglia G, Hagnia M, Antonopolous A, Bernal-Sprekelsen M, Dazert S, Hildmann H, Sudhoff H. Osteoclast stimulating and differentiating factors in human cholesteatoma. *Laryngoscope*. 2003;113:436–42
184. Koizumi H, Suzuki H, Ikezaki S, Ohbuchi T, Hashida K, Sakai A. Osteoclasts are not activated in middle ear cholesteatoma. *J Bone Miner Metab*. 2015. Pendiente de publicación.
185. Ohsaki K, Shibata A, Yamashita S, Oe M, Wang KQ, Cui PC, Ye Q. Demonstrations of de- and remineralization mechanism as revealed in synthetic auditory ossicle (Apaceram) of rats by laser-Raman spectrometry. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1995;41:1155–67.

186. Park K, Moon SK, Cho MJ, Won YY, Baek MG. 3D micro-CT images of ossicles destroyed by middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 2004;124:403-7.
187. Tos M. Pathology of the ossicular chain in various chronic middle ear diseases. *J Laryngol Otol.* 1979;93:769-80.
188. Nason R, Jung JY, Chole RA. Lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis from mononuclear precursors: a mechanism for osteolysis in chronic otitis. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2009;10:151-60.
189. Berger G, Hawke M, Ekem JK. Bone resorption in chronic otitis media. The role of mast cells. *Acta Otolaryngol.* 1985;100:72-80.
190. Savic D, Herak R, Djeric D. X-ray diffraction analysis of the auditory ossicles in chronic otitis. *Acta Otolaryngol.* 1987 Jul-Aug;104:125-9.
191. Gantz BJ, Maynard J, Bumsted RM. Bone Resorption in Chronic Otitis Media. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1979;88:693-700.
192. Thomsen J, Bretlau P, Kristensen HK. Bone resorption in chronic otitis media. A light-microscopical and histochemical investigation of acid phosphatase activity. *Acta Otolaryngol.* 1975;79:400-8.
193. Gantz BJ, Maynard J. Ultrastructural evaluation of biochemical events of bone resorption in human chronic otitis media. *Am J Otol.* 1982;3:279-83.
194. Pollock FJ. Pathology of ossicles in chronic otitis media. *AMA Arch Otolaryngol.* 1959;70:421-35.
195. Kärjä J, Jokinen K, Seppala A. Destruction of ossicles in chronic otitis media. *J Laryngol Otol.* 1976;90:509-18.
196. Kaya E, Dag I, Incesulu A, Gurbuz MK, Acar M, Birdane L. Investigation of the presence of biofilms in chronic suppurative otitis media, nonsuppurative otitis media, and chronic otitis media with cholesteatoma by scanning electron microscopy. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:638715.
197. Birchall JP, Pearman K, Dawes JD. The collagens of middle-ear structures and tympanosclerotic plaques. *J Laryngol Otol.* 1982;96:797-800.
198. Doner F, Yariktas M, Dogru H, Uzun H, Aydin S, Delibas N. The biochemical analysis of tympanosclerotic plaques. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;128:742-5.
199. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet.* 2002;359:1929-36.
200. Ruppel ME, Miller LM, Burr DB. The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. *Osteoporos Int.* 2008;19:1251-65.
201. Esmonde-White KA, Esmonde-White FW, Holmes CM, Morris MD, Roessler BJ. Alterations to bone mineral composition as an early indication of osteomyelitis in the diabetic foot. *Diabetes Care.* 2013;36:3652-4.
202. Jayaraman M, Subramanian MV. Preparation and characterization of two new composites: collagen-brushite and collagen octa-calcium phosphate. *Med Sci Monit.* 2002;8:BR481-7.
203. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 2004;84:649-98.

