

JEANNE DA ROSA OITICICA RAMALHO

**Cicatrização de perfurações subagudas de
membrana timpânica de chinchilas tratadas com
fator de crescimento epitelial e pentoxifilina**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento

**SÃO PAULO
2005**

Summa vi

A utor desconhecido

Dedicatória

Dedico esta tese, um grande sonho de consumo profissional, aos quatro grandes amores de minha vida.

Ao meu pai, João Alfredo Savastano Ramalho, a quem amo profundamente e admiro por representar a força, a perseverança e a coragem do que sou hoje.

À minha mãe, Solange Oiticica Ramalho, fonte de amor cristalino, minha melhor amiga e confidente, mulher de fibra e por quem nutro amor incondicional. Sol que ilumina meus passos infinitamente.

À minha irmã, Mariana da Rosa Oiticica Ramalho, a quem amo demais e por quem sinto extrema admiração e orgulho, fonte de maturidade e determinação, companheira e amiga preciosa hoje e sempre.

Ao meu marido, Eduardo Del Guerra Ferraz, companheiro completo e amoroso ao extremo, sempre presente nos momentos mais difíceis e nos mais alegres, amor de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Aroldo Miniti*, Professor Titular do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter me acolhido como aluna no programa de pós-graduação desta instituição.

Ao *Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento*, meu orientador e um dos grandes responsáveis por meu crescimento profissional e acadêmico, hoje sou uma melhor aluna e pesquisadora graças à sua firmeza, empenho e créditos em mim depositados.

Ao *Prof. Dr. Alberto Rossetti Ferraz*, Professor Titular do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, meu sogro e colega, pelo tempo inestimável que dedicou à leitura do projeto de qualificação.

À *Dr^a. Maria Cecília Lorenzi*, que me abriu as portas de sua casa, me adotou e prontamente leu esta tese contribuindo de forma inestimável para amadurecer o resultado final da mesma. Aprendi a admirá-la pelo profissionalismo e competência com que faz tudo. Agradeço também, as sugestões feitas como membro da banca de qualificação.

Ao *Dr. Victor Arias*, patologista do Laboratório Cardoso de Almeida, pela disposição e eficiência com que realizou a análise histológica e imuno-histoquímica deste trabalho e pelo carinho com que fotografou as lâminas.

À *Prof^a. Dr^a. Tanit Ganz Sanchez*, pelas correções de alguns capítulos desta tese. A disposição, competência e seriedade que dedica à pesquisa científica são admiráveis. Agradeço o apoio incondicional em todos os momentos desde a minha entrada na pós-graduação.

À *Dr^a. Roseli Saraiva Moreira Bittar*, por ter me acolhido com carinho desde o primeiro minuto. Nunca esquecerei seu exemplo de ética profissional e os conselhos ao mesmo tempo preciosos e firmes.

À *Dr^a. Renata Di Francesco*, que abdicou de momentos preciosos ao lado de seus “bambini” para se dedicar à leitura e correção desta tese. Agradeço também, as sugestões feitas como membro da banca de qualificação.

Aos membros da banca de qualificação: *Prof. Dr. Silvio Antônio Monteiro Marone*, *Dr. Rubens Vuono Brito Neto* e *Dr. Maurício Kurc*, pelas sugestões e correções pertinentes que tanto contribuíram para finalização desta tese.

Ao *Dr. Eduardo Pompeu*, médico veterinário do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo tempo dedicado e orientações fundamentais no ensino do manejo de animais para experimentação.

À *Dr^a. Cristina Maria Pereira Fotin*, médica veterinária da Clínica Veterinária Jardim Ester, especialista em animais silvestres e exóticos, por ter me ensinado alguns fundamentos indispensáveis para o trabalho com estes animais.

Ao *Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva*, Professor Titular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo espaço cedido em seu laboratório para manutenção temporária dos animais do projeto piloto.

Ao *Prof. Dr. Roger Chammas*, chefe do Laboratório de Investigação Médica (LIM 24), que gentilmente permitiu que usássemos temporariamente alguns dos equipamentos deste laboratório.

À *Dra. Andréa Nascimento*, epidemiologista, pelo empenho e dedicação durante a análise estatística dos resultados finais desta pesquisa.

Ao *Dr. Ulysses Doria Filho*, pela paciência e esmero com que realizou a análise estatística dos dados do meu estudo piloto e por ter instigado meu interesse na compreensão da bioestatística.

Aos responsáveis pelo *CHILLÁN – Criação de Chinchilas*, *Sandra Schiabel* e *Pedro Luiz Colabuono*, por terem fornecido os animais usados e nos ensinado a arte do manuseio e dos cuidados com as chinchilas.

Ao *Sr. Carlos Luis Pérez*, responsável pelo *ACHILLA – Associação Brasileira de Criadores de Chinchila Lanígera*, por gentilmente ter doado parte das chinchilas usadas, viabilizando a realização deste estudo.

À *Mariana da Rosa Oiticica Ramalho*, minha irmã, e a *Eduardo Del Guerra Ferraz*, meu esposo, responsáveis pela revisão ortográfica desta tese. Agradeço pelas preciosas correções e pelo cuidado com que as fizeram.

Às biólogas *Sandra Regina Castro Soares* e *Heloisa Maria Bueno Guimarães*, do Biotério de Manutenção do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por terem viabilizado o uso das instalações deste durante execução experimental desta pesquisa.

Ao Sr. *David Francisco Ferreira*, técnico do Laboratório de Investigação Médica (LIM 20) pelo carinho com que cuidou dos animais utilizados na fase experimental do projeto piloto deste estudo.

Às técnicas do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, *Cássia Arruda* e *Maria Cristina Medeiros* pelo empenho e sutileza com que processaram os preparados histológicos.

Aos meus colegas de pós-graduação *Adriana da Silva Lima*, *Carina Andréa Rocha*, *Cláudia Couto de Barros Coelho*, *Erich Christiano Madruga de Melo*, *Fabiana Maia Nobre Rocha*, *Ítalo Roberto Torres de Medeiros*, *Márcia Akemi Kii*, *Márcia Sayuri Murao*, *Márcio Nakanishi*, *Mariana de Carvalho Leal Gouveia*, *Lucinda Simoceli*, que talvez não saibam, mas contribuíram em parte para tornar este sonho real. Obrigada pela torcida sempre presente.

À Maria Helena Vargas, responsável pela formatação e editoração e criação da capa.

Aos funcionários do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: *Bárbara Brasiliense Fusco, Edzira Centini, Jorge Dias Barbosa, Lucivania da Silva Quintão, Maria Márcia Alves e Maria Marilede Alves*, sempre solícitos e empenhados em nos orientar quanto aos prazos e etapas a serem seguidas desde a nossa entrada na pós-graduação.

A *todos aqueles* que, direta ou indiretamente, tornaram possível a concretização deste trabalho.

Agradecimentos Especiais

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo,

que aprovou e financiou a execução deste projeto, pela confiança que dedica aos pesquisadores e à pesquisa científica.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico, pela contribuição financeira através da bolsa de estudos e da taxa de bancada, incentivo fundamental durante o período de pós-graduação.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Normas da revista

Artigo

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

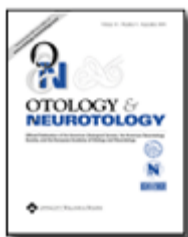
Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	OBJETIVOS.....	05
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	07
3.1	Histologia da membrana timpânica.....	08
3.2	Cicatrização tecidual espontânea.....	09
3.3	Caracterização das perfurações de membrana timpânica.....	12
3.4	Modelos experimentais de perfuração de membrana timpânica.....	13
3.5	Fatores de crescimento.....	14
3.5.1	Fator de crescimento epitelial.....	16
3.5.2	Bases para terapia com fatores de crescimento.....	17
3.5.3	Expressão dos fatores de crescimento na membrana timpânica.....	19
3.5.4	Tratamento de perfurações de membrana timpânica com fator de crescimento epitelial.....	21
3.6	Drogas indutoras do fluxo sanguíneo.....	24
4	MÉTODOS.....	28
4.1	Material.....	29
4.1.1	Seleção dos animais.....	29
4.1.1.1	Critérios de seleção.....	30
4.2	Métodos.....	30
4.2.1	Preparação dos animais.....	30
4.2.2	Protocolo anestésico.....	30
4.2.3	Protocolo cirúrgico.....	31
4.2.4	Documentação das perfurações de membrana timpânica.....	34
4.2.5	Pós-operatório.....	35
4.2.6	Protocolo de análise histológica.....	36
4.2.6.1	Procedimento de retirada do material.....	36
4.2.6.2	Técnica de preparo do material.....	37
4.2.6.3	Estudo imuno-histoquímico.....	38
4.2.6.4	Avaliação histológica das lâminas.....	38
4.2.7	Protocolo de tratamento.....	39
4.2.7.1	Critérios de inclusão e exclusão.....	39
4.2.7.2	Grupos de estudo.....	40
4.2.7.3	Tratamento das perfurações de membrana timpânica.....	40
4.3	Eutanásia.....	42

4.4	Variáveis mensuradas.....	42
4.4.1	Efeito final do tratamento na cicatrização da membrana timpânica.....	42
4.4.2	Percentual de área perfurada de membrana timpânica antes e depois do tratamento.....	43
4.4.3	Percentual de cicatrização da perfuração de membrana timpânica.....	43
4.5	Análise estatística.....	44
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Análise histológica.....	46
5.2	Análise do tratamento.....	49
5.2.1	Efeito final do tratamento.....	51
5.2.2	Percentual de área perfurada de membrana timpânica antes e depois do tratamento.....	52
5.2.3	Percentual de cicatrização da perfuração de membrana timpânica.....	54
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONCLUSÕES.....	65
8	ANEXOS.....	67
9	REFERÊNCIAS.....	75

Author Resources



Author Resources

- [Copyright Transfer](#) (PDF)
- [Commercial Reprints Only](#)
- [Permissions Requests](#)
- [ePrints](#)
- [Reprints](#)

Scope

Otology & Neurotology is a peer-reviewed, multidisciplinary journal directed to an audience of physicians who are interested in both clinical and basic science aspects of otology, neurotology, and cranial base surgery. The Journal publishes original articles in the form of clinical and basic research and scientific advances. Special features include a clinical forum to discuss controversial patient management issues, brief communications on emerging technology and technical surgical issues, historical issues, and occasional state-of-the-art reviews. Editorials on topics of current interest are welcome but should be discussed with the Editor-in-Chief before submission.

Manuscript Submission

A submitted manuscript must be an original contribution not previously published (except as an abstract or preliminary report), must not be under consideration for publication elsewhere, and, if accepted, must not be published elsewhere in similar form, in any language, without the consent of Lippincott Williams & Wilkins. Each person listed as an author is expected to have participated in the study to a significant extent. Although the editors and referees make every effort to ensure the validity of published manuscripts, the final responsibility rests with the authors, not with the Journal, its editors, or the publisher. A summary of the Journal's policy on [redundant publication](#) is available (*Otol Neurotol* 2003;24:131).

Online manuscript submission: All manuscripts must be submitted online through the Web site at <http://on.editorialmanager.com>. **First time users:** Please click "Author & Reviewer Info" from the menu on the left-hand side of the page. Then on the following page, please click the Register button from the main menu and enter the requested information. On successful registration, you will be sent an e-mail indicating your user name and password. Print a copy of this information for future reference. Note: If you have received an e-mail from us with an assigned user ID and password, or if you are a repeat user, you do not have to register again, even if your status changes (i.e., author, reviewer, or editor). **Authors:** Please click the log-in button from the menu at the top of the page and log into the system as an Author. Submit your manuscript according to the author instructions. You will be able to track the progress of your manuscript through the system. If you experience any problems, please contactCarolynn Crandall, carolynn@otology-neurotology.org; phone: (415) 209-9738; fax: (415) 209-6719. Requests for help and other questions will be addressed in the order received.

Electronic files should be submitted in a standard word processing format; Microsoft Word (or Corel WordPerfect) is preferred. Although conversions can be made from other word processing formats, the vagaries of the conversion process may introduce errors. Do not submit ASCII text files. Do not use automatic numbering or footnotes for references. The Journal does not assume responsibility for errors in the conversion of customized software, newly released software, and special characters. Authors preparing manuscripts on Macintosh computers should do a final save by choosing the "Save As" command from the "file" menu.

Authorship: To qualify for authorship, a contributor must have fulfilled each of the following criteria: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published. All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be listed. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for its content.

Ethics: When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration (*JAMA* 2000;284:3043–3049). Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on, the care and use of laboratory animals was followed.

Patient anonymity and informed consent: It is the author's responsibility to ensure that a patient's anonymity be carefully protected and to verify that any experimental investigation with human subjects reported in the manuscript was performed with informed consent and following all the guidelines for experimental investigation with human subjects required by the institution(s) with which all the authors are affiliated. Authors should mask patients' eyes and remove patients' names from figures.

Copyright: All authors must sign a copy of the Journal's "Authorship Responsibility, Financial Disclosure, and Copyright Transfer" form and submit it with the original manuscript.

Permissions: Authors must submit written permission from the copyright owner (usually the publisher) to use direct quotations, tables, or illustrations that have appeared in copyrighted form elsewhere, along with complete details about the source. Any permissions fees that might be required by the copyright owner are the responsibility of the authors requesting use of the borrowed material, not the responsibility of Lippincott Williams & Wilkins.

Preparation of Manuscript

Manuscripts that do not adhere to the following instructions will be returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review.

Title page: Title page must be submitted as a separate file. Include on the title page (a) complete manuscript title; (b) short running head; (c) authors' full names, highest academic degrees, and affiliations; (d) name and address for correspondence, including fax number, telephone number, and e-mail address; (e) address for reprints if different from that of corresponding author; and (f) sources of support that require acknowledgment.

Structured Abstract: A concise abstract of not more than 250 words is required for all original clinical and basic science contributions, including review articles. To facilitate rapid indexing and assimilation into the medical literature, abstracts should be organized according to the outline below. No reference citations should be included in the abstract.

Clinical Studies:

Objective: Brief, clear statement of the main goals of the investigation.

Study Design: Specify the type of study (e.g., randomized, prospective double-blind, retrospective case review).

Setting: E.g., primary care vs. tertiary referral center, ambulatory vs. hospital.

Patients: Primary eligibility criteria and key demographic features.

Intervention(s): Diagnostic, therapeutic, and/or rehabilitative.

Main Outcome Measure(s): The most essential criterion that addresses the study's central hypothesis.

Results: Include statistical measures as appropriate.

Conclusions: Include only those conclusions that are directly supported by data generated from the study.

Basic Science Reports:

Hypothesis: Brief, clear statement of the main goals of the investigation.

Background: Concise; designed for orientation of the reader who is unfamiliar with this line of investigation.

Methods: Succinct summary of techniques and materials used.

Results: Include statistical measures where appropriate.

Conclusion: Include only those directly supported by data generated from this study. Emphasize clinical relevance wherever possible.

Reviews and Meta-Analyses:

Objective: Brief, clear statement of the goals of the review.

Data Sources: Specify database, search methodology, languages covered, and time frame.

Study Selection: Criteria used to select articles for detailed review.

Data Extraction: Means of assessing quality, validity, and comparability of extracted data.

Data Synthesis: Specify statistical techniques used for data analysis.

Conclusions: Concise statement of primary inferences with any recommendations.

Key Words, Running Heads: On the same manuscript page as the structured abstract, list, in alphabetical order, key words (maximum of seven) for indexing, using Medical Subject Headings (MeSH) from *Index Medicus*, and provide a running head of three or four words to be used as the right-hand page running heads in the typeset article.

Text: Organize the manuscript into four main headings: Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. Define abbreviations at first mention in text and in each table and figure. If a brand name is cited, supply the manufacturer's name and address (city and state/country). Acknowledge all forms of support, including pharmaceutical and industry support, in an Acknowledgments paragraph.

Imaging Case of the Month

Content: Content should include 1) a concise description of the imaging characteristics of the lesion citing the key diagnostic point; 2) the optimal imaging modalities for demonstrating the lesion (i.e., CT, MRI, angiography) and parameters (e.g., axial vs coronal, T1- or T2-weighted, with contrast); and 3) a most common radiographic differential diagnosis. Note: Space limitations do not permit discussions of the role imaging plays in the diagnosis and management of the role process.

Length: Imaging cases must be brief, preferably contained on 1 journal page. In no case will imaging cases exceed 2 journal pages. As a rule of thumb, this limits contributions to 1-3 images and less than 2 typewritten page (double-spaced). Readers interested in more detailed information can look up the cited reference(s).

References: Only a few key references should be provided, preferably 1 or 2 and in no case more than 5.

Figures: Images submitted must be of **exemplary quality**. Patient identifiers must be masked. For CT scans, high-resolution, bone-reviewed images are preferred. Include more than one plane of view only when the second perspective adds unique information. For MRI scans, it is preferred that both T1- or T2-weighted images be included. Pre- and postcontrast, fat saturation, and multiplanar images may be submitted as required.

Originality: Images and their description must not have been published previously.

Temporal Bone Histopathology Case of the Month

Statement of purpose: To provide an educational review of important histological temporal bone abnormalities common to the practice of otology. This section is not meant to report unusual case reports but is to provide an overview of histopathology commonly seen in otologic diseases.

Content: 1) Concise description of the cardinal histological findings. 2) Photomicrographs(s).

Length: Pathology cases must be brief, preferably contained on 1 journal page. In no case will pathology cases exceed 2 journal pages. As a rule of thumb, this limits contributions to 1-3 images and less than 2 typewritten page (double spaced). The text discussion should be confined to the histological features of the disease process.

References: Only a few key references should be provided, preferably 1 or 2 and in no case more than 5.

Figures: Photomicrographs must be of exemplary quality. Patient identifiers must be masked. A combination of low power (for orientation) and high power (for detail) is preferred. An extensive figure legend should be provided for each photomicrograph. Several sentences providing orientation and describing details of the photomicrograph should be given.

Originality: Pathological images and their description must not have been published previously.

Abbreviations: For a list of standard abbreviations, consult the *Council of Biology Editors Style Guide* (available from the Council of Science Editors, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814) or other standard sources. Write out the full term for each abbreviation at its first use unless it is a standard unit of measure.

Minimal Reporting Guidelines: *Otology & Neurotology* requires that contributors use a standard format for data presentation for certain subject areas in which well-recognized uniform standards have been developed. The goal of this journal's minimal reporting guidelines policy is to facilitate interstudy comparability by future investigators and thus to permit more meaningful meta-analyses. The data sets required are intended to serve only as guidance. It is not the intention of this policy to discourage innovative data interpretations or the use of novel presentation formats. Authors are welcome to present their data in any format that they consider valid and informative, as long as data also are included in the standardized format. The following reference sources contain the guidelines to be used in presenting data in *Otology & Neurotology*:

- Minimum reporting standards adopted by *Otology & Neurotology* (Jackler RK. Comparability in reporting outcomes: a scientific imperative. *Am J Otol* 1996;17:811–2.)
- Grading of facial nerve function (Hous JW, Brackmann DE. Facial nerve grading system. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1985;93:146–7.)
- Evaluation of therapy in Ménière's disease (Guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Ménière's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:181–5.)
- Results of treatment for conductive hearing loss (Guidelines for the evaluation of results of treatment of conductive hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:186–7.)
- Hearing preservation in acoustic neuroma surgery (Guidelines for the evaluation of hearing preservation in acoustic neuroma (vestibular schwannoma). *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:179–80.)

References: The authors are responsible for the accuracy of the references. Key the references (double-spaced) at the end of the manuscript. Cite the references in text in the order of appearance. Cite unpublished data—such as papers submitted but not yet accepted for publication and personal communications, including e-mail communications—in parentheses in the text. If there are more than six authors, name only the first three authors and then use et al. Refer to the *List of Journals Indexed in Index Medicus* for abbreviations of journal names, or access the list at <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>. Sample references are given below:

Journal article [follow AMA style]

1. Harner SG, Driscoll CLW, Facer GW, et al. Long-term follow-up of transtympanic Gentamicin for Ménière's syndrome. *Otol Neurotol* 2001;22:210–5.

Book:

2. Nadol JB, Schuknecht HF. *Surgery of the Ear and Temporal Bone*. New York: Raven Press, 1993. 205–56.

Chapter in a Book:

3. Jackson CG, Woods CI, Chironis PN. Glomus jugulare tumors. In: Sekhar LN, Janecka IP, eds. *Surgery of Cranial Base Tumors*. New York: Raven Press, 1993;747–62.

Journal Article in Press:

4. Adams JC. Clinical implications of inflammatory cytokines in the cochlea: A technical note. *Oto Neurotol* 2002 (in press).

Journal Article in a Foreign Language:

5. Vlahovich B, Frerebeau P, Billet M, et al. Importance of per-operative angiography in cerebral vascular malformation [in French]. *Neurochirurgie* 1969;15:191–201.

Internet:

6. Health Care Financing Administration. 2001 statistics at a glance. Available at: <http://www.hcfa.gov/stats/stathili.htm>. Accessed July 1, 2001. [For referencing Internet documents and web sites generally, see *AMA Manual of Style* p. 45.]

Abstract, Comment, Letter to the Editor:

7. Seidman MD. Surgery for malleus and incus fixation. *Otol Neurotol* 2001;22:271 (letter).

Unpublished Meeting/Conference Presentation:

8. Laws ER Jr, Smith M. Fibrin tissue adhesive: a role in transsphenoidal neurosurgery for pituitary tumors. Presented at the 42nd Annual Meeting of the Neurosurgical Society of America, Tuckertown, Bermuda, May 10–13, 1998

Figures: Cite figures consecutively in the text, and number them in the order in which they are discussed. Include the figure number and figure part (1A, 1B, 1C), and an arrow to indicate the top edge of the figure, in the figure file.

Figure legends: Legends must be submitted for all figures. They should be brief and specific, and they should appear on a separate manuscript page after the references. Use scale markers in the image for electron micrographs, and indicate the type of stain used.

Color figures: The journal accepts for publication color figures that will enhance an article. Authors who submit color figures will receive an estimate of the cost for color reproduction. If they decide not to pay for color reproduction, they can request that the figures be converted to black and white at no charge.

Digital figures: All electronic art can be submitted through the Web-based tracking system <http://on.editorialmanager.com/>

1. Format: Electronic art should be created/scanned and saved and submitted either as a TIFF (tagged image file format), an EPS (encapsulated postscript) file, or a PPT (Power Point) file. Please note that artwork generated from office suite programs such as Corel Draw and MS Word and artwork downloaded from the Internet (JPEG or [GIF files](#)) cannot be used.

2. Sizing and Resolution: Line art must have a resolution of at least 1200 dpi (dots per inch), and electronic photographs, radiographs, CT scans, and scanned images must have a resolution of at least 300 dpi. Figures should be sized to fit either 1 column (20 picas/8.4 cm), 1 1/2 columns (30 picas/12.65 cm OR 2 columns (41 picas/17.5cm) on a page. Sizing and Resolution can be checked through the free Sheridan Digital art checker at <http://dx.sheridan.com/onl>

3. Fonts: If fonts are used in the artwork, they must be converted to paths or outlines or they must be embedded in the files. **Fonts must be 8 pt and be sized consistently throughout the artwork** The best font to use is Helvetica.

Tables: Create tables using the table creating and editing feature of your word processing software (e.g., Word, WordPerfect). Do not use Excel or comparable spreadsheet programs. Group all tables at the end of the manuscript, or supply them together in a separate file. Cite tables consecutively in the text, and number them in that order. Key each on a separate sheet, and include the table title, appropriate column heads, and explanatory legends (including definitions of any abbreviations used). Do not embed tables within the body of the manuscript. They should be self-explanatory and should supplement, rather than duplicate, the material in the text.

Article Plus™

Acceptable File Formats: The types of materials that may be submitted include, color photographs, data graphs and charts, short audio files, web site URLs, word documents, spreadsheet, and small video or audio files (keeping download time in mind). An expanded list of acceptable file formats follows:

Content Type	Acceptable File Type/Format
Web addresses/URLs	http://www.lww.com
HTML files	.htm
PDF files	.pdf
Image files	.gif, .jpg
Audio files	.wav
Video files	.avi, .mov, .mpg, .dcr
Text files	.doc
Spreadsheets	.xls

Web Address/URLs (web links): Must contain the complete path for the destination web site.

Web Documents (htm files): Web documents must be submitted already in HTML format and have .htm as the file extension. If embedded images files are present in the HTML file, please supply these separately. Please be sure that all HTML coding is accurate to assure cross-browser display. Again, these files will not be reviewed or edited prior to posting, so authors should review the HTML coding carefully.

Image Files (.gif, .jpg): Authors may send black-and-white image files, 4-color images, or a combination of these. All images designated for web site must be supplied in an electronic format. No hard copy images will be accepted. Captions and other explanatory text associated with images submitted must be embedded within the image file.

Authors interested in supplementing black-and-white images by displaying 4-color art on the web site through Article Plus™ must provide the following:

Two hardcopies of every 4-color image, labeled "for Article Plus™ only."

Captions must be embedded within the Article Plus™ image file.

If authors submit color images electronically, they will not be billed for conversion.

Submit the image(s) on a disk in .jpg or .gif format.

The images should be no greater than 144 dpi (dots per inch).

Size the image to accommodate a computer screen set to 600 x 800 resolution. We suggest trying to size your images to a size that is close to 250 pixels high x 350 pixels wide (these dimensions can be reversed to accommodate vertically oriented images).

Submit each image separately.

Audio and Video Files (.wav, .avi, .mov, .mpg, .dcr): Short audio and video clips may be submitted for posting on the web site in one of the file formats specified above. Audio and video files must be compressed to the smallest possible size that still allows for high resolution and quality presentation. The total size of all clips, along with other submitted files for any given article, should not exceed 5MB. File size limitation is intended to ensure that end-users are able to download and view files in a reasonable time frame. If files exceed the specified size limitation, they will not be posted to the web site and returned to the author for re-submission.

Text Files and Spreadsheets (.doc, .xls): Text documents and spreadsheets should be submitted completely formatted for easy viewing and printing. Please be sure that data chart and graph layouts are done correctly so that page run-over is not present and the information is easy to view and read on screen.

File Editing: Because all materials submitted for addition to the web site are posted exactly as provided by the author, authors are advised to review their materials carefully. Web site data will be posted as submitted and will not be professionally copyedited or proofread. No additional work or file processing will be performed. The Society and Publisher will not be responsible for errors or omissions.

OR

If the submitted materials require processing, the author will be informed of any associated charge and will be responsible for these costs. For this reason, authors should carefully review their material.

File Size Limitations: The Article Plus™ repository for any given article may not exceed 5MB. The repository may consist of one file or any number of related files whose total combined size does not exceed this size specification. Files larger than 5MB will be returned to the author, unposted, for re-submission. File size limitation is strictly enforced.

Style: Pattern manuscript style after the *American Medical Association Manual of Style* (9th edition). *Stedman's Medical Dictionary* (27th edition) and *Merriam Webster's Collegiate Dictionary* (10th edition) should be used as standard references. Refer to drugs and therapeutic agents by their accepted generic or chemical names, and do not abbreviate them. Use code numbers only when a generic name is not yet available. In that case, supply the chemical name and a figure giving the chemical structure of the drug. Copyright or trade names of drugs should be capitalized and placed in parentheses after the name of the drug. Names and locations (city, state, country) of manufacturers of drugs, supplies, or equipment cited in a manuscript are required to comply with trademark law and should be provided in parentheses. Units of measure should be expressed in the metric system, and temperatures should be expressed in degrees Celsius. Conventional units should be written as SI units as appropriate.

Address all inquiries regarding manuscripts not yet accepted or published to the Journal's editorial office. The editorial office will acknowledge receipt of your manuscript and will give you a manuscript number for reference.

After Acceptance

Page proofs and corrections: Corresponding authors will receive electronic page proofs to check the copyedited and typeset article before publication. Portable document format (PDF) files of the typeset pages and support documents (e.g., reprint order form) will be sent to the corresponding author by e-mail. Complete instructions will be provided with the e-mail for downloading and printing the files and for faxing the corrected page proofs to the publisher. Those authors without an e-mail address will receive traditional page proofs. It is the author's responsibility to ensure that there are no errors in the proofs. Changes that have been made to conform to journal style will stand if they do not alter the authors' meaning. Only the most critical changes to the accuracy of the content will be made. Changes that are stylistic or are a reworking of previously accepted material will be disallowed. The publisher reserves the right to deny any changes that do not affect the accuracy of the content. Authors may be charged for alterations to the proofs beyond those required to correct errors or to answer queries. Proofs must be checked carefully and corrections faxed within 24 to 48 hours of receipt, as requested in the cover letter accompanying the page proofs.

Reprints: Authors will receive a reprint order form and a price list with the page proofs. Reprint requests should be faxed to the publisher with the corrected proofs, if possible. Reprints are normally shipped 6 to 8 weeks after publication of the issue in which the item appears. Contact the Reprint Department, Lippincott Williams & Wilkins, 351 W. Camden Street, Baltimore, MD 21201 with any questions.

Publisher's contact: Fax corrected page proofs, reprint order form, and any other related materials to Journal Production Editor, Rachelle Detweiler, 410-361-8040. Color proofs should be returned to Journal Production Editor, Rachelle Detweiler, Lippincott Williams & Wilkins, 351 W. Camden Street, Baltimore, MD 21201.

Manuscript Checklist (before submission)

- Cover letter
- Title page
- Abstract
- References double-spaced in AMA style
- Corresponding author designated (in cover letter and on title page)
- E-mail address of corresponding author included in cover letter and on title page
- Permission to reproduce copyrighted materials or signed patient consent forms
- Acknowledgments listed for grants and technical support
- Authorship Responsibility, Financial Disclosure, and Copyright Transfer form signed by each author.
- Tables created using table software feature

Copyright © 2005, Lippincott Williams & Wilkins. All rights reserved.

Published by Lippincott Williams & Wilkins.

[Copyright/Disclaimer Notice](#) • [Privacy Policy](#)

**HEALING OF SUBACUTE TYMPANIC MEMBRANE PERFORATIONS IN
CHINCHILLAS TREATED WITH EPIDERMAL GROWTH FACTOR AND
PENTOXIFYLLINE**

Ramalho, Jeanne R. O.; MD

Bento, Ricardo F.; MD, PhD

Department of Otolaryngology, Medical School, University of Sao Paulo, Brazil

Research support by FAPESP (Sao Paulo State Foundation for Research Support).

Address correspondence to:

Jeanne Oiticica Ramalho, MD

Av Damasceno Vieira, 1202 apto 41

Zipcode: 04363-040

Sao Paulo – SP / Brazil

Phone (fax): 55 – 11 – 56716810

E-mail: jeanneramalho@uol.com.br

INTRODUCTION

Tympanic membrane (TM) perforations are holes resulting from structural changes which are histologically characterized by epithelization of their edges ⁽¹⁾. The literature on the repair of TM perforations has focused on two main lines of research. The first includes the healing of perforations by means of new protein matrices that serve as a support for guided tissue regeneration (myringoplasty) ^(2,3). The second line is aimed at inducing cell proliferation and migration using mitogens (growth modulators) or blood flow inducers (hemorrhheological agents).

Epidermal growth factor (EGF) is a cytokine able to modulate the proliferation of keratinocytes, fibroblasts, and epithelial and endothelial cells *in vitro* and *in vivo* ⁽⁴⁻⁶⁾. Specific receptors for EGF have been detected in the TM of animals and humans ⁽⁷⁻⁹⁾. Studies disagree about the effects of EGF on improving the healing of TM perforations, with some reporting statistically significant differences between the control and study groups ^(7,10,11), while other do not ^(12,13).

Pentoxifylline is a methylxanthine able to increase the blood flow and oxygen tension in tissues with defective regional microcirculation and has also been used to treat skin flaps and venous leg ulcers ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. Studies on this subject are controversial and objective quantitative data regarding the action of EGF and pentoxifylline on TM healing are lacking. Based on the hypothesis that EGF and pentoxifylline increase the healing rate of TM perforations and that the combination of EGF with pentoxifylline has a synergistic effect, the aims of the present study were:

a) to determine the effect of EGF and pentoxifylline alone or in combination on the healing of subacute TM perforations in chinchillas;

b) to quantify the healing rate of subacute TM perforations in chinchillas treated with EGF and pentoxifylline alone or in combination, and to compare the results with a control group.

METHODS

The protocol was approved by the local Research Ethics Committee. The experiment was carried out in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council) at the Laboratory of Clinical Investigation.

Fifty chinchillas (*Chinchilla lanigera*) of both sex, aged 7 to 20 months and weighing 400 to 800 g, obtained from specialized breeders (Chillán and Achila) were studied. The animals were housed in individual cages, with free access to food and water. Animals with external or middle ear infection, congenital malformations or pregnant females were excluded from the study.

At this stage, all animals were submitted to TM perforations in both ears. The animals were anesthetized by subcutaneous injection of 2% xylazine hydrochloride (3 mg/kg) and ketamine hydrochloride (17 mg/kg). The entire procedure was performed with an endoscope measuring 2.7 mm in diameter at a 30° angle.

The TM area was calculated using a 0.5-mm thick silicone mold (Xomed Surgical Products, Jacksonville) made in such a way as to cover the

entire surface of the area. The perforation was standardized in size and shape with a silicone mold corresponding to the lower quadrants of the TM and to half the first silicone mold (FIGURE 1).

The perforation mold was positioned in the lower quadrants of the TM. Myringotomy was performed around the mold using the thermal energy of an electrode tip (90° angle and 0.3 mm in diameter) coupled to an electrical surgical knife (EMAI® BP-100) with a power of 15 watts (FIGURE 2 – A). Five right angle incisions were made in the remaining TM and the edges of the perforation were medially folded and cauterized to the inner layer (FIGURE 2 – B).

The images were recorded with a videotape recorder (Panasonic Super Drive VHS) using a microcamera (Sony® DXC – Ls1) and an endocoupler (22 mm) coupled to the endoscope. The images were imported from the video system to a computer using a video plate (PixelView® Play TV USB Pro). A graphics program (Autocad® R14) allowed the measurement of the entire TM area and of the TM perforation area (FIGURE 3).

Prophylaxis against infections consisted of the oral administration of 5 mg/kg/day of enrofloxacin during the first 5 postoperative days after TM perforation and the first 10 days of the treatment protocol.

Eight chinchillas were randomly selected for histological analysis of both TM 30 days after the perforation procedure. The animals were again anesthetized and their TM were dissected and analyzed histologically by hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry for semiquantitative description of the epithelium and stroma.

For dissection of the temporal bones, an interauricular incision was

made in the skin in the dorsal portion of the bullae. A circular hole measuring 5 mm in diameter was drilled with a diamond bur (8.3 x 2.6 mm) coupled to an electrical micromotor (405N – Dentec[®]). The middle ear and external acoustic meatus were fixed in place with 10% buffered formalin, the animals were sacrificed, and their bullae dissected. The TM were removed en bloc from the bullae, maintaining the bony lamina, fixed in formalin for 24 h and decalcified in 5% EDTA (ethylenediamine tetra-acetic acid) until reaching the cut-off. A longitudinal incision was made in the line of the manubrium of the malleus in all TM with a No. 11 scalpel blade, exposing the central portion of the TM. The samples processed in the Laboratory of Pathology (Medical School, University of Sao Paulo) were washed under running water, dehydrated in six graded alcohol baths (70 to 100%), cleared in xylene and embedded in paraffin blocks. The blocks were cut longitudinally into 4- μ m thick sections with a microtome (RM2125RT – Leica[®]) and the sections were mounted on glass slides, deparaffinized, and stained. Immunohistochemistry was performed at the Division of Pathology (Cardoso de Almeida Laboratory), using anti- α smooth muscle actin as primary antibody which reacts with the α -actin isoform expressed by myofibroblasts during the contraction of healing tissue.

The slides were analyzed under a light microscope (Standard, Zeiss[®]) and the following parameters were evaluated semiquantitatively: epithelial thickness, intensity of the inflammatory infiltrate, fibroblast characterization (young or mature), inflammatory cell count in stroma (neutrophils, macrophages and lymphocytes), vascularization, and the presence of

myofibroblasts in stroma. These were scored from zero to three, except for the third item, where 0 = absent, 1 = discrete, 2 = moderate, and 3 = marked.

After 30 days, the ears of animals whose TM perforation had shown little or no healing (less than 10% of the first perforated area) were included in the treatment protocol (FIGURE 4). We excluded animals with external or middle ear infection. The ears selected were randomized in a stratified fashion to receive pentoxifylline or not and then to receive EGF or not, and divided into four groups: control group treated with topical distilled water, EGF group treated with topical EGF, pentoxifylline group treated with oral pentoxifylline, and EGF + pentoxifylline group treated with both agents.

A round absorbable gelatin sponge (Gelfoam[®], Pharmacia Brazil) shaped in the form of the TM mold was placed on the residual TM surface and 25 μ L of a solution containing either distilled water or 0.25 mg/mL EGF (Serotec Product[®], Biogen) was added with a micropipette (Acura, Socorex[®], Cral) every 72 h, 3 times, for 10 days, and the sponge was then removed (FIGURE 5). At the same time, 20 mg/kg/day oral pentoxifylline was administered every 12 h for 10 days.

At the end of the study, the animals were killed in a carbon dioxide chamber where they remained for at least 10 min ⁽¹⁸⁾ and then disposed of in the hospital waste.

The outcome of treatment of TM perforations was classified as unhealed when the difference in percent perforated area (%PA) at the beginning and 30 days after the treatment protocol was less than 10%, as partially healed when the difference was 10% or more, and completely

healed when no perforation was observed 30 days after treatment.

The %PA was calculated by dividing the perforated area by the TM area, multiplied by 100. The healing rate of the TM perforation was established as the difference in %PA at the beginning and 30 days after treatment.

The data obtained were submitted to descriptive analysis, and the mean and standard deviation of the %PA and healing rate of the TM perforation were calculated for the four groups. The categorical variables were compared between groups using Fisher's exact test and the continuous variables were compared by one-way ANOVA. Post-hoc comparisons between groups were made by the Bonferroni test. The level of significance was set at $p \leq 0.05$. Statistical analysis was performed with the STATA™ 8.0 program.

RESULTS

Of the 16 ears (eight animals) submitted to histological analysis, two were lost during TM dissection and 14 were analyzed histologically. Coexisting chronic and acute inflammatory characteristics of the TM were observed in almost all cases after 30 days. Chronic features included the migration of fibroblasts, although myofibroblasts were absent in 12 of the 14 slides analyzed (FIGURE 6). Acute inflammation was characterized by the presence of an inflammatory infiltrate, increased vascularization and the presence of leukocytes in 13 of the 14 slides (FIGURE 7).

The initial sample consisted of 42 chinchillas (84 ears) submitted to the standard procedure for creation of bilateral TM perforations. Within 30

days, 38 (45.2%) ears were excluded due to healing of the perforation, scar retraction of the TM, and infection or animal death of unknown cause during the anesthetic procedure (FIGURE 8).

The final sample consisted of 46 (54.8%) ears whose TM perforation had healed by less than 10% after 30 days and which were included in the treatment protocol. During this stage, three animals were lost during the anesthetic procedure and six ears were therefore excluded from the data analysis. The remaining 40 (47.6%) ears were assigned as follows: 9 to the control group, 8 to the EGF group, 13 to the pentoxifylline group, and 10 to the EGF + pentoxifylline group.

As can be seen in FIGURE 9, complete healing of the perforation occurred in only one (10%) ear of the EGF + pentoxifylline group. In the same group, partial healing was observed in seven (70%) ears and no healing in two (20%). Partial healing was also observed for eight (100%) ears in the EGF group, five (55%) in the control group and five (38.5%) in the pentoxifylline group. The difference observed in the distribution of the results was statistically significant by Fisher's exact test ($p = 0.007$).

Before the beginning of treatment, the mean %PA was 50% and no significant difference was observed between groups (ANOVA, $p = 0.572$) (TABLE 1). Thirty days after treatment, significant differences in the mean %PA were observed between groups (ANOVA, $p < 0.001$), with the %PA being higher than 44% in the control and pentoxifylline group and lower in the other groups (TABLE 2). FIGURE 10 shows the %PA before and 30 days after treatment. Pairwise comparison between groups showed a significantly higher

mean %PA in the EGF group compared to the control ($p = 0.003$) and pentoxifylline ($p < 0.001$) groups. No significant difference in the mean %PA was observed between the control and pentoxifylline groups ($p = 1.00$), control and EGF + pentoxifylline groups ($p = 0.964$), EGF and EGF + pentoxifylline groups ($p = 0.097$), or pentoxifylline and EGF + pentoxifylline groups ($p = 0.142$).

A significant difference was observed in the mean healing rate of the TM perforation between groups (ANOVA, $p < 0.001$) (TABLE 3). The mean healing rate remained lower than 9% in the control and pentoxifylline groups, while it was higher than 16% in the other groups. Pairwise comparison between groups showed that the mean healing rate was significantly higher in the EGF group than in the control ($p = 0.003$) and pentoxifylline ($p < 0.001$) groups. The mean healing rate obtained for the EGF + pentoxifylline group showed a tendency toward a difference when compared to the EGF group ($p = 0.101$) and the pentoxifylline group ($p = 0.069$). No significant difference in the mean healing rate was observed between the control and pentoxifylline groups ($p = 1.00$) or between the EGF + pentoxifylline and control groups ($p = 0.874$) (FIGURE 11).

DISCUSSION

Slightly more than half our initial sample showed TM perforations whose had healed by less than 10% four weeks after the perforation procedure. Although the rate of TM perforations reported by Amoils et al. ⁽¹⁹⁾

in a similar animal model was higher (84%), in the present study the ears were strictly chosen for the treatment protocol and none of them were re-perforated when showing spontaneous healing as done by these authors. On the other hand, Dvorak et al. ⁽¹²⁾ reported a lower rate and achieved 31% of TM perforations using the same animal model.

In a retrospective study, Griffin ⁽²⁰⁾ observed that almost 70% of traumatic TM perforations healed spontaneously within 30 days and this healing rate decreased to 18% over the following months. Based on this fact, a high healing rate might be expected during the first 30 days, which tends to decrease thereafter. The chinchilla TM perforations studied here can be considered to be subacute since care was taken to exclude ears showing 10% healing or more after 4 weeks. This approach was adopted to rule out any measurement error and to ensure that the events observed after this stage could be solely attributed to the treatment.

Usually, the initial treatment of traumatic TM perforations includes clinical care, with surgical repair being proposed if spontaneous healing does not occur after at least 3 months ^(20,21). The major aim of the present study was to evaluate the feasibility of an office treatment using a simple procedure without the need for anesthesia, which could be offered to patients with traumatic TM perforations that do not heal during the acute wound stage. The purpose was to study the effect of healing inducers on subacute TM perforations, taking advantage of some remaining mitogenic activity before the need for surgical repair.

Histological analysis of the perforations after 30 days showed that the

observation period adopted was sufficient to consider the perforations to be subacute. In most slides, the perforations presented chronic inflammatory activity characterized by the absence of myofibroblasts expressing α -smooth muscle actin which should be present throughout the healing tissue ⁽²²⁾. The absence of myofibroblasts indicates the lack of contraction of healing tissue and chronicity of the process. In addition, coexisting recurrent acute inflammatory activity was observed, as demonstrated by vascularization and the presence of an inflammatory infiltrate and neutrophils which generally disappeared within a few days after the injury. The presence of cells of the initial inflammatory phase suggests that the tympanic tissue analyzed presented, in addition to chronic inflammation, outbreaks of reactivation, a finding supporting the subacute nature of the lesion.

The present choice of a gelatin sponge was based on the need for the use of vehicles that allow a slow and sustained release of EGF to favor its maximum therapeutic potential ⁽²³⁻²⁶⁾. EGF ointment with gelatin led to a two-fold increase in the amount of granulation tissue 3 days after treatment and showed less degradation compared to EGF applied without vehicle ⁽²⁵⁾. An exposure time of the TM to EGF of at least 72 h was adopted to permit DNA synthesis and maximum cell division ⁽⁵⁾.

The outcome of treatment of TM perforations differed between groups. Partially and/or completely healed perforations were twice more frequent in the EGF and EGF + pentoxifylline groups compared to the other groups, whereas unhealed perforations were more frequent in the control and pentoxifylline groups. Our data cannot be compared with those reported by

Amoils et al. ⁽¹⁰⁾, Lee et al. ⁽¹¹⁾ and Dvorak ⁽¹²⁾ who treated supposedly chronic TM perforations using two treatment groups (with and without EGF) and taking into account only completely healed perforations. However, we agree with Amoils et al. ⁽¹⁰⁾ and Lee et al. ⁽¹¹⁾ that the chance of healing is higher for ears treated with EGF than for untreated controls.

The mean and standard deviation of the %PA were similar between groups before treatment, ensuring that the TM perforations were nearly the same size at this stage. A significant difference in the mean and standard deviation of the %PA was observed between groups 30 days after treatment, demonstrating that the drugs affected perforation healing in different manners. EGF at the dose scheme used resulted in a 30.3% healing rate of TM perforations over 30 days. This percentage was 1.8 times higher than in the EGF + pentoxifylline group, 3.5 times higher than in control ears, and 8.4 times higher than in ears treated with pentoxifylline.

Since each healing rate was analyzed after 30 days, considering that the %PA was 50% of the entire TM area in all groups before treatment and assuming that the healing rate remains unchanged, healing would be complete after 1.5 month in the EGF group, 3 months in the EGF + pentoxifylline group, 5.5 months in untreated ears, and 12.5 months in the pentoxifylline group.

Studies disagree about the effects of EGF on improving healing of chronic TM perforations. Amoils et al. ⁽¹⁰⁾ and Lee et al. ⁽¹¹⁾ observed that complete healing of perforations was 3 to 4 times higher in EGF-treated ears than in controls. However, in a similar study Dvorak et al. ⁽¹²⁾, analyzing the

effect of long-term EGF treatment, found no difference in the perforation closure rate between groups. Part of this discrepancy might be due the mechanical trauma and bleeding induced in the TM during repeated changes of the gelatin sponge, more than six times per ear, which might have contributed in part to the higher healing rate in the control group observed in the last study.

Although EGF has not been released for human use, Ramsay et al. ⁽¹³⁾ carried out a clinical trial using EGF to treat patients with chronic otitis media and observed a similar healing of TM perforations in the study and placebo groups. Part of these results might be due to the small doses employed and the short time of exposure to EGF.

The proposal to combine EGF and pentoxifylline was based on the fact that every tissue needs a certain oxygen tension and blood supply for mitosis and cell replication and that hypoxia and endotoxins suppress these events ⁽²⁷⁾. We hypothesized that the addition of a blood flow inducer such as pentoxifylline would increase the mitogenic action of EGF on TM healing. However, we did not find any further advantage of the use of pentoxifylline on the treatment of chinchilla TM perforations. On the contrary, our data showed lower healing rates in the groups receiving pentoxifylline. The healing rate was almost 2 times lower in the EGF + pentoxifylline group than in the EGF group, and 4.5 times lower in the pentoxifylline group than in the EGF + pentoxifylline group, showing a tendency toward a significant difference by the post-hoc test and suggesting that pentoxifylline probably interferes negatively with the action of EGF. Studies shows that the cellular effects of

pentoxifylline, in special phosphodiesterase inhibition, are not restricted to erythrocytes. Intracellular elevation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels have been reported on fibroblasts and keratinocytes cultures treated with pentoxifylline, which results in an inhibition of cell proliferation probably through down-regulation of cytokines and nuclear transcription factors ^(28, 29).

Our data are not comparable to those reported by Jull et al. ⁽¹⁷⁾, because they studied the effects of pentoxifylline for treating chronic skin ulcers. However, our initial expectation with the possible benefits of the pentoxifylline was much higher since we tested a drug for the treatment of TM perforations which, according to these authors, was 41% more effective than placebo in the healing of venous leg ulcers. The good results reported by Jull et al. (2002) ⁽¹⁷⁾ might be attributed in part to the previously unknown anti-inflammatory and antifibrogenic effects of pentoxifylline recently reported by other authors ^(30,31). According to Stosic-Grujicic et al. ⁽³⁰⁾ and Raetsch et al. ⁽³¹⁾, pentoxifylline is able to decrease proinflammatory and profibrogenic cytokines which may down-regulate the expression of growth factors, partially reducing cell proliferation.

The present results are not directly comparable to those reported by Lim et al. ⁽³²⁾, since these authors used pentoxifylline to treat acute TM perforations in guinea pigs, which have a great chance of spontaneous healing, a fact that might compromise the experimental analysis of the isolated effect of the drug. Nevertheless, like these authors we did not observe additional improvement in the healing rate of TM perforations with

the use of pentoxifylline.

We conclude that EGF helped in the wound healing of subacute TM perforations in chinchillas but the same was not observed for pentoxifylline. The combination of pentoxifylline with EGF had no synergistic effect on the healing of these perforations. The healing rate of subacute TM perforations over a 30-day period was 30.3% for the EGF group, 3.6% for the pentoxifylline group, 16.5% for ears treated with EGF + pentoxifylline, and 8.7% for untreated controls.

REFERENCES

1. Bento RF, Miniti A, Marone SAM. *Tratado de otologia*. São Paulo: EDUSP, 1998.
2. Laidlaw DW, Costantino PD, Govindaraj Set al. Tympanic membrane repair with a dermal allograft. *Laryngoscope* 2001;111:702-7.
3. Oliveira JAA, Hyppolito MA, Netto JC et al. Myringoplasty using a new biomaterial allograft. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003;69:649-55.
4. Carpenter G, Cohen S. Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts. *J Cell Physiol* 1976;88:227-37.
5. Aharonov A, Pruss RM, Herschman HR. Epidermal growth factor. Relationship between receptor regulation and mitogenesis in 3T3 cells. *J Biol Chem* 1978;253:3970-7.
6. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg* 1993;166:74-81.
7. O'Daniel TG, Petitjean M, Jones SC et al. Epidermal growth factor binding and action on tympanic membranes. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;99:80-4.
8. Mondain M, Ryan A. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor are induced in guinea-pig tympanic membrane following traumatic perforation. *Acta Otolaryngol* 1995;115:50-4.
9. Somers T, Goovaerts G, Schelfhout L et al. Growth factors in tympanic membrane perforations. *Am J Otol* 1998;19:428-34.
10. Amoils CP, Jackler RK, Lustig LR. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;107:669-83.
11. Lee AJ, Jackler RK, Kato BM et al. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor: progress toward clinical application. *Am J Otol* 1994;15:10-8.
12. Dvorak DW, Abbas G, Ali T et al. Repair of chronic tympanic membrane perforations with long-term epidermal growth factor. *Laryngoscope* 1995;105:1300-4.
13. Ramsay HA, Heikkonen EJ, Laurila PK. Effect of epidermal growth factor on tympanic membranes with chronic perforations: a clinical trial. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:375-9.

14. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 1987;34:50-97.
15. Nemiroff PM. Synergistic effects of pentoxifylline and hyperbaric oxygen on skin flaps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988;114:977-81.
16. Armstrong M, Jr., Kunar DR, Cummings CW. Effect of pentoxifylline [corrected] on myocutaneous flap viability in pigs. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;109:668-75.
17. Jull AB, Waters J, Arroll B. Pentoxifylline for treating venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2002:CD001733.
18. Souza NL. Eutanásia. In: Luca RR, Alexandre SR, Marques T, Souza NL, Merusse JLB, Neves SP, eds. *Manual para técnicos em bioterismo*. São Paulo: FINEP-COBEA, 1996:157-77.
19. Amoils CP, Jackler RK, Milczuk H et al. An animal model of chronic tympanic membrane perforation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;106:47-55.
20. Griffin WL, Jr. A retrospective study of traumatic tympanic membrane perforations in a clinical practice. *Laryngoscope* 1979;89:261-82.
21. Bento RF, Lessa MM, Chung D et al. *Condita practices em otologia*. São Paulo: Funda CaO Otorhinolaryngologic, 2002.
22. Lorene D, UCI K, Costa AM et al. Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound Repair Regen* 2002;10:86-92.
23. Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD et al. Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7340-4.
24. Brown GL, Curtsinger LJ, White Met al. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Ann Surg* 1988;208:788-94.
25. Okumura K, Kiyohara Y, Komada F et al. Improvement in wound healing by epidermal growth factor (EGF) ointment. I. Effect of nafamostat, gabexate, or gelatin on stabilization and efficacy of EGF. *Pharm Res* 1990;7:1289-93.
26. Slavin J, Hunt JA, Nash JR et al. Recombinant basic fibroblast growth factor in red blood cell ghosts accelerates incisional wound healing. *Br J Surg* 1992;79:918-21.
27. Bankey P, Fiegel V, Singh Ret al. Hypoxia and endotoxin induce macrophage-mediated suppression of fibroblast proliferation. *J Trauma* 1989;29:972-9; discussion 9-80.

28. Berman B, Duncan MR. Pentoxifylline inhibits normal human dermal fibroblast in vitro proliferation, collagen, glycosaminoglycan, and fibronectin production, and increases collagenase activity. *J Invest Dermatol.* 1989; 92:605-10.
29. Gilhar A, Grossman N, Kahanovicz Set al. Antiproliferative effect of pentoxifylline on psoriatic and normal epidermis. In vitro and in vivo studies. *Acta Derm Venereol.* 1996; 76:437-41.
30. Stosic-Grujicic S, Maksimovic D, Badovinac V et al. Antidiabetogenic effect of pentoxifylline is associated with systemic and target tissue modulation of cytokines and nitric oxide production. *J Autoimmun* 2001;16:47-58.
31. Raetsch C, Jia JD, Boigk G et al. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut* 2002;50:241-7.
32. Lim AA, Washington AP, Greinwald JH et al. Effect of pentoxifylline on the healing of guinea pig tympanic membrane. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:262-6.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Tympanic membrane silicone mold (left) and perforation silicone mold (right)

FIGURE 2. Myringotomy performed around the mold using an electrode coupled to an electrical surgical knife (A) and the edges of the perforation being folded and cauterized to the inner layer (B).

FIGURE 3. The graphics program used to measure the tympanic membrane area (blue line) and the tympanic membrane perforation area (green line).

FIGURE 4. Tympanic membrane perforation seen at the day (A) and 30 days after (B) the perforation procedure which showed less than 10% healing and was included in the treatment protocol.

FIGURE 5. Gelatin sponge placed on the tympanic membrane surface (A) and the micropipette tip used to add the topical solutions (B).

FIGURE 6. Tympanic membrane (TM) stroma did not expressing (left) and expressing myofibroblasts (oval dot line) (right) containing α -smooth muscle actin detected by immunohistochemistry, suggesting on the right wound contraction and healing in only two of the 14 TM specimens and on the left chronic wound.

FIGURE 7. Subacute inflammatory stages of the tympanic membrane healing process detected by hematoxylin-eosin staining, showing subepithelial swelling (arrow) (A) and enlarged blood vessel in the stroma which was filled with interstitial leukocytes (B).

FIGURE 8. Number and percentage of ears excluded 30 days after the tympanic membrane perforation procedure.

FIGURE 9. Outcome of treatment observed in tympanic membrane perforations.

FIGURE 10. Percent perforated area before and 30 days after treatment.

FIGURE 11. Mean and standard error of the healing rate of tympanic membrane perforations observed among groups.

TABLES

Table 1: Comparison of percent perforated area between groups before treatment

%PA	Control	EGF	Pentoxifylline	EGF + pentoxifylline	p
Mean	52.9	48.3	52.6	51.5	0.572
Standard deviation	7.7	6.2	8.1	7.1	
Minimum	41.1	40.1	39.1	38.6	
Maximum	65.1	59.2	68.2	62.7	

%PA: percent perforated area; EGF: epidermal growth factor; p: level of significance (ANOVA)

Table 2: Comparison of percent perforated area between groups 30 days after treatment

%PA	Control	EGF	Pentoxifylline	EGF + pentoxifylline	p
Mean	44.2	18.1	48.9	34.9	< 0.001
Standard deviation	12.6	9.1	15.1	16.8	
Minimum	16.6	8.4	16.4	0.05	
Maximum	61.6	30.4	69.1	55.9	

%PA: percent perforated area; EGF: epidermal growth factor; p: level of significance (ANOVA)

Table 3: Comparison of healing rate of tympanic membrane perforations between groups

Healing rate	Control	EGF	Pentoxifylline	EGF + pentoxifylline	p
mean	8.7	30.3	3.6	16.5	
minimum	-0.9	15.1	-13.9	0.09	<0.001
maximum	27.8	40.4	27.1	49.7	

EGF: epidermal growth factor; p: level of significance (ANOVA)

FIGURES

Figure 1

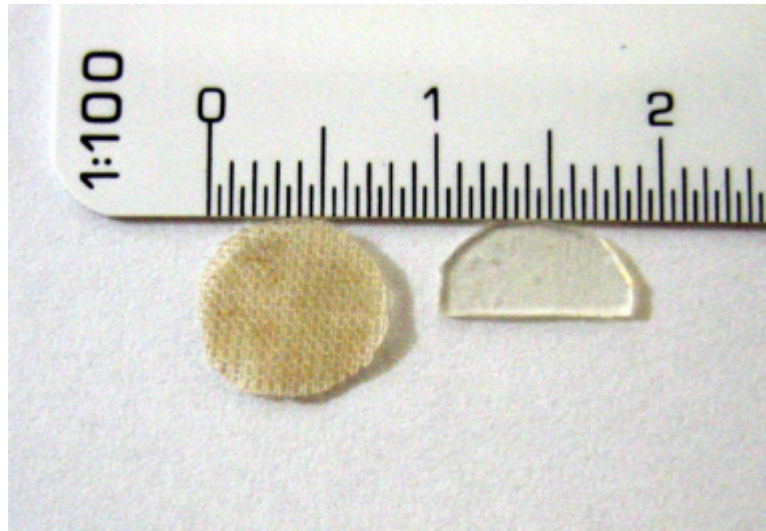


Figure 2

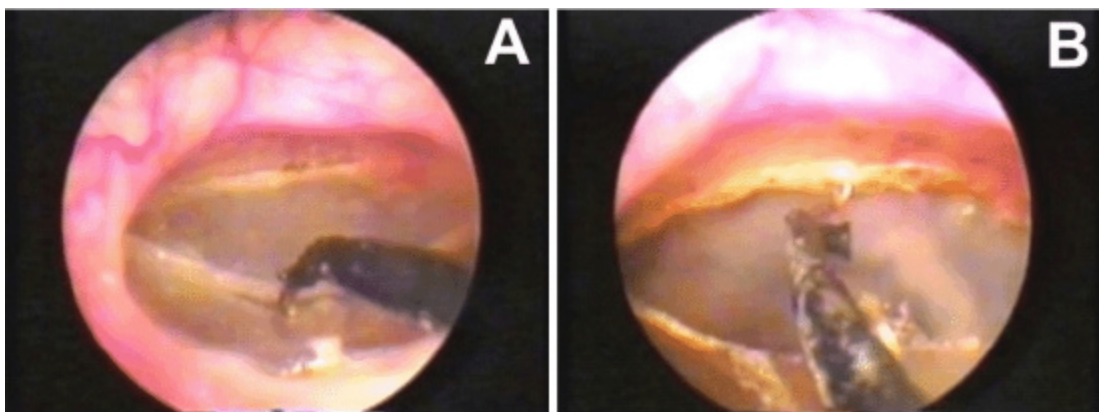


Figure 3

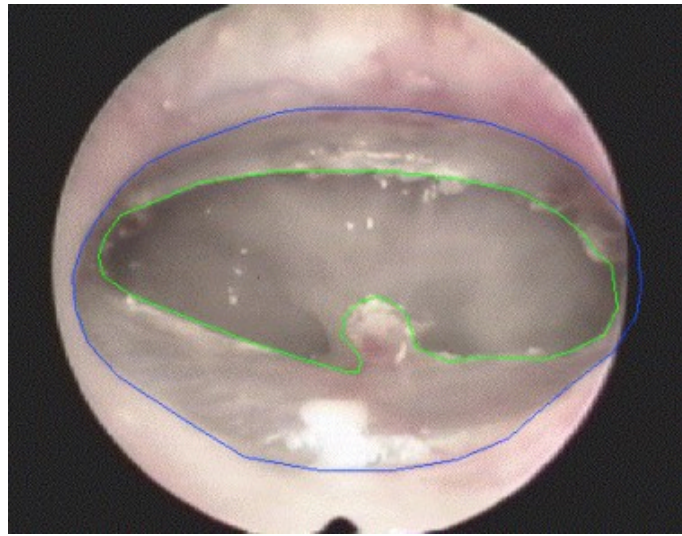


Figure 4

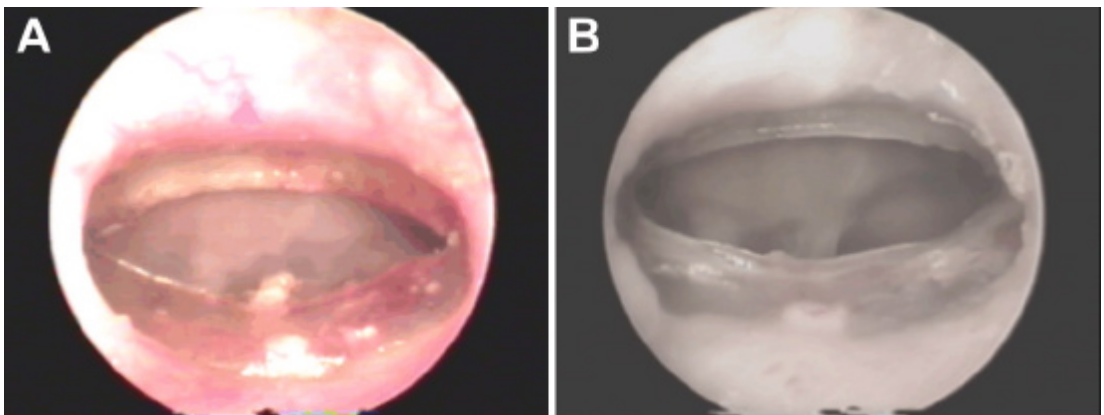


Figure 5

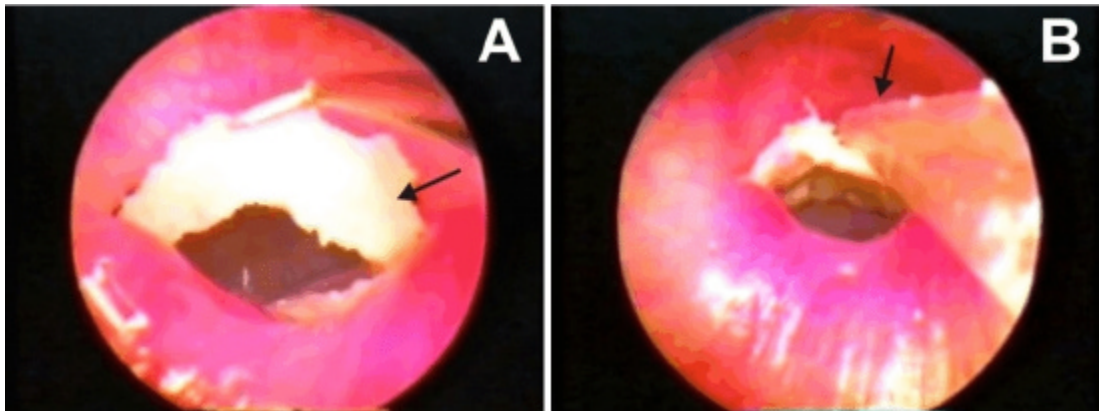


Figure 6

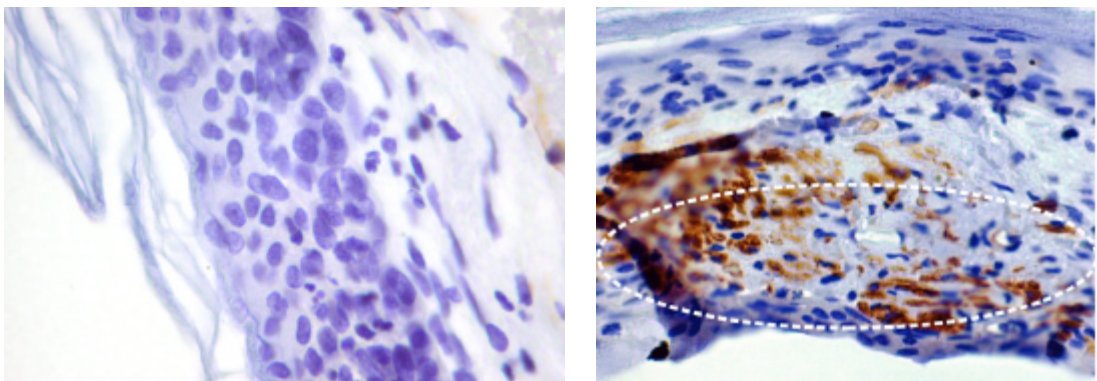


Figure 7

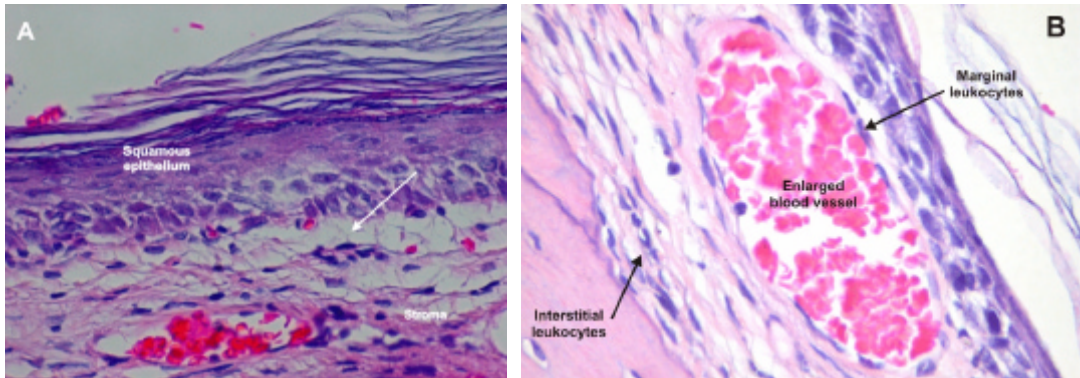


Figure 8

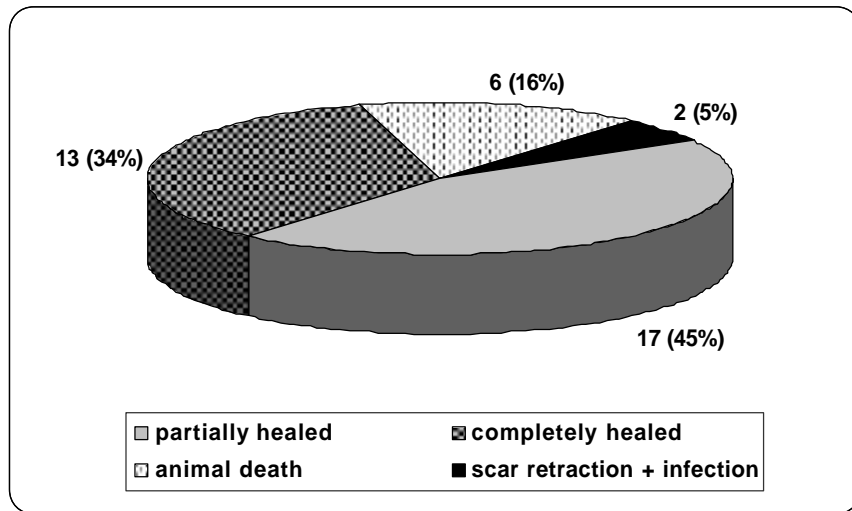


Figure 9

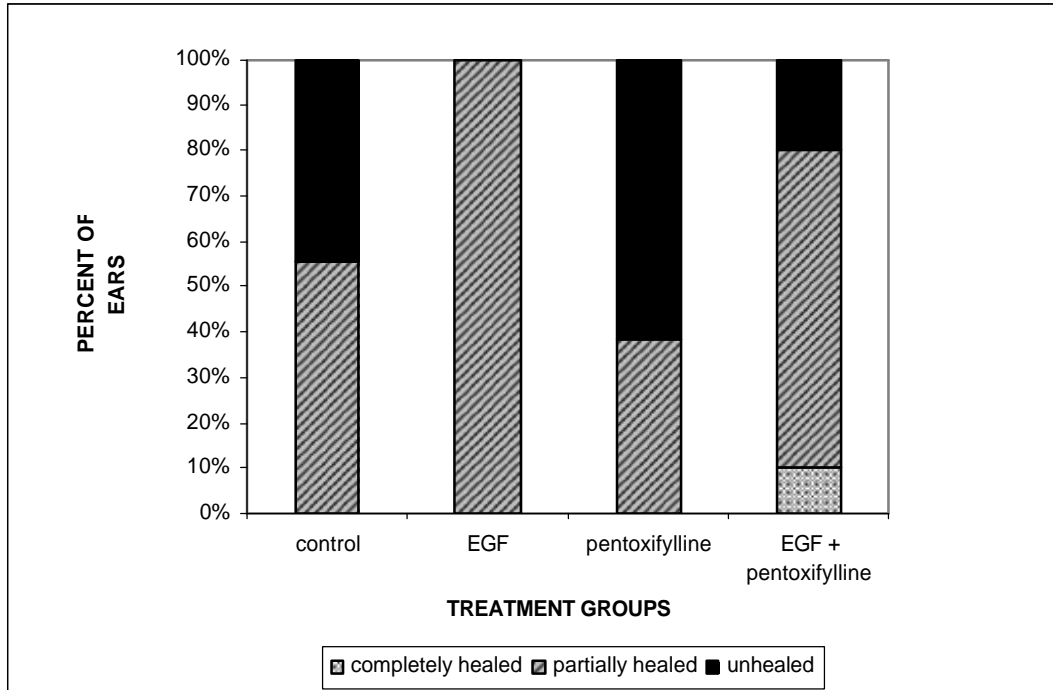


Figure 10

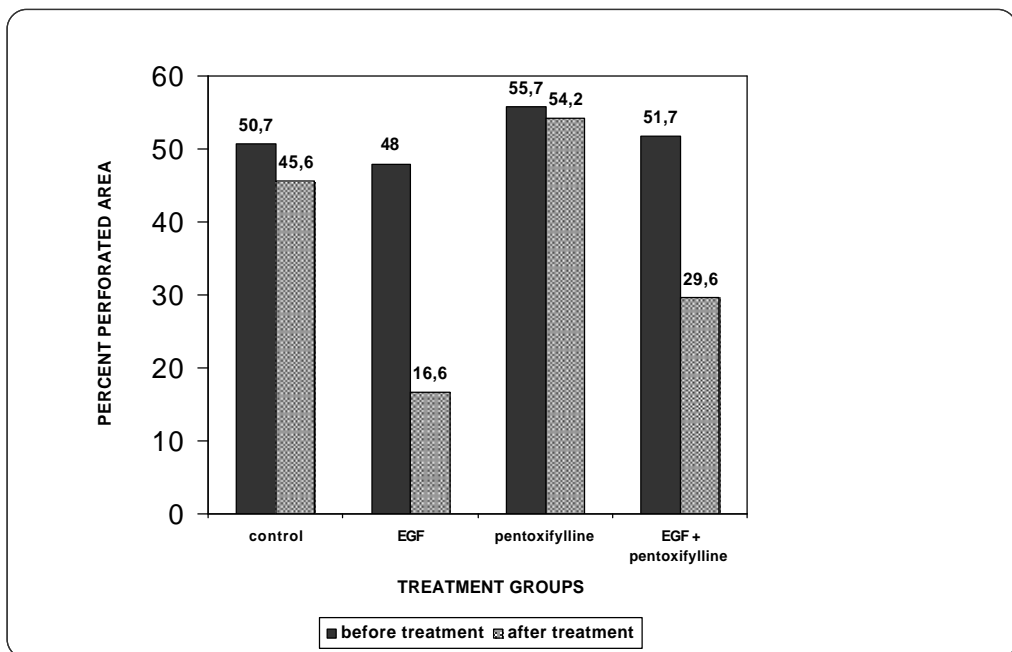
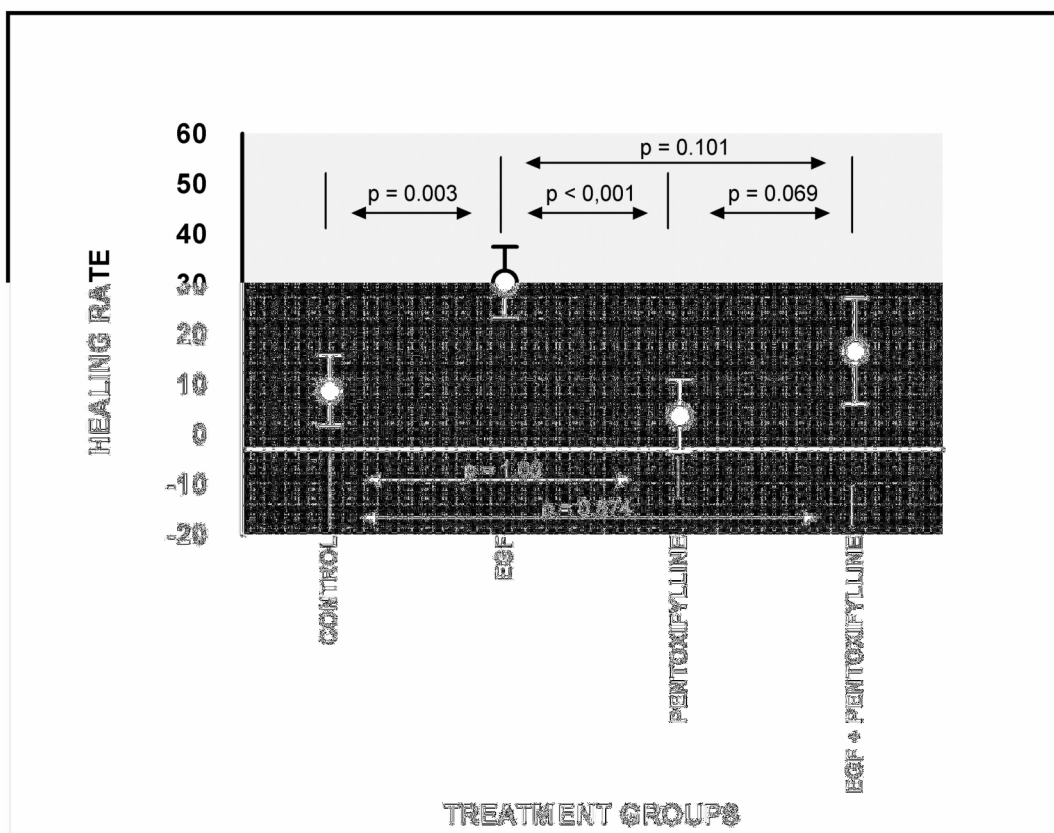


Figure 11



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%AP	Percentual de área perfurada
µg	Micrograma
µg/d	Micrograma por dia
µg/ml	Micrograma por mililitro
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cm ²	Centímetro quadrado
Co ₂	Dióxido de carbono
Da	Dalton
dB	Decibéis
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FC	Fatores de crescimento
FCDM	Fator de crescimento derivado de macrófago
FCDP	Fator de crescimento derivado de plaqueta
FCE	Fator de crescimento epitelial
FCELH	Fator de crescimento epitelial ligado a heparina
FCF	Fator de crescimento de fibroblasto
FCIS	Fator de crescimento insulina símile
FCQ	Fator de crescimento de queratinócitos
FCT-α	Fator de crescimento transformador alfa
FCT-β	Fator de crescimento transformador beta
FCTC	fator de crescimento do tecido conectivo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FNT	Fator de necrose tumoral
g	Gramas

HE	Hematoxilina-eosina
HI	Imuno-histoquímica
I^{125}	Iodo 125
INF- γ	Interferon gama
MAE	Meato acústico externo
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma
mg/kg/d	Miligrama por quilograma por dia
mg/ml	Miligrama por mililitro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro ao quadrado
MT	Membrana timpânica
ng/ml	Nanograma por mililitro
OMCS	Otite média crônica simples
p	Nível de significância
rpm	Rotação por minuto
u ²	Unidade quadrada
W	Watt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Molde de silicone posicionado sobre a MT e ocupando toda sua superfície	31
Figura 2 - Molde de silicone equivalente à área total da MT e molde de perfuração.....	32
Figura 3 - Molde de perfuração posicionado sobre os quadrantes inferiores da MT.....	33
Figura 4 - Miringotomia realizada nos limites do molde com eletrodo de ponta angulada.....	33
Figura 5 - Medialização e cauterização dos bordos da MT após miringotomia.....	33
Figura 6 - Sistema de video-imagem usado na captura das imagens.....	34
Figura 7 - Cálculo das áreas da MT e da perfuração em u^2	35
Figura 8 - MT perfurada no dia e 30 dias após o procedimento de perfuração, cicatrização inferior a 10%.....	39
Figura 9 - Esponja de gelatina sendo colocada sobre a MT remanescente.....	41
Figura 10 - Ponteira da micropipeta usada na aplicação das soluções tópicas.....	42
Figura 11 - Cálculo do % AP.....	43
Figura 12 - Cálculo do percentual de cicatrização da perfuração de MT.....	43
Figura 13 - Estroma da MT não corado pela imuno-histoquímica, sugerindo lesão crônica pela ausência de miofibroblastos	47
Figura 14 - Miofibroblastos corados em tons de cobre, no estroma da MT, indicando cicatrização e perfil contrátil do tecido.....	47
Figura 15 - Processo inflamatório na MT com edema infra-epitelial e destacamento do epitélio do estroma subjacente	48
Figura 16 - Processo inflamatório subagudo na MT com vaso capilar ectásico, leucócitos marginais e intersticiais.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise histológica das perfurações de MT	49
Tabela 2 - % AP de MT no início do tratamento.....	52
Tabela 3 - % AP de MT 30 dias após o tratamento	53
Tabela 4 - Percentual de cicatrização das perfurações de MT.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número e percentagem de orelhas excluídas 30 dias após a perfuração.....	50
Gráfico 2 - Efeito final do tratamento sobre as perfurações de MT	51
Gráfico 3 - % AP antes e depois do tratamento nos quatro grupos de estudo.....	53
Gráfico 4 - Percentual de cicatrização médio das perfurações de MT (média \pm erro-padrão).....	55

RESUMO

Ramalho JRO. *Cicatrização de perfurações subagudas de membrana timpânica de chinchilas tratadas com fator de crescimento epitelial e pentoxifilina* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 88p.

Introdução: O fator de crescimento epitelial é uma citocina capaz de modular a proliferação de células epiteliais e endoteliais *in vitro* e *in vivo*. A pentoxifilina é uma metilxantina que tem sido usada para tratar enxertos de pele e úlceras venosas cutâneas. A literatura sobre o tema é controversa e carece de quantificação objetiva das ações dos dois fármacos. Este estudo teve os seguintes objetivos: determinar o efeito do fator de crescimento epitelial e da pentoxifilina utilizados de forma isolada e em associação na cicatrização de perfurações subagudas de membranas timpânicas e quantificar o percentual de cicatrização quando da utilização destes fármacos isolados ou associados, comparando os resultados obtidos com o observado em um grupo controle. **Métodos:** Cinqüenta chinchilas foram submetidas a procedimento para criar perfuração de membrana timpânica em ambas as orelhas, 8 animais foram submetidos à análise histológica após 30 dias e os demais 42, aqueles dos quais pelo menos uma orelha apresentou cicatrização inferior a 10%, foram distribuídos em quatro grupos: controle, fator de crescimento epitelial, pentoxifilina ou fator de crescimento epitelial associado a pentoxifilina. **Resultados:** A análise histológica evidenciou que o período de observação adotado foi suficiente para considerarmos subagudas as perfurações de membrana timpânica. O percentual de cicatrização de perfurações subagudas de membrana timpânica no período de 30 dias mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA; $p < 0,001$) e foi de 30,3% no grupo tratado com fator de crescimento epitelial, de 3,6% no grupo que recebeu pentoxifilina, de 16,5% no grupo tratado com fator de crescimento epitelial associado a pentoxifilina e de 8,7% na ausência de tratamento. **Conclusões:** O fator de crescimento epitelial auxiliou o processo de cicatrização de perfurações subagudas de membranas timpânicas de chinchilas, o que não se observou com a pentoxifilina. A associação da pentoxifilina com o fator de crescimento epitelial não potencializou seu efeito.

Descritores: Orelha média, membrana timpânica, timpanoplastia, miringoplastia, chinchila, cicatrização de feridas, fator de crescimento epidérmico, pentoxifilina, perfuração de membrana timpânica.

SUMMARY

Ramalho JRO. *Healing of subacute tympanic membrane perforations in chinchillas treated with epidermal growth factor and pentoxifylline* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 88p.

Introduction: EGF is a cytokine able to modulate the proliferation of epithelial and endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. Pentoxifylline is a methylxanthine that has been used to treat skin flaps and venous leg ulcers. Studies on this subject are controversial and objective quantitative data regarding the action of EGF and pentoxifylline on the TM healing are lacking. The aims of the present study were to determine the effect of epidermal growth factor (EGF) and pentoxifylline and to quantify the healing rate of subacute tympanic membrane (TM) perforations treated with these drugs in combination or alone, and to compare the results with a control group. **Methods:** We studied 50 chinchillas submitted to TM perforation; eight were select for histological analysis after 30 days and among the others 42 those shown little or no healing were distributed into four groups: control, EGF, pentoxifylline or EGF with pentoxifylline. **Results:** Histological analysis showed that the observation period adopted was sufficient to consider the TM perforations to be subacute. The healing rate of subacute TM perforations over a 30-day period showed significant difference between the groups (ANOVA; $p < 0.001$) and was 30.3% for the EGF group, 3.6% for the pentoxifylline group, 16.5% for ears treated with EGF with pentoxifylline and 8.7% for untreated controls. **Conclusion:** EGF helps in the healing of subacute TM perforations in chinchillas but the same was not observed for pentoxifylline. The combination of both drugs had no synergistic effect on the healing of these perforations.

Descriptors: Middle ear, tympanic membrane, tympanoplasty, myringoplasty, chinchilla, wound healing, epidermal growth factor, pentoxifylline, tympanic membrane perforation.

1 INTRODUÇÃO

A membrana timpânica (MT) participa ativamente das doenças da orelha média, refletindo-as por meio de bolsas de retração, perfurações, efusão e timpanoesclerose¹⁻³. As perfurações são orifícios decorrentes de alterações estruturais do tecido timpânico, caracterizando-se histologicamente por epitelização dos seus bordos^{4,5}. Nas perfurações crônicas, o epitélio escamoso estratificado que compõe a camada externa prolonga-se medialmente, alcança o epitélio cuboidal simples da camada interna e estabelece uma junção escamo-cúbica⁶.

A infecção é a causa mais freqüente de perfuração da MT e sua prevalência atinge de 1% a 3% da população norte-americana⁷. As perfurações crônicas originam-se geralmente de infecções recorrentes, que provavelmente interferem no processo fisiológico de cicatrização por inibição da atividade mitogênica local e pela grande concentração de proteases ativas⁸. O trauma representa a segunda maior causa de perfurações, com prevalência de 0,6% entre norte-americanos⁹. A taxa de cicatrização espontânea, após perfuração traumática da MT, varia de 78,7% a 88%⁹⁻¹¹. A probabilidade de cicatrização espontânea diminui com o aumento da perfuração, na presença de infecções associadas, na faixa etária acima dos 50 anos e nos traumas cujos mecanismos incluam necrose tecidual extensa^{1,7,9,12}.

As manifestações audiológicas podem incluir perda auditiva condutiva com intervalo entre via aérea e via óssea de 14 dB a 40 dB, zumbido, plenitude auricular e otorréia^{4,5,13}. O tratamento das perfurações visa cicatrizar o tecido timpânico para prevenir infecções e restaurar a audição. A literatura sobre o tema tem focado duas principais linhas de pesquisa científica. A primeira inclui a cicatrização das perfurações por meio de novas matrizes protéicas que promovam suporte e sirvam de guia para o tecido em regeneração (miringoplastia)¹⁴⁻¹⁶. A segunda visa induzir a proliferação e migração celular por meio de mitógenos (fatores moduladores de crescimento) ou indutores do fluxo sanguíneo (agentes hemorreológicos).

A timpanoplastia representa o recurso cirúrgico mais utilizado no reparo de perfurações crônicas de MT. Enxertos autólogos de fâscia temporal e de pericôndrio de cartilagem tragal são os mais em voga^{1,17,18}. Estudos retrospectivos e prospectivos de pacientes submetidos à miringoplastia mostram que o sucesso de pega dos enxertos varia de 75% a 97%, independente da técnica e do tipo de matriz usada¹⁷⁻²¹. Mesmo em caso de disfunção tubária associada, os resultados cirúrgicos são bons em 73% dos casos, não constituindo contra-indicação para o procedimento²². Também não existe relação entre a pega do enxerto e a área ou o grau de pneumatização da mastóide²³.

Nas últimas décadas, a biotecnologia recombinante permitiu a síntese em larga escala de fatores de crescimento (FC), habitualmente encontrados no soro e em tecidos. Estas citocinas, moduladoras do crescimento celular em culturas de células *in vitro*^{24,25}, têm sido usadas em estudos experimentais

e ensaios clínicos na cicatrização de tecidos e são opções promissoras no reparo de perfurações de MT^{8,26-36}.

O fator de crescimento epitelial (FCE) é uma destas citocinas, capaz de modular a proliferação e quimiotaxia de células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e queratinócitos²⁴⁻³⁷. Receptores específicos para o FCE foram detectados na MT de animais e de humanos³⁸⁻⁴⁰. Estudos experimentais e ensaios clínicos investigaram a eficácia do FCE em promover a cicatrização de perfurações de MT. Alguns observaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e de estudo^{31,32,38}, enquanto outros não⁴¹⁻⁴².

Os agentes hemorreológicos são fármacos capazes de intensificar a perfusão e a cicatrização em tecidos isquêmicos. A pentoxifilina é uma metilxantina com estas propriedades. É capaz de promover o aumento do fluxo sanguíneo e da tensão de oxigênio em tecidos com microcirculação periférica deficitária⁴³⁻⁴⁵, aumentando as chances de cicatrização de úlceras venosas de perna⁴⁶. Contudo, o único estudo experimental em perfurações de MT não conseguiu mostrar benefícios com o uso da pentoxifilina⁴⁷.

A literatura sobre o tema é controversa e carece de quantificação objetiva das ações do FCE e da pentoxifilina na cicatrização de perfurações de MT. Delineamos este estudo experimental para testar as seguintes hipóteses:

a) O FCE e a pentoxifilina aumentam o percentual de cicatrização de perfurações de MT.

b) A associação do FCE com a pentoxifilina tem efeito sinérgico e potencializa o percentual de cicatrização de perfurações de MT.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve os seguintes objetivos:

a) Determinar o efeito do fator de crescimento epitelial e da pentoxifilina utilizados de forma isolada e em associação na cicatrização de perfurações subagudas de membranas timpânicas de chinchilas.

b) Quantificar o percentual de cicatrização observado em perfurações subagudas de membranas timpânicas de chinchilas quando da utilização de fator de crescimento epitelial e pentoxifilina isolados ou associados, comparando os resultados obtidos com o observado em um grupo controle.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Histologia da Membrana Timpânica

Lim⁴⁸ analisou a pars tensa de 20 MT humanas obtidas de cadáveres e observou que o epitélio escamoso estratificado é composto pelas camadas córnea, granular, Malpighiana e basal; o estroma pelas camadas subepidérmica, de fibra radial, de fibra circular e submucosa; e o epitélio cuboidal por camada única de células com microvilosidades. Segundo este autor, a MT possui de oito a 10 mm de diâmetro e de 30 a 90 μm de espessura.

Govaerts *et al.*⁴⁹ avaliaram MT de cadáveres com áreas de atrofia e de neotímpano. Os autores citam que a redução abrupta da espessura tecidual na área cicatrizada ocorre à custa de adelgaçamento do estroma, com espessura total da MT de 35 μm (epitélio escamoso 20 μm , estroma 15 μm e epitélio cuboidal menor que 1 μm).

Masaki *et al.*⁵⁰, em estudo experimental com chinchilas, observaram que a pars tensa da MT possui três porções bem definidas: epiderme, com várias camadas de epitélio escamoso queratinizado e membrana basal; estroma, porção mais espessa composta principalmente por fibras colágenas radiais e fibras circulares escassas; e epitélio cuboidal com camada simples de células.

Vrettakos *et al.*⁵¹ descreveram a anatomia da orelha média de 12 chinchilas adultas e observaram MT disposta paralelamente à parede medial

do meato acústico externo (MAE), com diâmetro médio dorso-ventral de 8,3 mm e rostro-caudal de 8,5 mm, com circunferência média de 26,5 mm e área média de 60,4 mm².

Amoils *et al.*^{31,52} analisaram MT de chinchilas e relataram que as mesmas possuem em média 64 µm de espessura da pars tensa (o epitélio escamoso com 9 µm, o estroma com 49 µm e o epitélio cuboidal com 6 µm de espessura).

Hsu *et al.*⁵³, em estudo descritivo de 60 orelhas de 30 chinchilas neonatas, observaram que a espessura da MT em sete porções da mesma tem média geral de 24 µm, semelhante à observada pelo mesmo autor para animais adultos, o mesmo acontece com o diâmetro timpânico médio que foi de 8,5 mm.

3.2 Cicatrização Tecidual Espontânea

McIntire e Benitez¹² realizaram perfurações traumáticas em 36 MT de gatos e observaram que o tempo para cicatrização espontânea das mesmas é proporcional ao tamanho da perfuração. As perfurações que correspondem a 50% da área total da MT cicatrizam por completo em tempo médio de 38 dias.

Reijnen e Kuijpers⁵⁴ observaram, após perfurações traumáticas em gatos e camundongos, atividade mitótica mais intensa no ânulus, no cabo do martelo e nas pregas maleares, sendo escassa na porção central da pars tensa. Citam que a atividade proliferativa do epitélio está associada às áreas de maior vascularização e que estas áreas se modificam. Uma semana após

a perfuração, nova rede vascular se forma circundando a área perfurada, fato que coincide temporalmente com o aumento da atividade mitótica local. Segundo os autores, as perfurações pequenas cicatrizam entre 10 e 14 dias e as totais em cinco semanas.

Griffin⁹, em estudo retrospectivo de 227 perfurações traumáticas em humanos, mostrou que 40% daquelas com tamanho entre 50% e 75% da área total da MT não cicatrizam espontaneamente. Observou ainda que cerca de 70% de todas as perfurações traumáticas agudas cicatrizam espontaneamente em 30 dias, independente do mecanismo de trauma, percentual este que cai para 18% nos meses subseqüentes.

Stenfors *et al.*⁵⁵ realizaram perfurações traumáticas riniformes centrais e marginais nos quadrantes posteriores da MT de gatos e ratos. Observaram cicatrização total entre nove e 11 dias nos ratos e de 12 a 14 dias nos gatos.

Na tentativa de determinar os mecanismos celulares e fatores responsáveis pela falha na cicatrização tecidual, Bankey *et al.*⁵⁶ estudaram os efeitos da hipóxia e de endotoxinas sobre a proliferação de fibroblastos. Observaram supressão significativa no índice de proliferação de fibroblastos nos meios de cultura submetidos à hipóxia e às endotoxinas.

Amoils *et al.*⁵² descreveram modelo experimental de perfuração de MT em 19 chinchilas e após seis semanas observaram ausência de cicatrização em 84% das orelhas.

Kristensen¹¹, em revisão sistemática de 500 artigos sobre perfurações traumáticas em humanos, observou uma média de cicatrização espontânea de MT de 80%. Este percentual cai para 39% quando o mecanismo

patogênico da perfuração é térmico. Segundo o autor, o tempo para cicatrização espontânea varia de uma a seis semanas.

Martin⁵⁷ e Werner e Grose³⁵, em artigos de revisão, relataram que a cicatrização envolve uma seqüência de eventos coordenados, didaticamente divididos em três fases: infiltração celular nos primeiros três dias (fase inflamatória), deposição de tecido de granulação de três a dez dias (fase proliferativa) e remodelação que se inicia após 10 dias, podendo durar meses. Segundo os autores, toda lesão tecidual é sucedida por formação de coágulo e degranulação das plaquetas que são reservatórios de citocinas e de FC. Estes agentes quimiotáticos recrutam células inflamatórias circulantes que atingem o sítio da lesão em poucos minutos. Os neutrófilos são os primeiros a chegar, seguidos dos monócitos e linfócitos, e desaparecem em poucos dias fagocitados pelos macrófagos teciduais. Estas células inflamatórias também liberam citocinas e FC implicados na fase proliferativa da cicatrização, caracterizada pela migração e proliferação de queratinócitos e fibroblastos. Estes adquirem fenótipo contrátil e transformam-se em miofibroblastos, fundamentais na contração da lesão em cicatrização. A cicatrização da ferida sinaliza a fase de remodelação, com redução na proliferação e equilíbrio entre a síntese e degradação de componentes da matriz extracelular pela ação de proteases e collagenases.

Valtonen *et al.*⁵⁸ compararam o tempo de cicatrização espontânea de perfurações realizadas nos quadrantes inferiores da MT de 18 chinchilas. Observaram que o tempo médio para cicatrização espontânea de perfurações feitas com bisturi a frio é menor do que com laser de dióxido de carbono (CO₂), sendo de 10 e 22 dias, respectivamente. Relataram que a

patência média das perfurações riniformes é maior que a das circulares, sendo de 26 e 11 dias, respectivamente.

Lorena *et al.*⁵⁹, em artigo de revisão, relataram que os miofibroblastos são os principais envolvidos na síntese da matriz extracelular. Segundo os autores, na fase de granulação uma elevada proporção destas células expressa α -actina de músculo liso. Após epitelização total do tecido a contração cessa, os miofibroblastos contendo α -actina desaparecem por apoptose e a celularidade diminui, surgindo fibroblastos maduros.

3.3 Caracterização das Perfurações de Membrana Timpânica

Taylor e McMinn⁶⁰ compararam MT de cobaias submetidas à perfuração experimental com perfurações crônicas de MT humana. Nestas observaram hiperplasia epitelial e atividade mitótica intensa na camada epitelial basal e no tecido conectivo dos bordos da perfuração. Sugerem que a falta de cicatrização espontânea não se deve à ausência de mitose e sim ao desequilíbrio entre mecanismos de proliferação e remodelação.

Somers *et al.*⁶¹ estudaram as MT de 30 pacientes consecutivos submetidos à miringoplastia por otite média crônica simples (OMCS). Observaram hiperplasia epitelial e hiperqueratose caracterizada por oito ou mais camadas celulares em 83% dos casos, com espessura média das MT de 0,11 mm a meio caminho entre o ânulus e a perfuração. A junção escamo-cúbica foi encontrada nos bordos da perfuração em 67% dos casos, medial aos bordos em 30% dos casos e lateral a estes em apenas 3%.

3.4 Modelos Experimentais de Perfuração de Membrana Timpânica

Os modelos experimentais de perfuração de MT podem ser divididos em três tipos de acordo com a metodologia empregada: uso de substâncias inibidoras da cicatrização (glutaraldeído, mitomicina C, hidrocortisona), animais geneticamente modificados (com disfunção do processo cicatricial) e modelos cirúrgicos.

Amoils *et al.*⁵² descreveram modelo cirúrgico experimental em orelhas de 19 chinchilas submetidas à perfuração circular com alça térmica, escarificação do epitélio cuboidal, incisões radiais e inversão medial dos bordos, induzindo a formação de anel epitelial fibroso. Após seis semanas, observaram perfuração da MT em 84% dos casos.

Spandow e Hellström⁶² perfuraram os quadrantes posterior e superior da MT de ratos, após o quê 21 orelhas foram tratadas com 20 µl de hidrocortisona tópica a 2% (grupo de estudo) e 11 orelhas com água destilada (grupo controle). Observaram cicatrização total em 100% das orelhas do grupo controle, entre nove e dezessete dias, e perfuração não cicatrizada após 90 dias em 33% das orelhas do grupo de estudo.

Truy *et al.*⁶³ realizaram perfuração de 80% da área das MT de 14 cães. As orelhas foram tratadas com glutaraldeído a 2% ou não receberam tratamento. Os autores observaram, entre a 3ª e a 14ª semana, cicatrização total em 100% das orelhas que não receberam tratamento e em 43% das tratadas, diferença estatisticamente significativa. Observaram 57% de perfurações não cicatrizadas, após 15 semanas, nas orelhas que receberam glutaraldeído.

Vrabec⁶⁴ comparou o tempo para cicatrização total de perfurações agudas dos quadrantes posteriores das MT de 24 ratos, divididos em três grupos: a) controle, b) diabetes tipo I (insulinopenia induzida por estreptozotocina) e c) diabetes tipo II (modificados geneticamente e com obesidade, hiperglicemia e resistência à insulina). O tempo médio para cicatrização total foi de oito, nove e 11 dias nos grupos a, b e c, respectivamente. A comparação entre os grupos mostrou diferença estatisticamente significativa, com maior tempo para cicatrização das perfurações nos ratos com diabetes tipo II.

O'Reilly *et al.*⁶⁵ realizaram perfuração total na MT de 24 ratos tratados com 0,2 mg/ml de mitomicina C (grupo de estudo) ou água destilada (grupo controle). Observaram cicatrização total em 100% das perfurações do grupo controle em 14 dias e em 92,5% das perfurações do grupo de estudo 44 dias após o procedimento, diferença significativa no retardo da cicatrização para este último.

3.5 Fatores de Crescimento

Os FC são polipeptídeos e mediadores biológicos, liberados pelo sangue ou tecido, capazes de modular a proliferação celular ao se ligarem a receptores específicos de membrana. Isto dispara uma cascata enzimática de eventos intracelulares que pode resultar em diferenciação e migração celular, síntese de componentes da matriz extracelular e angiogênese. O estímulo pode ser excitatório ou inibitório, a depender do contexto das

demais moléculas sinalizadoras. O gradiente de concentração dos FC aumenta progressivamente e, uma vez alcançada a concentração tecidual mínima, as células alvo ativadas entram em mitose^{29,33}.

Bennett e Schultz⁸ e Werner e Grose³⁵ relataram que os FC liberados pela degranulação das plaquetas e responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e linfócitos durante a fase inflamatória da cicatrização incluem: fator de crescimento derivado de plaqueta (FCDP), fator de crescimento insulina símile (FCIS), FCE e fator de crescimento transformador beta (FCT- β). Segundo os autores, ao atingirem o tecido em cicatrização, essas células tornam-se fontes importantes de fator de crescimento transformador alfa (FCT- α), FCT- β , fator de crescimento derivado de macrófago (FCDM), fator de crescimento de fibroblasto (FCF), fator de crescimento epitelial ligado à heparina (FCELH) e citocinas, responsáveis por deflagrar a fase proliferativa da cicatrização, com aumento da celularidade local às custas de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. Estas liberam FCIS, FCF, FCT- α , FCT- β , FCDP e fator de crescimento de queratinócitos (FCQ) que mantêm o estímulo proliferativo, a síntese de componentes da matriz extracelular e a neoformação vascular.

Werner e Grose³⁵ descreveram que as cinco principais famílias de FC são: FCE, FCDP, FCIS, FCT- β e FCF. A família do FCE inclui nove membros, entre eles: FCE, FCT- α , FCELH, amfirregulina, epirregulina, betacelulina, neurregulinas, epigen e proteínas codificadas por poxvírus.

3.5.1 Fator de crescimento epitelial

Savage *et al.*⁶⁶ isolaram pela primeira vez o FCE em glândulas submandibulares de camundongos adultos e descreveram-no como um polipeptídeo com 53 aminoácidos, cadeia simples e peso molecular de 6045 Da.

Starkey *et al.*⁶⁷ e Cohen e Carpenter⁶⁸ detectaram na urina humana uma citocina com propriedades imunológicas e biológicas semelhantes às do FCE de camundongos. Esta estimula o crescimento de cultura de fibroblastos humanos e de células epiteliais de córnea e promove a abertura prematura de pálpebra de camundongos neonatos. Apesar da similaridade biológica, as propriedades físicas e químicas são diferentes. O FCE humano apresenta peso molecular discretamente menor, carga negativa maior e aminoácidos diferentes do FCE de camundongo. Ambos competem pelo mesmo receptor de superfície celular e anticorpos contra o FCE de camundongos reagem de forma cruzada contra o FCE humano.

Hom³³, em artigo de revisão, observou que apesar de sua diversidade estrutural o FCE possui atividade biológica semelhante entre as diferentes espécies de mamíferos. É produzido por macrófagos, plaquetas e células epiteliais, induz a proliferação e quimiotaxia de células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e queratinócitos e a síntese de glicosaminoglicanos.

3.5.2 Bases para terapia com fatores de crescimento

Aharonov *et al.*²⁵ compararam os tempos de exposição ao FCE necessários para que ocorra: divisão celular, ligação aos seus receptores e modulação para menos dos mesmos. Observaram que, após quatro horas, a cultura de fibroblastos incubada com 60 ng/ml de FCE de camundongos tem receptores de superfície celular com 85% menos capacidade de ligação a esta citocina, fato que ocorre por redução na expressão dos receptores e não por menor afinidade dos mesmos. O pico de síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) máximo ocorre após 22 horas de exposição e a divisão celular após três dias, demonstrando a necessidade de exposição contínua ao FCE para que haja resposta biológica plena.

Buckley *et al.*²⁶ testaram o FCE de camundongos, em veículo de liberação lenta, implantado no subcutâneo de ratos. Cada animal recebeu dois discos de esponja de polivinil contendo pílulas de colesterol, metilcelulose e lactose com 10 µg/d ou 20 µg/d de FCE e duas esponjas placebo. A análise mostrou que o sistema de liberação lenta promove maior extensão e organização do tecido de granulação no sétimo dia, quantidade de colágeno formada 41% maior, percentual de DNA na área em cicatrização 100% maior e histologicamente maior celularidade e angiogênese do que o placebo.

Brown *et al.*²⁷ realizaram incisão seguida de sutura da pele do dorso de ratos e observaram que o tratamento com dose única de 10 µg de FCE não promove aumento na força de tensão das suturas em relação ao grupo que não recebe tratamento. Observaram que 50 µg de FCE veiculado em

500 µl de solução tamponada, três vezes ao dia, por cinco dias, aumenta em 35% a força de tensão das suturas em relação ao grupo controle. A quantidade residual de FCE marcado com iodo 125 (I^{125}), 24 horas após a incisão, foi de 22% quando veiculado em soro fisiológico, 23% em ácido hialurônico, 37% em lipossomos lamelares simples e 62% em lipossomos multilamelares, diferença estatisticamente significativamente para este último. O tratamento com dose única de 5 µg de FCE veiculado em lipossomos multilamelares promoveu 200% de aumento na força de tensão das suturas em relação ao grupo controle sete e 14 dias após a incisão.

Brown *et al.*³⁰, em ensaio clínico duplo-cego placebo-controlado e randomizado com 12 pacientes auto-pareados, compararam a eficácia do tratamento tópico com FCE e placebo sobre o percentual de cicatrização de áreas doadoras de enxerto de pele. Cada paciente apresentava duas áreas doadoras que foram tratadas com creme contendo 10 µg/ml de FCE ou placebo. O tempo médio para ocorrência de 75% a 100% de cicatrização da área doadora foi 1,5 dias menor para o FCE do que para o placebo, diferença que se mostrou estatisticamente significativa.

Okumura *et al.*⁶⁹ estudaram o efeito do FCE na cicatrização de feridas abertas na pele do dorso de ratos. Relataram que o FCE tópico isolado não contribui para cicatrização, porém quando associado aos inibidores de proteases (nafamostatate ou mesilato de gabexate) ou à gelatina (colágeno termodesnaturado) acelera o percentual de cicatrização de feridas abertas. A quantidade de tecido de granulação formada foi significativamente maior nos grupos que receberam FCE associado aos inibidores de proteases (três vezes

maior) ou à gelatina (duas vezes maior) do que no tratado com FCE isolado. A taxa de degradação do FCE marcado com I^{125} foi significativamente menor nos grupos em que este foi associado aos inibidores de proteases ou à gelatina.

Bennett e Schultz⁸ testaram a hipótese de tecidos em fase de cicatrização conterem pequenas quantidades de FC ativos. Compararam culturas de fibroblastos humanos divididas em quatro grupos que receberam os seguintes tratamentos: soro sanguíneo, soro coletado de ferida cirúrgica em cicatrização aguda (cicatrização por primeira intenção), soro de feridas abertas (cicatrização por segunda intenção) ou soro de feridas em cicatrização crônica. A síntese de DNA nas culturas tratadas com soro de ferida em cicatrização aguda é duas a três vezes maior do que nas tratadas com soro sanguíneo, é baixa nas feridas abertas e ausente nas feridas crônicas. Segundo os autores tais fatos ocorreram não por ausência de FC, que estão presentes em baixa quantidade nas feridas em cicatrização crônica, mais sim pela grande quantidade de proteases ativas, 125 vezes maior do que o observado no soro de feridas em cicatrização aguda.

3.5.3 Expressão dos fatores de crescimento na membrana timpânica

O'Daniel *et al.*³⁸ foram os primeiros a pesquisar a expressão de receptores para o FCE em MT de porcos. Usaram auto-radiografia, FCE não marcado e FCE marcado com I^{125} . Observaram que todas as camadas da MT possuem receptores específicos de alta afinidade para esta citocina, sendo a densidade de receptores duas vezes maior no epitélio escamoso estratificado do que a soma da densidade das demais camadas.

Mondain e Ryan³⁹ compararam a expressão do FCE em MT íntegras de cobaias com aquela de MT submetidas à perfuração no quadrante póstero-superior. Nas primeiras, o FCE está presente principalmente no ânulus, nas células epiteliais basais e no estroma. Trinta e seis horas após a perfuração, o FCE passa a ser detectado nos bordos da perfuração e sua expressão aumenta no ânulus, nas células epiteliais basais e nos polimorfonucleares. O pico máximo de expressão desta citocina ocorre três dias após a perfuração, com declínio após cinco dias.

Somers *et al.*⁴⁰ compararam a expressão de receptores para o FCE e para o FCT- β em MT de pacientes com OMCS, submetidos à timpanoplastia total, com MT normais de cadáveres removidas na íntegra nas primeiras 12 horas após a morte. A imunorreatividade para receptores do FCE é intensa nas MT normais e nas perfuradas, mesmo quando se considera a expressão nos bordos da perfuração. A reação é mais intensa na membrana basal e na camada basal do epitélio escamoso estratificado e diminui gradualmente em direção às camadas mais superficiais. Pouca ou nenhuma reatividade é observada no estroma. Já a imunorreatividade para receptores do FCT- β é nitidamente diferente entre os grupos, sendo escassa ou ausente nas MT normais e intensamente positiva nas MT perfuradas, em especial no estroma dos bordos das perfurações.

3.5.4 Tratamento de perfurações de membrana timpânica com fator de crescimento epitelial

O'Daniel *et al.*³⁸ realizaram perfuração nos quadrantes posteriores da MT de gatos e estas foram tratadas com 20 µg de FCE diluídos em 200 µl de soro fisiológico ou com 200 µl de soro fisiológico puro, até cicatrização total ou a eutanásia dos animais. As MT tratadas com FCE apresentaram histologicamente mais hiperplasia do estroma e do epitélio escamoso estratificado do que as demais. Num segundo experimento, oito MT foram submetidas à perfuração total e divididas em quatro grupos que receberam os seguintes tratamentos: dose única de 125 µg de FCE em 500 µl de hidrogel, 500 µl de hidrogel, dose única de 50 µg de FCE em 500 µl de esponja de gelatina e 500 µl de esponja. O percentual de área cicatrizada após seis dias foi de 95% para as MT tratadas com FCE em hidrogel ou em esponja de gelatina e de 85% para as MT tratadas com hidrogel ou esponja puros.

Amoils *et al.*³¹ realizaram perfurações de cerca de 50% na MT de 16 chinchilas. As perfurações de MT que não cicatrizaram de seis a oito semanas foram submetidas à remoção do anel epitelial fibroso, recobertas com papel e esponja de gelatina e tratadas com de 25 µl de solução com 1 mg/ml de FCE ou 25 µl de soro fisiológico, três doses em dias alternados. Após oito semanas, os autores observaram cicatrização total das perfurações em 81% das orelhas tratadas e em 25% das orelhas controle.

Lee *et al.*³² usaram o mesmo protocolo experimental de Amolis *et al.*³¹, porém sem remoção do anel epitelial fibroso dos bordos da perfuração e aplicaram o FCE sobre a esponja de gelatina posicionada em contato direto

com a MT. As orelhas de 15 chinchilas foram tratadas com a mesma concentração e dosagem citada por Amolis *et al.*³¹. Houve cicatrização total das perfurações em 80% das orelhas tratadas e em 20% das orelhas controle. Num segundo experimento com 16 chinchilas, concentrações 50% e 75% menores do que a anterior foram testadas. As perfurações foram tratadas com 25 µl de solução com 0,5 mg/ml de FCE ou 25 µl de solução com 0,25 mg/ml de FCE. Os autores observaram cicatrização total em 75% e 87% das orelhas tratadas, respectivamente.

Dvorak *et al.*⁴¹ testaram a hipótese de que perfurações de MT apresentam maior percentual de cicatrização total em chinchilas submetidas a tratamento prolongado com FCE. Das 102 orelhas submetidas à perfuração de MT semelhante ao descrito por Amolis *et al.*³¹, 32 orelhas apresentaram perfurações não cicatrizadas após oito semanas, 20 foram descartadas por óbito e 50 por cicatrização. As orelhas foram tratadas por seis semanas com três doses semanais de 50 µl de solução contendo 0,25 mg/ml de FCE ou 50 µl de soro fisiológico. Estas foram aplicadas sobre esponja de gelatina em contato direto com a MT como descrito por Lee *et al.*³². Houve cicatrização total em 100% das orelhas tratadas e em 80% das orelhas controle, com tempo médio de cicatrização de 3,4 e 3,3 semanas, respectivamente.

Ramsay *et al.*⁴² testaram o FCE em ensaio clínico com 16 pacientes com OMCS e um com perfuração após trauma. As perfurações foram recobertas com papel e esponja de gelatina e tratadas com duas aplicações de 0,5 ml de solução contendo 0,25 mg/ml de FCE ou 0,5 ml de soro fisiológico por uma semana. Após 30 dias de seguimento o código *placebo-vero* foi quebrado,

sendo oferecida aos pacientes com perfurações não cicatrizadas a possibilidade de tratamento com FCE ou miringoplastia. Oito pacientes receberam tratamento adicional. Os autores observaram cicatrização total em um paciente do grupo controle e em nenhum do grupo de estudo. Nos grupos de estudo e controle o tamanho percentual das perfurações foi 7,7% e 14,9% antes do tratamento, 7,4% e 12,2% depois do tratamento e a diminuição média no tamanho das perfurações foi de 0,3% e 2,7%, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Chauvin *et al.*⁷⁰ distribuíram as MT de sete cobaias, com 90% de área perfurada, em quatro grupos de tratamento: 1 mg de ácido hialurônico diluído em 0,1 ml de vasocidina, 0,4 µg de FCF em 0,1 ml de vasocidina, 1 µg de FCE em 0,1 ml de vasocidina e 0,1 ml de vasocidina (controle). As MT foram tratadas uma vez por semana até que ocorresse cicatrização ou por 32 dias, tempo esperado para realizar a eutanásia. Houve cicatrização total das perfurações em 100% das orelhas tratadas com ácido hialurônico e FCE após 21 dias. As orelhas tratadas com FCF e as do grupo controle tiveram 86% e 64% de cicatrização após 32 dias. Os três grupos de tratamento cicatrizaram mais rápido que o controle.

Güneri *et al.*⁷¹ realizaram perfuração no quadrante póstero-superior da MT de 30 ratos aleatoriamente divididos em quatro grupos de tratamento: 10 µl de solução contendo ácido hialurônico a 1%, 400 µg/ml de FCE, 2 mg/ml de mitomicina C ou que não recebeu tratamento. As MT foram tratadas diariamente até cicatrização total ou eutanásia. O tempo médio para cicatrização total foi de 8,8 dias no grupo tratado com ácido hialurônico, 7,4 dias com

FCE e 15 dias nas MT que não receberam tratamento. O grupo mitomicina C não apresentou cicatrização após 60 dias de observação. O tempo para cicatrização foi menor para orelhas tratadas com ácido hialurônico e FCE em comparação com as orelhas não tratadas.

3.6 Drogas Indutoras do Fluxo Sanguíneo

Os fármacos hemorreológicos têm sido classicamente usados para intensificar a perfusão e a cicatrização em tecidos isquêmicos. A pentoxifilina é uma metilxantina com estas propriedades. Apesar de amplamente usada pelos benefícios comprovados como droga vasodilatadora periférica, ganhou interesse pela descoberta de efeitos farmacológicos antiinflamatório e imunomodulador, antes desconhecidos^{72,73,74,75}.

Ward e Clissold⁴³, em artigo de revisão, citam que os efeitos farmacodinâmicos primários da pentoxifilina incluem o aumento do fluxo sanguíneo e da tensão de oxigênio tecidual por modificação das características hemorreológicas do sangue. A pentoxifilina atua como inibidor não específico da fosfodiesterase, enzima celular que converte o adenosina monofosfato cíclico (AMPc) em adenosina monofosfato (AMP). O aumento da deformidade eritrocitária induzida pelo fármaco ocorre por aumento do adenosina trifosfato (ATP) e de outros nucleotídeos cíclicos. A redução na viscosidade sanguínea e plasmática ocorre por diminuição na concentração de fibrinogênio plasmático, tanto por aumento da atividade fibrinolítica como por diminuição na produção de fibrinogênio. A inibição da agregação

plaquetária ocorre por estímulo da endoperoxidade que converte o ácido aracdônico em prostaciclina (anti-agregante plaquetário) na parede dos vasos e por aumento do AMPc que inibe a ciclo-oxigenase diminuindo a síntese de tromboxano A2 e prostaglandinas (indutores da agregação plaquetária).

Nemiroff⁴⁴ investigou a viabilidade de retalhos cutâneos confeccionados na pele do dorso de 60 ratos tratados com oxigênio hiperbárico associado ou não à pentoxifilina. Os ratos foram divididos em quatro grupos: a) controle que recebeu soro fisiológico, b) pentoxifilina, c) oxigênio hiperbárico e d) pentoxifilina com oxigênio hiperbárico. A pentoxifilina foi administrada nos grupos b e d na dose de 20mg/kg/d, por via intra-peritoneal, 24, 12 e uma hora antes da confecção do retalho e a cada 12 horas nos sete dias que sucederam o mesmo. O soro fisiológico intra-peritoneal foi administrado na mesma seqüência nos grupos a e c. O oxigênio hiperbárico a 100% foi usado nos grupos c e d durante duas horas, a cada oito horas nos primeiros dois dias após a confecção do retalho e a cada 12 horas nos quatro dias seguintes. Os autores observaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao comprimento médio de retalho viável. Este foi menor no grupo que recebeu soro fisiológico, semelhante nos grupos que receberam pentoxifilina e oxigênio hiperbárico isoladamente e maior no grupo que recebeu a associação dos dois últimos tratamentos.

Berman e Duncan⁷² trataram com pentoxifilina culturas de fibroblastos obtidos a partir da derme humana normal. Observaram inibição dose-dependente da síntese de fibroblastos, redução da produção de colágeno,

fibronectina e glicosaminoglicanos (componentes da matriz extracelular) e aumento significativamente da produção de colagenase.

Armstrong *et al.*⁴⁵, em estudo clínico cruzado duplo-cego com 10 porcos, avaliaram a perfusão e a viabilidade de retalhos miocutâneos nos flancos. Os porcos foram divididos em dois grupos que receberam: a) 400 mg de pentoxifilina, por via oral a cada oito horas por uma semana antes e depois da confecção do retalho, sendo, após uma semana de “wash-out”, repetida a mesma posologia com placebo; b) o mesmo tratamento em ordem inversa. Trinta minutos após o procedimento, a perfusão e o fluxo sanguíneo medidos no retalho mostraram-se maiores nos animais tratados com pentoxifilina do que com placebo. A área média de necrose no sétimo dia de pós-operatório foi 39,7 cm² para o placebo e 30,1 cm² para a pentoxifilina.

Gilhar *et al.*⁷³ realizaram estudo experimental *in vitro* e *in vivo* e demonstraram que a pentoxifilina inibe de modo dose-dependente a proliferação de queratinócitos em cultura de pele normal nas primeiras 48 a 96 horas de tratamento. A aplicação tópica da pentoxifilina em enxertos de pele normal de camundongos reduziu significativamente a espessura da epiderme e a taxa proliferativa dos enxertos, demonstrando seu efeito antiinflamatório.

Lim *et al.*⁴⁷ avaliaram os efeitos da pentoxifilina em perfurações agudas de MT. Cinquenta cobaias adultas foram submetidas à perfuração com área de 1 mm por 2 mm nos quadrantes anteriores ao martelo em 98 orelhas e nos quadrantes posteriores em duas orelhas. Os animais receberam, por 14 dias, soro fisiológico ou pentoxifilina na dose de 20 mg/kg, por via intra-peritoneal, a

cada 12 horas. Nenhuma diferença foi observada entre os dois grupos quanto ao número de perfurações cicatrizadas ou quanto ao tamanho das perfurações residuais após o período de observação.

Jull *et al.*⁴⁶ realizaram revisão sistemática com o objetivo de quantificar os efeitos da pentoxifilina no tratamento de úlceras venosas de perna e compará-los ao placebo ou a outras terapias. Dos 18 estudos levantados, apenas nove se encaixaram nos critérios de ensaios clínicos randomizados. A análise dos ensaios que compararam a pentoxifilina com o placebo, com ou sem terapia complementar, mostrou que essa é mais efetiva quando se considera a cicatrização total ou a melhora significativa da úlcera.

Stosic-Grujicic *et al.*⁷⁴ e Raetsch *et al.*⁷⁵ investigaram os efeitos da pentoxifilina sobre mediadores pró-inflamatórios teciduais e observaram que a mesma reduz significativamente a quantidade média de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (FNT) e o interferon gama (INF- γ), a quantidade de pró-colágeno tipo I e de fatores fibrinogênicos, como o FCT- β e o fator de crescimento do tecido conectivo (FCTC), sugerindo modulação para menos na produção dos mesmos.

4 MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob protocolo de pesquisa n° 853/04 (Anexo A). O estudo experimental foi realizado em concordância com o manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório⁷⁶.

4.1 Material

4.1.1 Seleção dos animais

Foram estudadas chinchilas (*C. lanígera*) obtidas a partir de criadores especializados⁽¹⁾ e mantidas pelo próprio criador. Os animais foram alojados em gaiolas individuais e receberam água a vontade, ração peletizada uma vez ao dia e uma porção de alfafa três vezes por semana.

O experimento foi realizado no Laboratório de Investigação Médica (LIM – 32) da FMUSP. A pesquisa foi financiada por verba de Auxílio à Pesquisa, aprovada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo n° 02/08285-0 (Anexo B).

⁽¹⁾ CHILLÁN – Criação de Chinchilas, Reprodutores e Matrizes, e ACHILA – Associação Brasileira de Criadores de Chinchilas

4.1.1.1 Critérios de seleção

Foram inicialmente selecionados 50 animais adultos jovens e saudáveis, de ambos os sexos, com idade entre sete e vinte meses e peso entre 400 g e 800 g. Excluímos animais com infecção da orelha externa ou média, fêmeas gestantes e portadores de malformações congênitas.

Todos os animais foram submetidos a procedimento para criar perfurações de MT em ambas as orelhas.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos animais

Cada animal selecionado foi identificado com dispositivo numerado grampeado na orelha externa. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas previamente a cada procedimento anestésico.

4.2.2 Protocolo anestésico

A indução anestésica foi feita com o animal sob contenção e colocado em decúbito ventral. A pele do dorso torácico foi tracionada e os anestésicos foram aplicados por via subcutânea utilizando-se agulha e seringa de insulina. A anestesia geral foi induzida com xilazina a 2% (3 mg/kg) seguida de quetamina (17 mg/kg).

4.2.3 Protocolo cirúrgico

Os animais foram posicionados sobre a mesa cirúrgica, em decúbito lateral direito ou esquerdo a depender da orelha sob intervenção e recobertos por campo estéril.

O procedimento foi realizado do início ao término sob visão endoscópica, utilizando-se endoscópio rígido com ângulo de visão de 30° e 2,7 mm de diâmetro⁽²⁾.

A área total da MT foi calculada usando um molde de silicone de 0,5 mm de espessura⁽³⁾, confeccionado no formato da membrana de forma a recobrir toda a superfície da mesma (Figura 1).

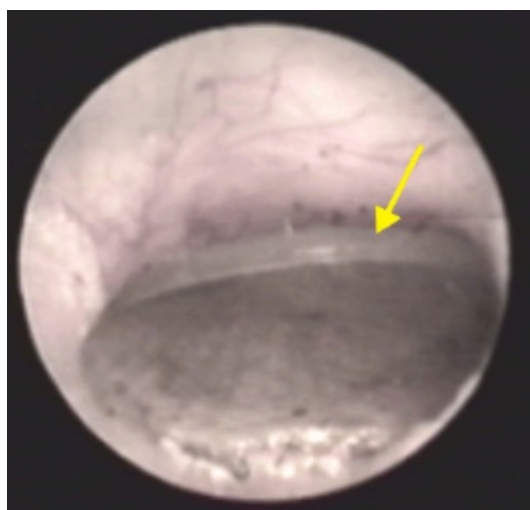


Figura 1 - Molde de silicone posicionado sobre a MT e ocupando toda sua superfície (seta)

A perfuração foi padronizada para todos os animais em formato e em tamanho, correspondendo a 50% da área total da MT. A padronização foi

(2) Endoview®

(3) Xomed Surgical Products® - Jacksonville

feita a partir da confecção de um segundo molde, em formato semi-elíptico, correspondendo à metade da área total do primeiro molde de silicone (Figura 2).

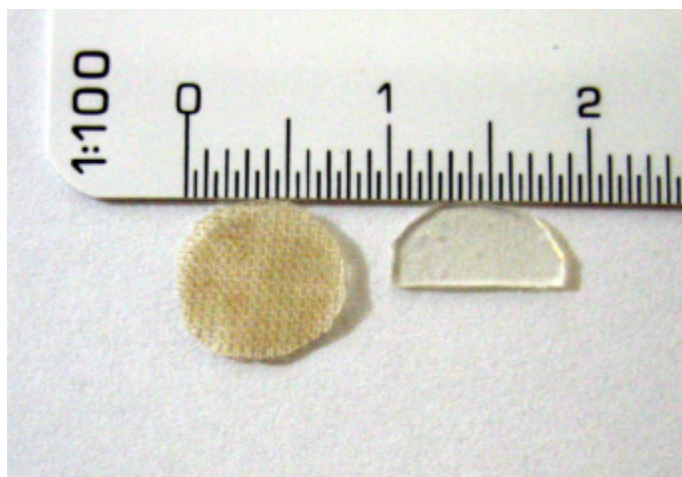


Figura 2 - Molde de silicone equivalente à área total da MT (à esquerda) e molde de perfuração (à direita)

Um eletrodo reto, com ponta tipo agulha e 0,3 mm de diâmetro, foi angulado 90° na sua extremidade distal e recoberto com fita isolante líquida⁽⁴⁾, deixando ativa apenas a sua ponta.

O molde de perfuração foi posicionado sobre os quadrantes inferiores da MT (Figura 3). A miringotomia foi realizada nos limites do molde utilizando-se a energia térmica do eletrodo acoplado ao bisturi eletrônico⁽⁵⁾ ajustado em 15 W de potência (Figura 4). A MT remanescente foi submetida a cinco incisões perpendiculares ao ânulus. As ilhas de tecido tiveram seus bordos medializados e cauterizados de encontro à camada interna (Figura 5).

⁽⁴⁾ Quimatic®

⁽⁵⁾ EMAI BP-100®

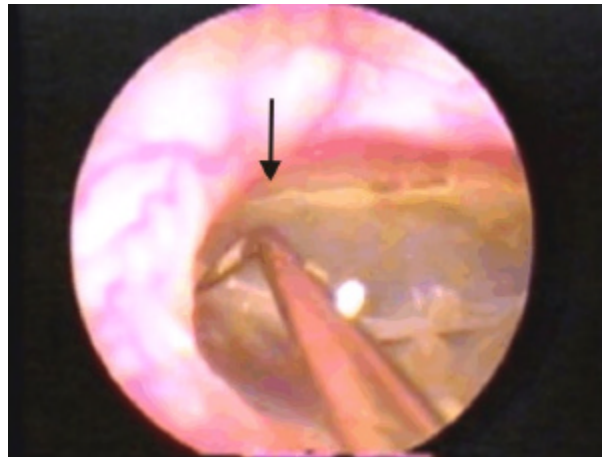


Figura 3 - Molde de perfuração posicionado sobre os quadrantes inferiores da MT (seta)



Figura 4 - Miringotomia realizada nos limites do molde com eletrodo de ponta angulada

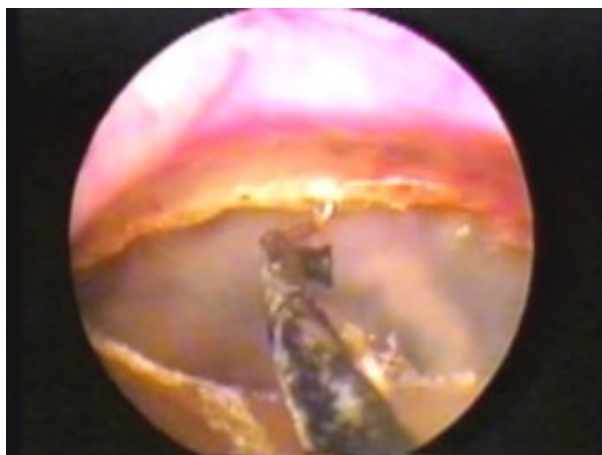


Figura 5 - Medialização e cauterização dos bordos da MT após miringotomia

4.2.4 Documentação das perfurações de membrana timpânica

A documentação das imagens foi feita durante todo procedimento para criar a perfuração da MT, imediatamente antes do início do tratamento e 30 dias após o mesmo.

As imagens foram obtidas usando micro-câmera⁽⁶⁾ e endocoupler (22 mm) acoplado ao endoscópio, e foram gravadas em fitas de vídeo usando aparelho de vídeo⁽⁷⁾ (Figura 6). O sistema de video-captura através de placa⁽⁸⁾ foi usado para aquisição das imagens, que foram importadas para um programa gráfico⁽⁹⁾. Este permitiu a sobreposição de figuras geométricas às mesmas e o cálculo da área total da MT e da perfuração, que foram expressas em unidades quadradas (u^2) (Figura 7).

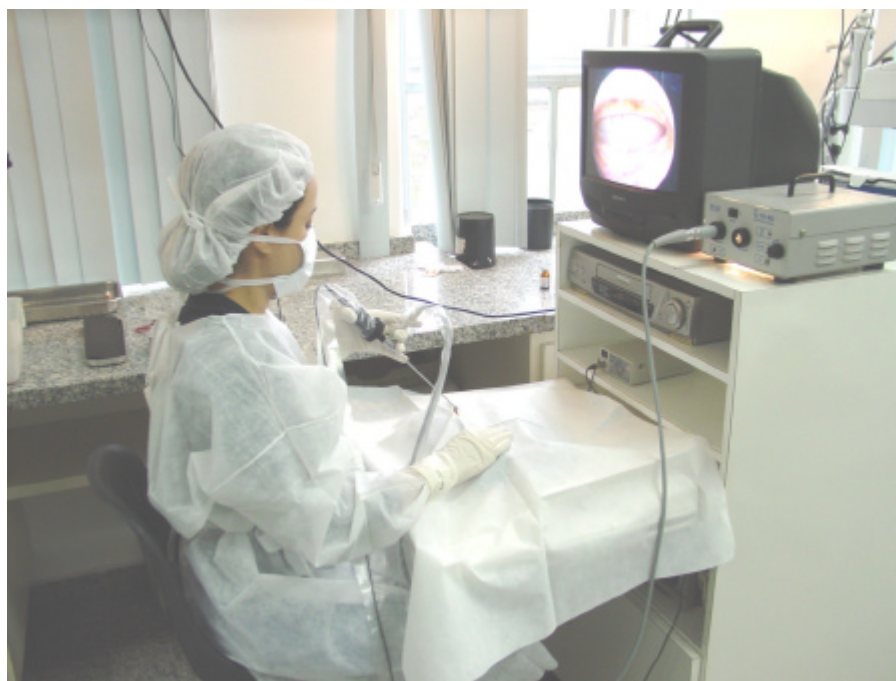


Figura 6 - Sistema de video-imagem usado na captura das imagens

- (6) Sony DXC – Ls1[®]
- (7) Panasonic Super Drive – VHS[®]
- (8) PixelView Play TV USB Pro[®]
- (9) Autocad R14[™]

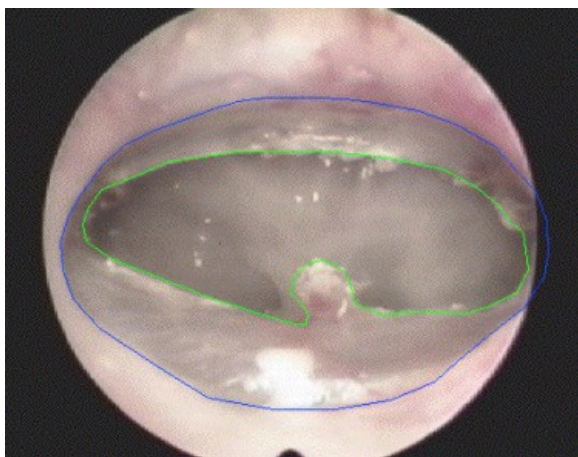


Figura 7 - Cálculo das áreas da MT (azul) e da perfuração (verde) em u^2

4.2.5 Pós-operatório

Após o procedimento, os animais ficaram em observação por uma hora, sob colchão térmico para controle da hipotermia. Foram devolvidos para suas gaiolas após bem acordados e com débito urinário presente. Não foi realizada administração de analgésicos no período pós-operatório.

A profilaxia contra infecções foi feita com enrofloxacina (comprimido de 50 mg). O antibiótico foi triturado e diluído em 10 ml de água filtrada para se obter solução concentrada de 5 mg/ml. A administração foi feita nos primeiros cinco dias de pós-operatório, por via oral, na dose de 5 mg/kg/d. Esta administração profilática foi repetida durante o protocolo de tratamento das perfurações, nos primeiros dez dias de tratamento.

4.2.6 Protocolo de análise histológica

Oito chinchilas foram aleatoriamente selecionadas para análise histológica de ambas as MT 30 dias após o procedimento de perfuração, sendo novamente anestesiadas e submetidas à dissecação de suas MT. Estas foram analisadas histologicamente através de coloração pela hematoxilina-eosina (HE) e de imuno-histoquímica (IH), para descrição semi-quantitativa do epitélio e do estroma.

4.2.6.1 Procedimento de retirada do material

Os animais foram colocados em decúbito ventral e submetidos à incisão inter-auricular na pele da região correspondente à porção dorsal das bulas dos ossos temporais, via de acesso cirúrgico utilizada para abertura das orelhas médias. As bulas foram expostas após dissecação do tecido subcutâneo e afastamento dos músculos e fáscias subadjacentes. A abertura das bulas foi feita usando uma broca de diamante com 8,3 mm de comprimento e 2,6 mm de diâmetro⁽¹⁰⁾ acoplada a micro-motor elétrico⁽¹¹⁾ para criar um orifício circular de cerca de 5 mm de diâmetro. As orelhas médias e meatos acústicos externos foram preenchidos com formol tamponado a 10% para fixação do tecido *in loco*. Os animais foram sacrificados e suas bulas dissecadas e imersas no formol.

⁽¹⁰⁾ ISO-N° 040 – Meisinger®

⁽¹¹⁾ 405N – Dentec®

4.2.6.2 Técnica de preparo do material

Pela técnica de micro-dissecção, as MT foram desinseridas das bulas na íntegra, mantendo-se a lâmina óssea delgada na qual se inseriam. Cada amostra, devidamente identificada, foi fixada em formol tamponado por 24 horas, sendo em seguida descalcificada por imersão em solução contendo etileno diamino tetra acetato (EDTA) a 5%, sempre num volume 40 vezes maior que o do tecido com troca a cada três dias até completar duas semanas, tempo necessário para que o tecido atinja o ponto de corte.

Todas as amostras foram processadas por técnico do Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da FMUSP. Um corte longitudinal foi feito, em todas as MT, na linha do manúbrio do martelo, seguindo o diâmetro crânio-caudal, com uma lâmina reta nº11, expondo os bordos da perfuração ou sua porção central. As amostras foram lavadas em água corrente por 18 horas, desidratadas em seis banhos gradativos de álcool a 70% e a 100%, diafanizadas em xilol e impregnadas em parafina para inclusão em blocos. As peças foram submetidas a cortes longitudinais ao plano coronal com 4 µm de espessura, usando um micrótomo⁽¹²⁾. Estes foram transferidos para lâminas de vidro, colocados em estufa a 60°C por uma hora para secagem, desparafinados e hidratados com banhos sucessivos de xilol, álcool e água num processo inverso ao anterior (Anexo C). Em seguida as lâminas foram submetidas à coloração.

⁽¹²⁾ RM2125RT – Leica®

4.2.6.3 Estudo imuno-histoquímico

Este tipo de estudo utilizou o anticorpo primário anti-actina- α de músculo liso⁽¹³⁾ que reage com a isoforma α da actina de músculo liso expressa por miofibroblastos durante a contração de todo tecido em fase de cicatrização⁵⁹. A IH foi realizada pela Divisão de Patologia do Laboratório Cardoso de Almeida (Anexo E).

4.2.6.4 Avaliação histológica das lâminas

Os cortes histológicos corados foram observados por um patologista do Laboratório Cardoso de Almeida que utilizou microscópio óptico⁽¹⁴⁾. As lâminas foram examinadas inicialmente em aumento panorâmico para identificação de todos os campos e a seguir em aumentos de 200 e 400X. As análises semi-quantitativas determinaram os seguintes parâmetros morfológicos do epitélio e do estroma da MT:

- a) espessura do epitélio;
- b) intensidade do infiltrado inflamatório;
- c) caracterização dos fibroblastos (jovens ou maduros);
- d) contagem de células inflamatórias no estroma (presença de neutrófilos, macrófagos e linfócitos);
- e) vascularização;
- f) presença de miofibroblastos no estroma.

⁽¹³⁾ Clone 1A4 da classe IgG2a – Dako®

⁽¹⁴⁾ Standard – Zeiss®

Estes parâmetros, com exceção do item “c”, foram categorizados em escala de zero a três cruces (0 a 3+), sendo 0+ = ausente, 1+ = leve, 2+ = moderado e 3+ = acentuado.

4.2.7 Protocolo de tratamento

4.2.7.1 Critérios de inclusão e exclusão

Decorridos 30 dias, os animais dos quais pelo menos uma orelha apresentou cicatrização inferior a 10% do percentual de área perfurada (%AP) inicial foram incluídos no protocolo de tratamento (Figura 8). Foram excluídas as orelhas com infecção.

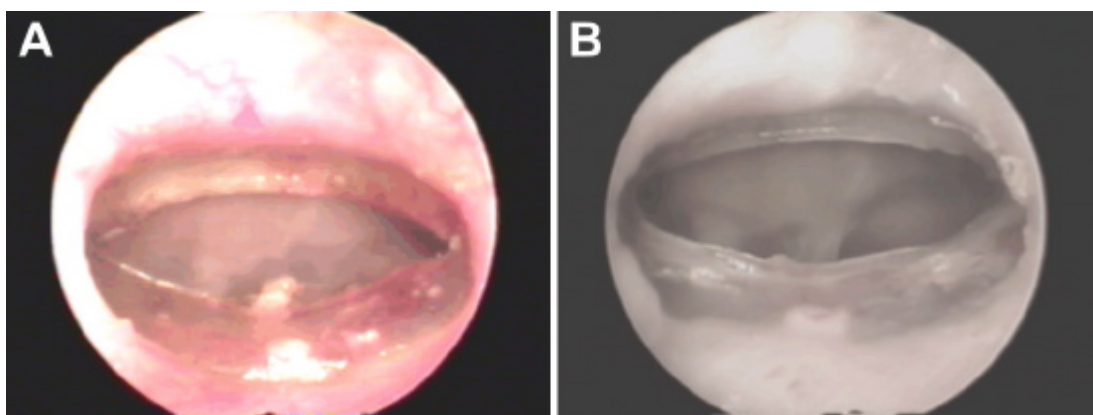


Figura 8 - MT perfurada no dia (A) e 30 dias (B) após o procedimento de perfuração, cicatrização inferior a 10%

4.2.7.2 Grupos de estudo

As orelhas selecionadas para esta fase foram, sob aleatorização estratificada, inicialmente alocadas para receber ou não pentoxifilina e depois para receber ou não FCE. Constituíram-se os seguintes grupos de estudo:

- a) Grupo controle: submetido à administração tópica de água destilada;
- b) Grupo FCE: submetido à administração tópica de FCE;
- c) Grupo pentoxifilina: submetido à administração de pentoxifilina por via oral e água destilada tópica;
- d) Grupo FCE + pentoxifilina: submetido à administração tópica de FCE e pentoxifilina por via oral.

4.2.7.3 Tratamento das perfurações de membrana timpânica

O FCE⁽¹⁵⁾ foi reconstituído no frasco original usando 0,5 ml de água destilada e foi centrifugado⁽¹⁶⁾ por 60 segundos na velocidade de 13000 rpm. O conteúdo foi dividido em oito alíquotas mantidas a menos 20°C, conforme orientação do fabricante. Imediatamente antes da aplicação, a alíquota foi descongelada a temperatura ambiente e diluída em água destilada de forma a se obter solução de FCE na concentração de 0,25 mg/ml.

A pentoxifilina (drágea de 400 mg) foi triturada e diluída usando 20 ml de água destilada para se obter solução com concentração final de 20 mg/ml.

Os animais selecionados para tratamento foram anestesiados e, sob visão endoscópica, um fragmento de esponja estéril de gelatina

⁽¹⁵⁾ Serotec Product® – Biogen Ltda.

⁽¹⁶⁾ Centrifuge 5415D – Eppendorf AQ®

absorvível⁽¹⁷⁾, confeccionado de acordo com o molde da MT, foi posicionado de forma a ocupar toda a superfície remanescente da mesma (Figura 9).

As soluções tópicas contendo 25 µl de água destilada ou 25 µl de FCE foram aplicadas sobre a esponja usando micropipeta de volume fixo de 25 µl⁽¹⁸⁾ (Figura 10). Cada orelha foi submetida a três aplicações, uma a cada 72 horas, e dez dias após a aplicação inicial a esponja foi removida. A administração da pentoxifilina foi feita na dose de 20 mg/kg/d, por via oral, a cada 12 horas, por dez dias consecutivos, durante o mesmo período em que foram aplicadas as soluções tópicas.

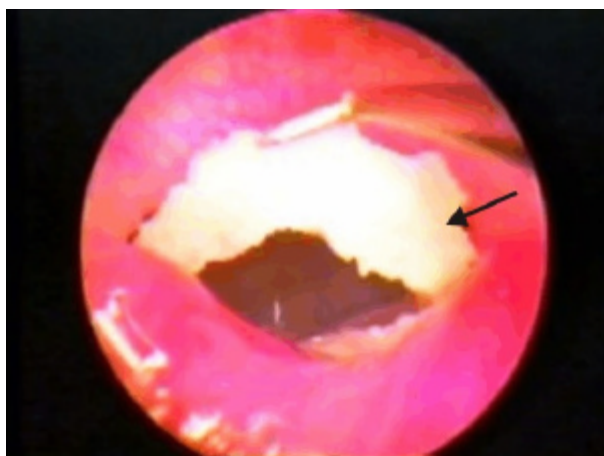


Figura 9 - Esponja de gelatina (seta) sendo colocada sobre a MT remanescente

⁽¹⁷⁾ Gelfoam® – Pharmacia Brasil Ltda.

⁽¹⁸⁾ Acura – Socorex® – Cral Ltda.

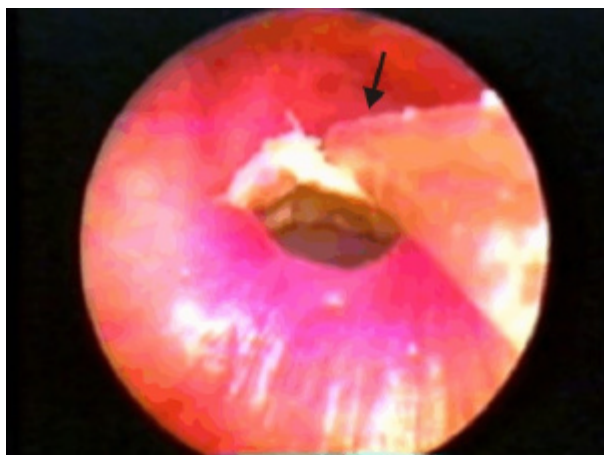


Figura 10 - Ponteira da micropipeta (seta) usada na aplicação das soluções tópicas

4.3 Eutanásia

A eutanásia foi feita com os animais alojados em uma câmara de CO₂, por período não inferior a dez minutos⁷⁷. Após a morte, os animais foram desprezados em lixo hospitalar.

4.4 Variáveis Mensuradas

4.4.1 Efeito final do tratamento na cicatrização da membrana timpânica

O efeito final do tratamento sobre as MT foi classificado em:

a) cicatrização ausente: quando o %AP de MT no início e 30 dias após o tratamento apresentou diferença inferior a 10% da área inicial;

b) cicatrização parcial: quando o %AP de MT no início e 30 dias após o tratamento apresentou diferença igual ou superior a 10% da área inicial, sem cicatrização total;

c) cicatrização total: quando não se observou perfuração após 30 dias.

4.4.2 Percentual de área perfurada de membrana timpânica antes e depois do tratamento

A área perfurada foi calculada em u^2 , dividida pela área total da MT também calculada em u^2 e multiplicada por 100 para determinarmos o %AP (Figura 11). Esta variável foi mensurada em cada orelha no início do protocolo de tratamento e 30 dias após o mesmo.

$$\%AP = \frac{\text{área perfurada (u}^2\text{)} \times 100}{\text{área total da MT(u}^2\text{)}}$$

Figura 11 - Cálculo do %AP

4.4.3 Percentual de cicatrização da perfuração de membrana timpânica

Do %AP da MT no início do tratamento, subtraiu-se o %AP 30 dias após o início do tratamento, determinando-se o percentual de cicatrização da perfuração de MT em um mês (Figura 12).

$$\text{Percentual de cicatrização da perfuração de MT} = \%AP \text{ no início} - \%AP \text{ 30 dias após o tratamento}$$

Figura 12 - Cálculo do percentual de cicatrização da perfuração de MT

4.5 Análise Estatística

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com o auxílio de programa estatístico⁽¹⁹⁾, empregando dados obtidos em estudo-piloto realizado com 18 animais. Assumimos um erro do tipo I de 5%, um erro do tipo II de 20% e consideramos significativa uma diferença no percentual de cicatrização entre os grupos de pelo menos 50%.

Os dados obtidos no estudo foram digitados em uma planilha eletrônica⁽²⁰⁾. Inicialmente foi feita a checagem de consistência dos dados para correção de erros de digitação. As variáveis qualitativas foram descritas por meio de sua frequência e as quantitativas por meio de suas médias e desvios-padrão. A comparação entre os grupos com relação ao efeito final do tratamento na cicatrização da MT foi feita por meio do teste exato de Fisher. A comparação das médias dos vários grupos foi realizada pela análise de variância com um fator (“one-way” ANOVA), com comparação “post-hoc” dos grupos dois a dois pelo teste de Bonferroni. Admitiu-se nível de significância estatística de $p \leq 0,05$. A análise estatística foi realizada com uso de programa estatístico⁽²¹⁾.

⁽¹⁹⁾ Graph Pad Stat Mate™ – versão 2.0

⁽²⁰⁾ Microsoft Excel™

⁽²¹⁾ STATA™ – versão 8.0

5 RESULTADOS

5.1 Análise Histológica

Das 16 orelhas (oito animais) submetidas à análise histológica, duas foram perdidas durante a dissecação da MT e 14 foram efetivamente avaliadas histologicamente. A análise histológica das lâminas mostrou na quase totalidade dos casos que as MT após 30 dias apresentavam características inflamatórias crônicas e agudas coexistentes. Dentre as características crônicas, identificamos a migração de fibroblastos, porém com miofibroblastos ausentes na maioria das lâminas (Figura 13) com exceção de duas (Figura 14). As características agudas observadas em algumas lâminas foram presença de infiltrado inflamatório, aumento de vascularização e presença de leucócitos, em especial os neutrófilos (Figuras 15 e 16) (Tabela 1).

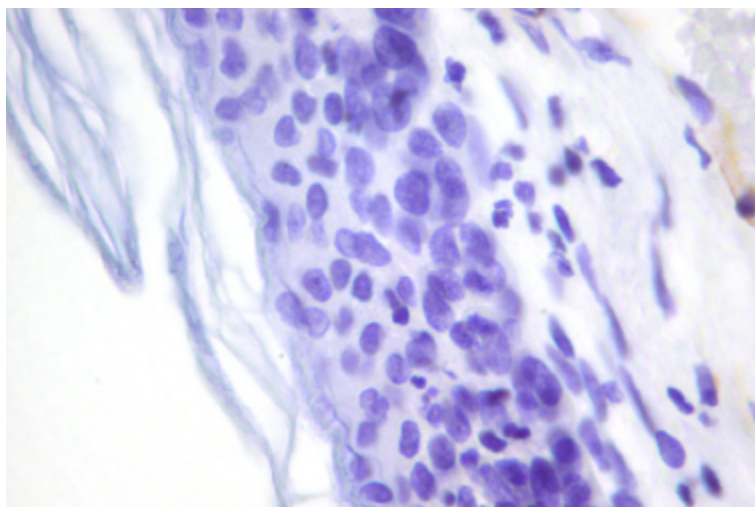


Figura 13 - Estroma da MT não corado pela imuno-histoquímica, sugerindo lesão crônica pela ausência de miofibroblastos (reação de IH anti-actina- α de músculo liso, aumento aproximado de 200X)

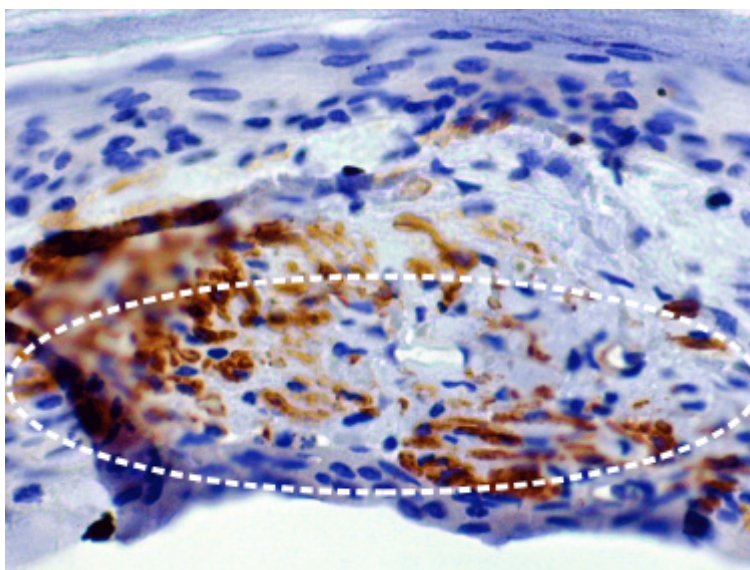


Figura 14 - Miofibroblastos corados em tons de cobre (elipse), no estroma da MT, indicando cicatrização e perfil contrátil do tecido (reação de IH anti-actina- α de músculo liso, aumento aproximado de 200X)

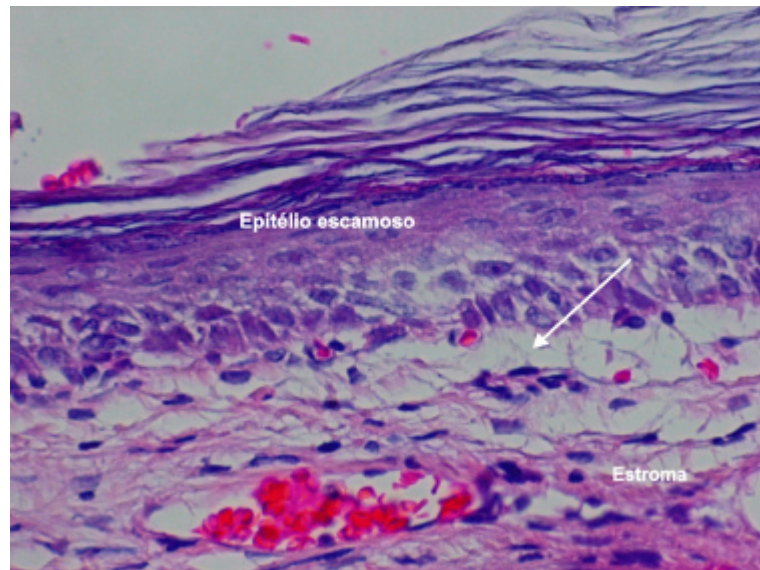


Figura 15 - Processo inflamatório na MT com edema infra-epitelial e destacamento do epitélio do estroma subjacente (seta) (coloração pela HE, aumento aproximado de 200X)



Figura 16 - Processo inflamatório subagudo na MT com vaso capilar ectásico, leucócitos marginais e intersticiais (coloração pela HE, aumento aproximado de 200X)

Tabela 1 - Análise histológica das perfurações de MT

Amostra	%AP	Espessura do epitélio	Inflamação	Fibroblastos do estroma	Miofibroblastos	Neutrófilos	Linfócitos	Macrófagos	Vascularização
13 OD	50%	3+	2+	M	3+	2+	0	0	3+
14 OD	0%	2+	2+	M	2+	2+	0	0	3+
19 OD	30%	1+	1+	M	0	1+	0	0	1+
19 OE	30%	2+	2+	J	0	2+	1+	0	2+
22 OD	50%	1+	2+	J	0	3+	0	0	2+
22 OE	50%	3+	1+	J	0	1+	0	0	1+
23 OD	50%	2+	2+	M	0	1+	2+	0	1+
23 OE	50%	1+	1+	M	1+	0	1+	0	2+
24 OD	30%	3+	1+	M	0	1+	1+	0	2+
24 OE	10%	2+	1+	M	0	1+	0	0	2+
25 OD	50%	2+	1+	J	0	1+	0	0	2+
25 OE	50%	3+	1+	J	0	1+	1+	0	2+
26 OD	40%	2+	2+	J	0	2+	0	0	2+
26 OE	50%	1+	2+	J	0	2+	0	0	2+

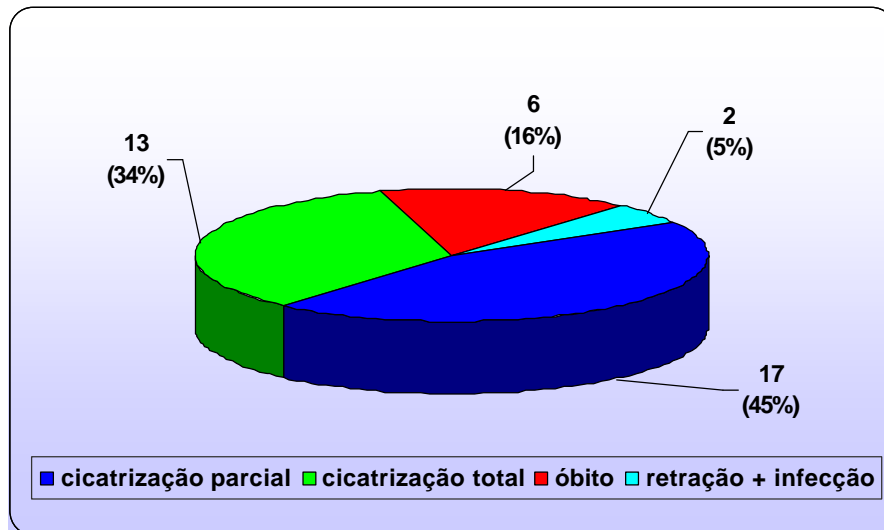
%AP: percentual de área perfurada; OD: orelha direita; OE: orelha esquerda; J: jovens; M: maduros

5.2 Análise do Tratamento

A amostra inicial foi constituída por 42 animais (84 orelhas) submetidos a procedimento padronizado para criação de perfuração bilateral de MT.

Decorridos 30 dias do procedimento para perfuração da MT, 38 orelhas (45,2%) foram excluídas por cicatrização parcial ou total da perfuração, por retração cicatricial excessiva com MT residual escassa e infecção, ou por óbito dos animais durante a indução anestésica (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Número e percentagem de orelhas excluídas 30 dias após a perfuração

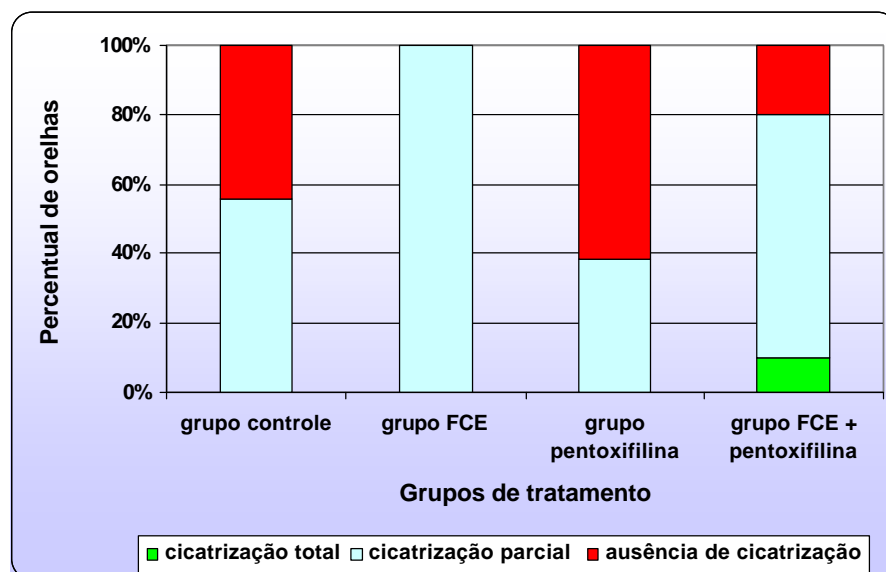


A amostra final foi constituída pelas 46 (54,8%) das orelhas iniciais que possuíam perfuração de MT com cicatrização inferior a 10% após 30 dias e foram incluídas no protocolo de tratamento. Durante esta etapa, três animais foram perdidos por óbito na indução anestésica e, portanto, seis orelhas foram excluídas da análise dos dados. As 40 orelhas restantes foram distribuídas entre os grupos de tratamento da seguinte maneira: nove no grupo controle, oito no grupo FCE, 13 no grupo pentoxifilina e 10 no grupo FCE + pentoxifilina.

5.2.1 Efeito final do tratamento

Como podemos observar no Gráfico 2, houve cicatrização total da perfuração em apenas uma (10%) orelha do grupo FCE + pentoxifilina. Neste mesmo grupo observamos cicatrização parcial em sete (70%) orelhas e ausência de cicatrização em duas (20%) orelhas. As oito (100%) orelhas do grupo FCE apresentaram cicatrização parcial, o que aconteceu em cinco (55%) orelhas do grupo-controle e em cinco (38,5%) orelhas do grupo pentoxifilina. A diferença observada na distribuição dos resultados mostrou-se estatisticamente significativa ($p = 0,007$).

Gráfico 2 - Efeito final do tratamento sobre as perfurações de MT



5.2.2 Percentual de área perfurada de membrana timpânica antes e depois do tratamento

No início do tratamento, os quatro grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as médias dos %AP da MT (ANOVA; $p = 0,572$; Tabela 2). Como podemos observar os grupos estudados apresentaram nesta etapa %AP da MT médio de cerca de 50%.

Tabela 2 - %AP de MT no início do tratamento

%AP	Controle	FCE	pentoxifilina	FCE + pentoxifilina	p
Média	52,9	48,3	52,6	51,5	0,572
Desvio padrão	7,7	6,2	8,1	7,1	
Mínimo	41,1	40,1	39,1	38,6	
Máximo	65,1	59,2	68,2	62,7	

%AP: percentual de área perfurada; FCE: fator de crescimento epitelial;
p: nível de significância (ANOVA)

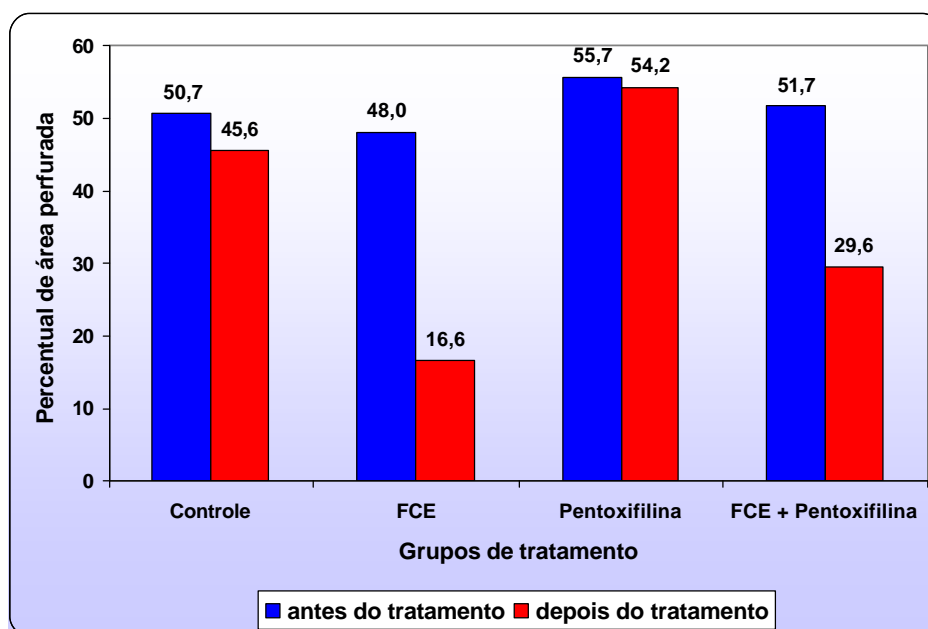
Trinta dias após o tratamento, os quatro grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as médias dos %AP (ANOVA; $p < 0,001$) (Tabela 3). Como podemos observar, enquanto as médias dos %AP nos grupos controle e pentoxifilina mantiveram-se acima de 44%, os demais grupos apresentaram médias bem inferiores. O Gráfico 3 mostra o %AP antes e 30 dias após o tratamento nos quatro grupos de estudo.

Tabela 3 - % AP de MT 30 dias após o tratamento

%AP	Controle	FCE	pentoxifilina	FCE + pentoxifilina	p
Média	44,2	18,1	48,9	34,9	< 0,001
Desvio Padrão	12,6	9,1	15,1	16,8	
Mínimo	16,6	8,4	16,4	0,05	
Máximo	61,6	30,4	69,1	55,9	

%AP: percentual de área perfurada; FCE: fator de crescimento epitelial; p: nível de significância (ANOVA)

Gráfico 3 - %AP antes e depois do tratamento nos quatro grupos de estudo



As comparações entre os grupos, dois a dois, mostraram que a média do %AP após o tratamento no grupo FCE foi significativamente menor do que nos grupos controle ($p = 0,003$) e pentoxifilina ($p < 0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos %AP quando comparados os grupos controle e pentoxifilina ($p = 1,00$); controle e FCE + pentoxifilina ($p = 0,964$); FCE e FCE + pentoxifilina ($p = 0,097$); e pentoxifilina e FCE + pentoxifilina ($p = 0,142$).

5.2.3 Percentual de cicatrização da perfuração de membrana timpânica

Os quatro grupos de estudo apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as médias dos percentuais de cicatrização das perfurações de MT (ANOVA; $p < 0,001$) (Tabela 4). Como podemos observar, o percentual de cicatrização médio manteve-se abaixo de 9% nos grupos controle e pentoxifilina e acima de 16% nos grupos FCE e FCE + pentoxifilina.

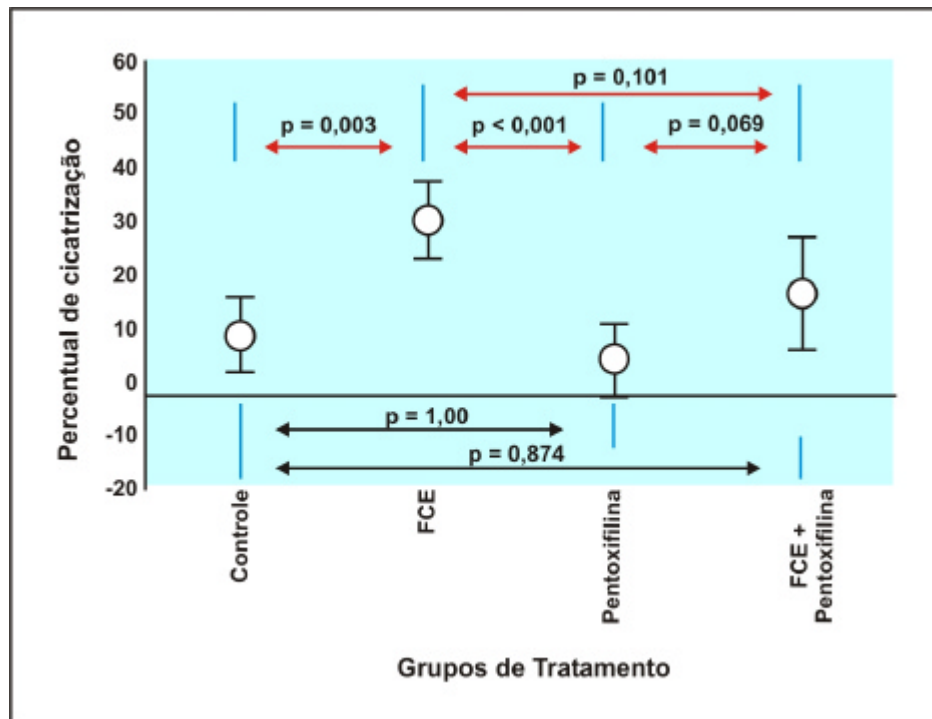
Tabela 4 - Percentual de cicatrização das perfurações de MT

Percentual de cicatrização	Controle	FCE	Pentoxifilina	FCE + pentoxifilina	p
Média	8,7	30,3	3,6	16,5	
Mínimo	-0,9	15,1	-13,9	0,09	< 0,001
Máximo	27,8	40,4	27,1	49,7	

FCE: fator de crescimento epitelial; p: nível de significância (ANOVA)

As comparações dos grupos de estudo, dois a dois, mostraram que o grupo FCE apresentou percentual de cicatrização médio da perfuração significativamente maior do que a observada nos grupos controle ($p = 0,003$) e pentoxifilina ($p < 0,001$). O percentual de cicatrização médio no grupo FCE + pentoxifilina apresentou tendência à diferença quando comparado aos grupos FCE ($p = 0,101$) e pentoxifilina ($p = 0,069$). Não houve diferença estatisticamente significativa no percentual de cicatrização médio quando comparados os grupos controle e pentoxifilina ($p = 1,00$), idem para os grupos FCE + pentoxifilina e controle ($p = 0,874$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Percentual de cicatrização médio das perfurações de MT (média \pm erro-padrão)



6 DISCUSSÃO

A escolha das chinchilas neste estudo experimental se deu após tentativas frustradas de criar perfurações de MT em cobaias. Percebemos logo que essas possuíam anatomia favorável das orelhas externa e média, meato acústico externo largo com aproximadamente 4 mm de diâmetro e MT grande, conforme descrevem Amoils *et al.*⁵².

Além disto, estudos sobre a histologia da MT mostram diferenças sutis entre a espécie humana e as chinchilas. Masaki *et al.*⁵⁰, Amoils *et al.*³¹ e Hsu *et al.*⁵³ descrevem que a MT das chinchilas apresenta espessura e diâmetro menores, fibras musculares circulares escassas no estroma, porém com estrutura histológica de camadas semelhante à humana como descrito por Lim⁴⁸ e Govaerts *et al.*⁴⁹.

Tendo em vista que as chinchilas estudadas foram provenientes da mesma linhagem, assumimos que as mesmas eram geneticamente iguais. Suas orelhas foram estudadas como estruturas independentes e não emparelhadas em cada animal.

Todo o procedimento sobre as MT das chinchilas foi realizado sob visão endoscópica com ótica de 30°. Esta adaptação ocorreu após tentativas de usar o espéculo auricular e a visão microscópica, quando vimos que o endoscópio permite visualização simultânea de toda superfície da MT e do MAE adjacente.

Adotamos um modelo experimental de perfuração de MT semelhante ao proposto por Amoils *et al.*⁵² pelos resultados encorajadores do mesmo. Alguns modelos experimentais⁶²⁻⁶⁵ usam substâncias inibidoras da cicatrização ou animais geneticamente modificados e permitem a criação de perfurações de MT, porém num percentual inferior ao modelo cirúrgico descrito por Amoils *et al.*⁵². Realizamos uma perfuração em formato semi-elíptico nos quadrantes inferiores para abranger a região central da MT que, segundo Reijnen e Kuijpers⁵⁴, é pouco vascularizada e, portanto, menos propensa à cicatrização espontânea. Os bordos das perfurações foram medializados, rebatidos de encontro à camada interna e cauterizados sem escarificação prévia para minimizar o sangramento na MT e diminuir a tendência à cicatrização espontânea que, durante estudo piloto, mostrou-se diretamente proporcional ao sangramento, o que concorda com Valtonen *et al.*⁵⁸.

Pouco mais da metade de nossa amostra inicial apresentou perfurações de MT com cicatrização inferior a 10% quatro semanas após o procedimento de perfuração. Apesar do percentual de perfurações de MT descrito por Amoils *et al.*⁵² ter sido maior (84%), em nossa amostra as orelhas foram rigorosamente selecionadas para tratamento e em nenhuma delas foi repetido o procedimento de perfuração, ao contrário do ocorrido com aquele autor. Dvorak *et al.*⁴¹ obtiveram 31% de perfurações de MT usando modelo experimental semelhante ao descrito por Amoils *et al.*⁵².

Tivemos duas orelhas excluídas por retração excessiva dos bordos da perfuração e MT residual escassa. Apesar de não haver relato semelhante nos demais estudos experimentais com perfuração de MT, acreditamos que isto possa ser atribuído à infecção associada da orelha média e ou à energia térmica usada na perfuração. Segundo Griffin⁹, quando o mecanismo causal da perfuração traumática de MT envolve energia térmica pode haver necrose progressiva do tecido adjacente aumentando a área perfurada inicial.

As perfurações realizadas em MT de chinchilas neste estudo podem ser consideradas subagudas já que após 30 dias de observação tomamos o cuidado de excluir as orelhas com um percentual de cicatrização igual ou maior que 10%. Este critério foi adotado para cobrir qualquer margem de erro da medição e garantir que os eventos observados após este período possam ser atribuídos apenas à intervenção em questão.

O tratamento inicial das perfurações traumáticas de MT é a observação clínica, estando indicada correção cirúrgica apenas nos casos em que não se observar cicatrização espontânea após período mínimo de três meses^{5,9}. O objetivo inicial do presente estudo foi avaliar a possibilidade de um tratamento clínico ambulatorial que, por meio de um procedimento simples e sem a necessidade de anestesia, possa ser oferecido a pacientes com perfurações traumáticas não cicatrizadas em sua fase aguda. Deste modo, optamos por estudar o efeito de substâncias indutoras de cicatrização numa fase subaguda da perfuração, aproveitando uma possível atividade mitótica residual antes que a perfuração venha a ter indicação cirúrgica.

A análise histológica das perfurações após 30 dias evidenciou que o tempo de observação adotado foi suficiente para considerarmos as mesmas subagudas. Na maioria das lâminas as perfurações mostraram atividade inflamatória crônica, caracterizada pela ausência de miofibroblastos que expressassem α -actina de músculo liso e que devem estar presentes em todo tecido em cicatrização. A ausência destas células indica ausência de contração do tecido em cicatrização e sinaliza cronicidade⁵⁹. Por outro lado, observamos também nas lâminas atividade inflamatória aguda coexistente com os elementos crônicos, evidenciada pela vascularização e pelo infiltrado inflamatório com a presença de neutrófilos que em geral desaparecem poucos dias após a lesão. Estes achados sugerem que o tecido timpânico analisado apresentava inflamação crônica com surtos de reagudização, o que fala a favor de lesão subaguda.

A escolha da esponja de gelatina ocorreu pela necessidade do uso de um sistema de liberação contínua do FCE para permitir potencial terapêutico máximo^{26,27,69}. A esponja diminui a degradação do FCE e aumenta a quantidade de tecido de granulação quando comparada ao FCE aplicado sem sistema de liberação. O tempo de exposição da MT ao FCE, de pelo menos 72 horas, foi adotado para permitir a síntese de DNA e a divisão celular de forma a atingir uma densidade celular máxima²⁵.

O efeito final do tratamento sobre as perfurações de MT foi diferente entre os grupos. A cicatrização parcial e/ou total foi duas vezes mais freqüente nos grupos FCE e FCE + pentoxifilina, enquanto a ausência de cicatrização foi mais freqüente nos grupos controle e pentoxifilina.

Nossos achados não podem ser diretamente comparados aos de outros autores^{31,32,41}, pois os mesmos trataram perfurações consideradas crônicas, usaram dois grupos de estudo (com ou sem FCE) e consideraram como desfecho apenas a cicatrização total das mesmas. Contudo, podemos concordar com Amoils *et al.*³¹ e Lee *et al.*³² quando estes dizem que a probabilidade de cicatrização é maior quando se utiliza o FCE.

A média do %AP de MT e seu desvio-padrão antes do tratamento foram semelhantes entre os grupos, assegurando que as perfurações de MT possuíam aproximadamente o mesmo tamanho inicial. A média do %AP de MT 30 dias após o tratamento foi estatisticamente diferente entre os grupos, mostrando que os fármacos influenciaram de modo diverso na cicatrização das perfurações.

O FCE no esquema posológico administrado permitiu um percentual de cicatrização das perfurações de MT em chinchilas de 30,3% de área da MT em 30 dias. Esta percentual foi 1,8 vezes maior do que no grupo FCE + pentoxifilina, 3,5 vezes maior que no grupo controle e 8,4 vezes maior que no grupo pentoxifilina.

Lembrando que as observações foram feitas após intervalo de tempo de 30 dias nos quatro grupos de estudo, considerando que as perfurações representavam inicialmente cerca de 50% da área total da MT e supondo que este ritmo cicatricial se mantenha contínuo, a cicatrização estaria completa 1,5 meses após o início do tratamento no grupo FCE, em três meses no grupo FCE + pentoxifilina, em 5,5 meses sem qualquer tratamento e em 12,5 meses no grupo pentoxifilina.

Alguns autores mostram que o FCE é capaz de encurtar o tempo de cicatrização total de perfurações agudas de MT de gatos, cobaias e ratos em relação ao grupo controle, sugerindo que o tratamento é mais rápido. Apesar de não termos usado o mesmo modelo experimental destes autores, pois tratamos perfurações subagudas, nossos resultados são semelhantes já que observamos que a associação do FCE intensificou o ritmo de cicatrização nos grupos que o utilizaram^{38,70,71}.

Os estudos experimentais que testam o FCE em perfurações de MT consideradas crônicas mostram resultados conflitantes. Amoils *et al.*³¹ e Lee *et al.*³² observaram que o percentual de cicatrização total das perfurações de MT foi três a quatro vezes maior no grupo que recebeu FCE do que no grupo controle, enquanto Dvorak *et al.*⁴¹ não conseguem reproduzir estes resultados. Parte desta discrepância pode ser decorrente do trauma mecânico e do sangramento induzidos na MT durante as trocas repetidas da esponja de gelatina, mais de seis vezes por orelha, o que pode ter contribuído em parte para o elevado percentual de cicatrização total das perfurações de MT no grupo controle no estudo deste último autor.

Apesar do FCE não ser um fármaco liberado para uso em humanos, Ramsay *et al.*⁴² realizaram um ensaio clínico em que pacientes com OMCS foram tratados com FCE, porém não observaram diferença entre a cicatrização média das perfurações dos grupos de estudo e placebo. É possível que parte deste resultado se deva às pequenas doses empregadas e ao curto tempo de exposição.

A proposta de associar o FCE e a pentoxifilina foi fundamentada no fato de que em todo e qualquer tecido a oxigenação e a vascularização são fundamentais para que ocorram mitose e replicação celular, e que a anóxia e as endoxinas suprimem estes eventos⁵⁶.

Nossa idéia inicial foi associar um indutor de fluxo sanguíneo para potencializar a ação mitogênica do FCE na cicatrização da MT. Contudo, não observamos benefício maior com o uso da pentoxifilina em perfurações de MT em chinchilas. Pelo contrário, observamos menores percentuais de cicatrização da MT nos grupos que receberam a pentoxifilina. Este percentual foi cerca de duas vezes menor no grupo FCE + pentoxifilina quando comparado ao grupo FCE e 4,5 vezes menor no grupo pentoxifilina quando comparado ao grupo FCE + pentoxifilina, com tendência a uma diferença estatisticamente significativa pelo teste “post-hoc” e sugerindo que a pentoxifilina provavelmente interfere negativamente na ação do FCE. Publicações demonstram que os efeitos da pentoxifilina, em especial a inibição da fosfodiesterase, não são restritos aos eritrócitos. O aumento nas concentrações intra-celulares do AMPc também ocorre em outros tipos celulares como fibroblastos e queratinócitos, só que com efeito anti-proliferativo por provável bloqueio no mecanismo de ação de citocinas e de fatores de transcrição nuclear^{72,73}.

Nossos resultados não são comparáveis aos observados por Jull *et al.*⁴⁶, pois estes estudaram os efeitos da pentoxifilina em úlceras crônicas de pele. Entretanto, nossa expectativa inicial com o benefício da pentoxifilina era bem maior já que estávamos testando um fármaco, que segundo os autores,

mostrou-se 41% mais efetivo que o placebo na cicatrização de úlceras cutâneas de pele. É possível que os bons resultados observados na cicatrização de úlceras possam ser atribuídos em parte aos efeitos antiinflamatório e anti-fibrogênico do fármaco⁷²⁻⁷⁵. A pentoxifilina é capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e de fatores indutores da fibrinogênese, o que poderia em parte modular para menos a expressão de citocinas, limitando a proliferação celular^{74,75}.

Nossos resultados não são diretamente comparáveis aos de Lim *et al.*⁴⁷, pois estes usaram a pentoxifilina em um modelo experimental de perfurações agudas de MT em cobaias, com grande potencial de cicatrização espontânea, o que em parte interfere na observação da ação isolada do fármaco. Contudo, assim como esses autores, não observamos benefício adicional com o uso da pentoxifilina sobre o percentual de MT cicatrizadas.

7 CONCLUSÕES

a) O fator de crescimento epitelial auxiliou o processo de cicatrização de perfurações subagudas de membranas timpânicas de chinchilas, o que não se observou com a pentoxifilina. A associação da pentoxifilina com o fator de crescimento epitelial não potencializou seu efeito.

b) O percentual de cicatrização das perfurações de membrana timpânica no período de 30 dias foi de 30,3% no grupo tratado com fator de crescimento epitelial, de 3,6% no grupo que recebeu pentoxifilina, de 16,5% no grupo tratado com fator de crescimento epitelial associado a pentoxifilina e de 8,7% na ausência de tratamento.

8 ANEXOS

Anexo A - Aprovação da Comissão de Ética



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13.10.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **853/04**, intitulado: "Efeito do fator de crescimento epitelial e da pentoxifilina na cicatrização de perfurações traumáticas persistentes da membrana timpânica - estudo experimental em chinchilas" apresentado pelo Departamento de **OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento

Pesquisador(a) Executante: Dra. Jeanne da Rosa Officina Romalho

CAPPesq, 13 de Outubro de 2004.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
 Presidente da Comissão de Ética para Análise
 de Projetos de Pesquisa

Anexo B - Aprovação FAPESP



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO



Processo: 02/08285-0

São Paulo, 26 NOV 2002

Ilmo(a). Sr(a).
Prof(a). Dr(a). Ricardo Ferreira Bento

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos a V. Sa que esta Fundação, com base no parecer de nossa assessoria, aprovou no processo acima referido, a concessão de auxílio.

O Termo de Outorga, com as condições financeiras aprovadas, está sendo preparado, cabendo-nos informar que alguns itens orçamentários podem não ter sido aprovados ou aprovados com valores inferiores aos solicitados.

Cabe ressaltar que, após a assinatura do contrato, solicitações de aditivos ao orçamento aprovado somente são analisadas se encaminhadas juntamente com os relatórios científicos previstos. Solicitações encaminhadas fora dessas ocasiões apenas são analisadas, em caráter excepcional, se ficar demonstrado que os itens e valores orçamentários em questão não poderiam ter sido previstos no momento da assinatura do termo de outorga ou da apresentação dos relatórios científicos anteriores.

A assinatura do Termo de Outorga e aceitação do auxílio equivale ao reconhecimento, por parte do pesquisador responsável, de que os recursos concedidos pela FAPESP são suficientes, salvo circunstâncias imprevisíveis, para viabilizar a realização do projeto. Por essa razão, recomenda-se aos pesquisadores que comente escrevem o Termo de Outorga após terem se certificado de que os itens e valores do orçamento aprovado pela FAPESP sejam, nas circunstâncias previsíveis suficientes para garantir plenamente o bom desenvolvimento do projeto em questão. Não havendo essa certeza, recomenda-se ao pesquisador que não assine o Termo e apresente imediatamente um pedido de reformulação do orçamento aprovado, devidamente fundamentado, que será analisado pela Assessoria da FAPESP.

Solicitamos que aguarde convocação da FAPESP para assinatura do respectivo Termo.

OBSERVAÇÕES:

PARECER ANEXO

Atenciosamente,


José Fernando Perez
Diretor Científico

FF/ncg

RUA PIO XI, 1500 - CEP 05508-901 - SÃO PAULO - SP - TEL: (011) 3086-4000 - FAX: 3045-2383
e-mail: contato@fapesp.br



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

**Formulário para parecer Inicial de Assessoria Científica
Auxílio a Pesquisa**(Este formulário está disponível em meio eletrônico no endereço saturno.fapesp.br)Processo **02 / 08285 - 0R****IDENTIFICAÇÃO**

Solicitante: Ricardo Ferreira Bento

APRECIÇÃO GERAL DA PROPOSTA

Na atualidade, o fechamento de perfurações de membranas timpânicas é realizado geralmente por meio de técnicas cirúrgicas; os materiais mais utilizados para este fechamento são tecidos autógenos, geralmente fascia do músculo temporal e mais raramente enxertos homólogos e heterólogos.

Com o advento de novos conhecimentos relacionados à biologia celular torna-se indispensável a busca de métodos menos agressivos.

Assim, a possibilidade de se utilizar Fator de Crescimento Epitelial por aplicações tópicas e se possível ativadas por fármacos, pode trazer progressos que resultem em menores custos e menos desconforto aos pacientes. Assim o objetivo da presente proposta está plenamente justificável e o organograma bem elaborado, sem necessidade de modificações; estas poderão ocorrer no desenvolver da pesquisa por razões técnicas.

PROJETO

Os objetivos do projeto estão bem definidos? Comente.

Estão bem definidos e bem justificados.

Análise da originalidade e da importância da contribuição pretendida para a área de conhecimento em que se insere.

É um trabalho original e que poderá trazer contribuição no plano assistencial.

Análise da fundamentação científica e dos métodos empregados.

Bem fundamentado.

Procedimentos adequados.

Anexo C - Técnica de preparo das peças para corte histológico

Processo	Substância	Tempo	Frequência
Fixação	formol a 10%	24 horas	1 vez
Descalcificação	EDTA a 5%	2 semanas	troca da solução a cada 3 dias
Lavagem	água corrente	18 horas	1 vez
Desidratação	álcool a 70%	1 hora	1 vez
	álcool a 95%	2 horas	2 vezes
	álcool a 100%	2 horas	3 vezes
Diafanização	xilol	2 horas	3 vezes
Inclusão	parafina a 60°C	2 horas	3 vezes
Cortes (4µm)	–	–	–
Secagem em estufa a 60°C	–	1 hora	1 vez
Desparafinação e hidratação	xilol	20 minutos	2 vezes
	álcool a 100%, 95%, 80% e 70%	30 segundos	1 vez cada
	água corrente	2 minutos	1 vez
Coloração ou imuno-histoquímica	–	–	–
Parafinação e desidratação	água corrente	2 minutos	1 vez
	álcool a 50%, 80%, 95% e 100%	30 segundos	1 vez cada
	xilol	30 segundos	4 vezes
Montagem com lamínula e Entellan	–	–	–

Anexo D - Coloração pela hematoxilina e eosina

Substância	tempo
Hematoxilina de Harris	10 minutos
Água corrente	10 minutos
Eosina	5 minutos
Água corrente	10 segundos
Desidratação em álcool a 70%	30 segundos
Diafanização em xilol	1 minuto
Montagem em resina	–

Anexo E - Estudo imuno-histoquímico

Processo	Substância	Tempo	Frequência
Recuperação antigênica	calor úmido em panela a vapor	60 minutos	1 vez
	tampão citrato 21mMol pH 6,0	10 minutos	1 vez
Bloqueio da peroxidase endógena	água oxigenada	5 minutos	4 vezes
	água corrente	10 minutos	1 vez
Diluição do anticorpo primário	anticorpo anti-actina- α de músculo liso (1:200)	incubação a 37°C por 30 minutos e a 4°C por 18 horas	1 vez
	albumina de soro bovino 1%		
	azida sódica 0,1%		
incubação	lavagem em soro fisiológico tamponado	3 minutos	3 vezes
	anticorpo secundário biotinilado	30 minutos a 37°C	1 vez
	streptavidina-HRP	30 minutos a 37°C	1 vez
Revelação com cromógeno	100mg% de diaminobenzidina tetrahydroclorido	5 minutos a 37°C	1 vez
	água oxigenada 1ml		
Contra-coloração	dimetilsulfóxido 1ml	1 minuto	1 vez
	hematoxilina de Harris		
Diferenciação em água amoniacal	hidróxido de amônio 0,5%	10 segundos	2 vezes

9 REFERÊNCIAS

1. Rizer FM. Overlay versus underlay tympanoplasty. Part I: historical review of the literature. *Laryngoscope*. 1997; 107(12 Pt 2):1-25.
2. Leal MC, Alves Júnior G, Lessa F, Caldas Neto SS, Caldas N. Miringoesclerose em pacientes renais crônicos: estudo em 116 pacientes. *An Fac Med Univ Fed Pernamb*. 2001; 4 6(1):49-51.
3. Caldas Neto SS. *Prevalência de miringoesclerose em pacientes com insuficiência renal crônica em tratamento por hemodiálise: análise comparativa com um grupo controle* [tese livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.
4. Bento RF, Miniti A, Marone SAM. *Tratado de otologia*. 1ª ed. São Paulo: EDUSP; 1998.
5. Bento RF, Lessa MM, Chung D, Wiikmann C, Miniti A. *Conduas práticas em otologia*. 1ª ed. São Paulo: Fundação Otorrinolaringologia; 2002.

6. Spandow O, Hellstrom S, Dahlstrom M. Structural characterization of persistent tympanic membrane perforations in man. *Laryngoscope*. 1996; 106(3 Pt 1):346-52.
7. Gladstone HB, Jackler RK, Varav K. Tympanic membrane wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am*. 1995; 28(5):913-32.
8. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg*. 1993; 166(1):74-81.
9. Griffin WL, Jr. A retrospective study of traumatic tympanic membrane perforations in a clinical practice. *Laryngoscope*. 1979; 89(2 Pt 1):261-82.
10. Bogar P, Sennes LU, Bento RF, Busch GHC, Marone SAM, Miniti A. Perfurações traumáticas de membrana timpânica. *Rev Bras Otorinolaringol*. 1993; 59(4):276-8.
11. Kristensen S. Spontaneous healing of traumatic tympanic membrane perforations in man: a century of experience. *J Laryngol Otol*. 1992; 106(12):1037-50.
12. McIntire C, Benitez JT. Spontaneous repair of the tympanic membrane. Histopathological studies in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1970; 79(6):1129-31.

13. Martin HC, Munro KJ, Lam MC. Perforation of the tympanic membrane and its effect on the real-ear-to-coupler difference acoustic transform function. *Br J Audiol.* 2001; 35(4):259-64.
14. Laidlaw DW, Costantino PD, Govindaraj S, Hiltzik DH, Catalano PJ. Tympanic membrane repair with a dermal allograft. *Laryngoscope.* 2001; 111(4 Pt 1):702-7.
15. Benecke JE, Jr. Tympanic membrane grafting with alloderm. *Laryngoscope.* 2001; 111(9):1525-7.
16. Oliveira JAA, Hyppolito MA, Netto JC, Mrué F. Myringoplasty using a new biomaterial allograft. *Rev Bras Otorinolaringol.* 2003; 69(5):649-655.
17. Sheehy JL, Anderson RG. Myringoplasty. A review of 472 cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1980; 89(4 Pt 1):331-4.
18. Vartiainen E, Nuutinen J. Success and pitfalls in myringoplasty: follow-up study of 404 cases. *Am J Otol.* 1993; 14(3):301-5.
19. Carr MM, Poje CP, Nagy ML, Pizzuto MP, Brodsky LS. Success rates in paediatric tympanoplasty. *J Otolaryngol.* 2001; 30(4):199-202.

20. Souza JCR. *Miringoplastia: estudo comparativo entre enxerto autólogo de fáscia temporal e enxerto homólogo de dura-mater, técnica medial com o uso do retalho tímpano-meatal recombrindo o enxerto livre* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1993.
21. Freitas EB. *Estudo comparativo entre as técnicas medial e lateral de timpanoplastia tipo I quanto ao fechamento da perfuração timpânica, resultado funcional e complicações, empregando-se enxerto autólogo de fáscia temporal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2000.
22. Bogar P, Marone S, Bento R, Miniti A. Estudo das funções equipressivas e de drenagem da tuba auditiva e sua correlação com resultados cirúrgicos de miringoplastia. *Rev Bras Otorinolaringol.* 1995; 61(5):380-393.
23. Bento RF. Estudo da relação do tamanho da mastóide e resultados de miringoplastia. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1992; 58(1):21-26.
24. Carpenter G, Cohen S. Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1976;88(2):227-37.

25. Aharonov A, Pruss RM, Herschman HR. Epidermal growth factor. Relationship between receptor regulation and mitogenesis in 3T3 cells. *J Biol Chem.* 1978; 253(11):3970-7.
26. Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, Wolt TB, Woodward SC. Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82(21):7340-4.
27. Brown GL, Curtsinger LJ, White M, Mitchell RO, Pietsch J, Nordquist R, von Fraunhofer A, Schultz GS. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Ann Surg.* 1988; 208(6):788-94.
28. Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature.* 1988; 332(6161):217-9.
29. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest.* 1989; 84(2):640-6.
30. Brown GL, Nanney LB, Griffen J, Cramer AB, Yancey JM, Curtsinger LJ, 3rd, Holtzin L, Schultz GS, Jurkiewicz MJ, Lynch JB. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N Engl J Med.* 1989; 321(2):76-9.

31. Amoils CP, Jackler RK, Lustig LR. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992; 107(5):669-83.
32. Lee AJ, Jackler RK, Kato BM, Scott NM. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor: progress toward clinical application. *Am J Otol.* 1994; 15(1):10-8.
33. Hom DB. Growth factors in wound healing. *Otolaryngol Clin North Am.* 1995; 28(5):933-53.
34. Ma Y, Zhao H, Zhou X. Topical treatment with growth factors for tympanic membrane perforations: progress towards clinical application. *Acta Otolaryngol.* 2002; 122(6):586-99.
35. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83(3):835-70.
36. Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br J Surg.* 2003; 90(2):133-46.
37. Brown GL, Curtsinger L, 3rd, Brightwell JR, Ackerman DM, Tobin GR, Polk HC, Jr., George-Nascimento C, Valenzuela P, Schultz GS. Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. *J Exp Med.* 1986; 163(5):1319-24.

38. O'Daniel TG, Petitjean M, Jones SC, Zogg J, Martinez SA, Nolph MB, Schultz GS. Epidermal growth factor binding and action on tympanic membranes. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1990; 99(1):80-4.
39. Mondain M, Ryan A. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor are induced in guinea-pig tympanic membrane following traumatic perforation. *Acta Otolaryngol.* 1995; 115(1):50-4.
40. Somers T, Goovaerts G, Schelfhout L, Peeters S, Govaerts PJ, Offeciers E. Growth factors in tympanic membrane perforations. *Am J Otol.* 1998; 19(4):428-34.
41. Dvorak DW, Abbas G, Ali T, Stevenson S, Welling DB. Repair of chronic tympanic membrane perforations with long-term epidermal growth factor. *Laryngoscope.* 1995; 105(12 Pt 1):1300-4.
42. Ramsay HA, Heikkonen EJ, Laurila PK. Effect of epidermal growth factor on tympanic membranes with chronic perforations: a clinical trial. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995; 113(4):375-9.
43. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs.* 1987; 34(1):50-97.

44. Nemiroff PM. Synergistic effects of pentoxifylline and hyperbaric oxygen on skin flaps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1988; 114(9):977-81.
45. Armstrong M, Jr., Kunar DR, Cummings CW. Effect of pentoxifylline [corrected] on myocutaneous flap viability in pigs. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993; 109(4):668-75.
46. Jull AB, Waters J, Arroll B. Pentoxifylline for treating venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002(1): CD001733.
47. Lim AA, Washington AP, Greinwald JH, Lassen LF, Holtel MR. Effect of pentoxifylline on the healing of guinea pig tympanic membrane. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000; 109(3):262-6.
48. Lim DJ. Human tympanic membrane. An ultrastructural observation. *Acta Otolaryngol.* 1970; 70(3):176-86.
49. Govaerts PJ, Jacob WA, Marquet J. Histological study of the thin replacement membrane of human tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol.* 1988; 105(3-4):297-302.
50. Masaki M, Wright CG, Lee DH, Meyerhoff WL. Effects of otic drops on chinchilla tympanic membrane. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1988; 114(9):1007-11.

51. Vrettakos PA, Dear SP, Saunders JC. Middle ear structure in the chinchilla: a quantitative study. *Am J Otolaryngol*. 1988; 9(2):58-67.
52. Amoils CP, Jackler RK, Milczuk H, Kelly KE, Cao K. An animal model of chronic tympanic membrane perforation. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992; 106(1):47-55.
53. Hsu GS, Margolis RH, Schachern PA. Development of the middle ear in neonatal chinchillas. I. Birth to 14 days. *Acta Otolaryngol*. 2000; 120(8):922-32.
54. Reijnen CJ, Kuijpers W. The healing pattern of the drum membrane. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1971; 287:1-74.
55. Stenfors LE, Carlsoo B, Salen B, Winblad B. Repair of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol*. 1980; 90(5-6):332-41.
56. Bankey P, Fiegel V, Singh R, Knighton D, Cerra F. Hypoxia and endotoxin induce macrophage-mediated suppression of fibroblast proliferation. *J Trauma*. 1989; 29(7):972-9; discussion 979-80.
57. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276(5309):75-81.

58. Valtonen HJ, Poe DS, Shapshay SM. Experimental CO2 laser myringotomy. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001; 125(3):161-5.
59. Lorena D, Uchio K, Costa AM, Desmouliere A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound Repair Regen.* 2002; 10(2):86-92.
60. Taylor M, McMinn RM. Cytology of repair in experimental perforation of the tympanic membrane and its relationship to chronic perforations in man. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1967; 71(5):802-12.
61. Somers T, Houben V, Goovaerts G, Govaerts PJ, Offeciers FE. Histology of the perforated tympanic membrane and its muco-epithelial junction. *Clin Otolaryngol.* 1997; 22(2):162-6.
62. Spandow O, Hellstrom S. Animal model for persistent tympanic membrane perforations. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1993; 102(6):467-72.
63. Truy E, Disant F, Morgon A. Chronic tympanic membrane perforation: an animal model. *Am J Otol.* 1995; 16(2):222-5.
64. Vrabec JT. Tympanic membrane perforations in the diabetic rat: a model of impaired wound healing. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998; 118(3 Pt 1):304-8.

65. O'Reilly RC, Goldman SA, Widner SA, Cass SP. Creating a stable tympanic membrane perforation using mitomycin C. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001; 124(1):40-5.
66. Savage CR, Jr., Inagami T, Cohen S. The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1972;.247(23):7612-21.
67. Starkey RH, Cohen S, Orth DN. Epidermal growth factor: identification of a new hormone in human urine. *Science.* 1975; 189(4205):800-2.
68. Cohen S, Carpenter G. Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975; 72(4):1317-21.
69. Okumura K, Kiyohara Y, Komada F, Iwakawa S, Hirai M, Fuwa T. Improvement in wound healing by epidermal growth factor (EGF) ointment. I. Effect of nafamostat, gabexate, or gelatin on stabilization and efficacy of EGF. *Pharm Res.* 1990; 7(12):1289-93.
70. Chauvin K, Bratton C, Parkins C. Healing large tympanic membrane perforations using hyaluronic acid, basic fibroblast growth factor, and epidermal growth factor. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999; 121(1):43-7.

71. Güneri EA, Tekin S, Yilmaz O, Ozkara E, Erdag TK, Ikiz AO, Sarioglu S, Güneri A. The effects of hyaluronic acid, epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol*. 2003; 24(3):371-6.
72. Berman B, Duncan MR. Pentoxifylline inhibits normal human dermal fibroblast in vitro proliferation, collagen, glycosaminoglycan, and fibronectin production, and increases collagenase activity. *J Invest Dermatol*. 1989; 92:605-10.
73. Gilhar A, Grossman N, Kahanovicz Set al. Antiproliferative effect of pentoxifylline on psoriatic and normal epidermis. In vitro and in vivo studies. *Acta Derm Venereol*. 1996; 76:437-41.
74. Stosic-Grujicic S, Maksimovic D, Badovinac V, Samardzic T, Trajkovic V, Lukic M, Mostarica Stojkovic M. Antidiabetogenic effect of pentoxifylline is associated with systemic and target tissue modulation of cytokines and nitric oxide production. *J Autoimmun*. 2001; 16(1):47-58.
75. Raetsch C, Jia JD, Boigk G, Bauer M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut*. 2002; 50(2):241-7.

76. NationalResearchCouncil. *Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório*. 1ª ed. Goiânia: National Academy Press; 2003.
77. Souza NL. Eutanásia. In: Luca RR, Alexandre SR, Marques T, Souza NL, Merusse JLB, Neves SP (ed.). *Manual para técnicos em bioterismo*. 2ª ed. São Paulo: FINEP-COBEA; 1996. p. 157-177.

* De acordo com:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of journals Indexed in Index Medicus*.