



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

Corintho Viana Pereira

**Influência da migração epitelial na cicatrização da perfuração
timpânica em *Chinchilla laniger***

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador

Dr. Sílvio Caldas Neto

Prof. Adjunto do Depto. de Cirurgia, CCS-UFPE

RECIFE
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Relatório da Defesa de Dissertação do Dr. Corintho Viana Pereira, Aluno de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Área de Concentração: Cirurgia Clínica e Experimental.

Às oito horas do dia dezesseis de dezembro dois mil e nove no Auditório Joana Araújo da Rocha Barros do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, tiveram início os trabalhos de defesa de Dissertação do Dr. Corintho Viana Pereira, para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia. A comissão Julgadora – eleita pelo Colegiado do Programa e homologada pela Câmara de Pesquisa e Pós-graduação – foi integrada pelos professores: Dr EDMUNDO MACHADO FERRAZ, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. CARLOS TEIXEIRA BRANDT (Presidente da Banca Examinadora), Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr^a. ERIDEISE GURGEL DA COSTA, Doutora da Universidade de São Paulo; e, para suplentes: interno: JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; e, finalmente, externo, Dr^a. MARIANA DE CARVALHO LEAL, Doutora do Hospital das Clínicas da USP; tendo, como orientador interno, o Dr. SÍLVIO DA SILVA CALDAS NETO, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE. A dissertação apresentada pelo Dr. Corintho Viana Pereira versou sobre **"Influência da migração epitelial na cicatrização da perfuração timpânica em *Chinchilla laniger*"**. Após, a explanação de 30(Trinta) minutos pelo candidato, justificando a escolha, o objetivo da pesquisa, a metodologia empregada e os resultados obtidos, baseados na análise estatística, ilustrados com data show, foram realizadas as arguições na seguinte ordem: Prof. Dr. CARLOS TEIXEIRA BRANDT (Presidente da Banca Examinadora), Prof. Dr. EDMUNDO MACHADO FERRAZ, Prof. Dr^a. ERIDEISE GURGEL DA COSTA; todas as arguições foram feitas no tempo regulamentar, e respondidas pelo candidato. Ao término das mesmas, a Comissão Julgadora proferiu o seguinte resultado: Prof. Dr. CARLOS TEIXEIRA BRANDT (Presidente da Banca Examinadora), menção "_____", Prof. Dr. EDMUNDO MACHADO FERRAZ, menção "_____", Prof. Dr^a. ERIDEISE GURGEL DA COSTA, menção "_____". Nada mais havendo a registrar foram encerrados os trabalhos e, para constar, elaborei o presente relatório que vai por mim, Isabela Nogueira Pimentel, Técnica em assuntos Educacionais, assinado depois do Senhor Presidente, e demais integrantes da Comissão Examinadora. Recife, 16 de dezembro de 2009.

Prof. CARLOS TEIXEIRA BRANDT

Prof. EDMUNDO MACHADO FERRAZ

Prof. ERIDEISE GURGEL DA COSTA

Sra. ISABELA NOGUEIRA PIMENTEL (Técnica em assuntos educacionais)



Universidade Federal de Pernambuco

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Thadeu Pinheiro

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Carlos Teixeira Brandt

VICE-COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvia Caldas Neto



Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com:

Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication. International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver), Updated October 2009. Disponível no endereço eletrônico <http://www.icmjl.org>.



Dedicatória

A Marina, Gabriel, Carla, Léo,
Marilena e Maria Elisa.

Minha vida



Agradecimentos

A **Deus**, por tudo e por todos.

Aos meus **familiares** e **amigos**, que não citarei nominalmente, mas que estão em meus pensamentos.

Ao **prof. Silvio Caldas Neto**, por sua orientação e apoio em minha vida acadêmica e profissional.

Ao **prof. Nelson Caldas**, por suas lições de vida.

A **profa. Dinalva Barros**, por seu profissionalismo e honestidade.

A **Thereza Cavalcanti**, por ensinar o caminho da harmonia.

A **Adriana Ferreira** e **Carolina Vasconcelos**, pelo apoio na execução deste projeto.

A **todos**, que de alguma forma, colaboraram com a realização deste trabalho.



Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	xviii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras e Gráficos	x
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	01
1.1 Apresentação do problema	02
2. Objetivos	03
2.1 Geral	04
2.2 Específico	04
3. Literatura	05
3.1 Membrana timpânica	06
3.2 Migração epitelial	07
3.3 Perfuração timpânica	08
3.4 Cicatrização do tímpano	08
3.5 <i>Chinchilla laniger</i>	10
4. Materiais e Métodos	13
4.1 População e local do estudo	14
4.2 Desenho do estudo	14
4.3 Seleção da amostra	14
4.4 Procedimentos técnicos	15
4.4.1 Anestesia	15
4.4.2 Determinação da velocidade de migração epitelial da MT	15
4.4.2.1 <i>Marcação da membrana timpânica (dia 0)</i>	15
4.4.2.2 <i>Avaliação da migração epitelial (dia 7)</i>	16
4.4.2.3 <i>Perfuração da membrana timpânica (dia 7)</i>	16
4.4.2.4 <i>Avaliação da perfuração timpânica – cicatrização total</i>	16
4.5 Material empregado para microscopia e aquisição de imagens	19
4.6 Procedimentos analíticos	19
4.7 Procedimentos éticos	19
5. Resultados	20
6. Discussão	24
7. Conclusões	28
Referências	30
Apêndices	36
Apêndice 1. Mensurações da distância do <i>umbus</i> ao ponto marcado na	37



MT, dia 0 e dia 7	
Anexos	38
Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais	39
Anexo 2. Artigo formatado conforme Otology & Neurotology, Lippicott Williams & Wilkins.	40



Lista de Abreviaturas e Siglas

AT	ânulo timpânico
B	borda da perfuração.
CAE	conduto auditivo externo
dB	decibéis
FM	fita milimetrada
mm	milímetros
MT	membrana timpânica
n	tamanho da amostra - orelhas
PN	ponto marcado a tinta
U	<i>umbus</i> ,
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco



Lista de Tabelas

Tabela 1	Deslocamento do ponto marcado na MT, dia 0-dia 7.	21
Tabela 2	Velocidades de deslocamento do ponto marcado na MT	22
Tabela 3	Tempo para a cicatrização espontânea total da perfuração subaguda	23



Lista de Figuras

- | | | |
|-----------------|---|-----------|
| Figura 1 | <i>Chinchilla laniger</i> | 11 |
| Figura 2 | Aspecto da MT do chinchila. U– <i>umbus</i> , FM– fita milimetrada, AT– ânulo timpânico, PN– ponto marcado a tinta, CAE– conduto auditivo externo. | 17 |
| Figura 3 | Aspecto da perfuração timpânica subguda experimental no chinchila. MT- membrana timpânica, U- <i>umbus</i> , B- borda da perfuração, CAE- conduto auditivo externo. | 18 |

Lista de Gráfico

- | | | |
|------------------|---|-----------|
| Gráfico 1 | Disposição da relação: deslocamento do ponto (dia 0 – dia 7) e tempo para cicatrização espontânea total da perfuração (dias). | 23 |
|------------------|---|-----------|



Resumo

A membrana timpânica tem capacidade de cicatrizar espontaneamente, apesar de alguns indivíduos persistirem com a perfuração timpânica. O fechamento das perfurações ocorre pelo avanço da camada epidérmica da membrana timpânica. O estudo teve como objetivo analisar a capacidade de migração epitelial da membrana timpânica do *Chinchilla laniger* e relacionar a cicatrização espontânea de perfurações timpânicas subagudas. Duas fases compuseram o estudo. Na primeira, a membrana timpânica do chinchila foi marcada à nanquim com um ponto e foi medida sua movimentação, determinando a velocidade da migração epitelial. Na segunda, produziu-se uma perfuração subaguda da membrana timpânica, medindo-se o tempo cicatrização espontânea. Foi medida a correlação da velocidade da migração epitelial da membrana timpânica e do tempo de cicatrização espontânea da perfuração subaguda. A média das velocidades de migração epitelial foi de $0,095 \pm 0,02$ mm/dia, não existindo uma velocidade típica de migração. A média dos tempos de cicatrização espontânea da perfuração subaguda foi de $10,4 \pm 2,7$ dias. Todas as perfurações timpânicas apresentaram cicatrização espontânea. Não foi encontrado correlação entre a velocidade de migração epitelial e o tempo de cicatrização espontânea da perfuração subaguda do *Chinchilla laniger*.

Descritores: Perfuração da membrana timpânica, Cicatrização de feridas, Epitélio, Membrana timpânica, Movimento celular.



Abstract

The tympanic membrane has the capacity of spontaneous healing, although some individuals can persist with tympanic perforation. The healing of perforation occurs by growth of epidermal layer of ear drum. The objective of this study was to analyse the presence and velocity of the epithelial migration, and its relation with the spontaneous healing of sub acute perforation. The study is composed of two parts. First, the tympanic membrane was marked by an ink dot, and its movement was measured, thus determining the velocity of epithelial migration. At the second phase, a sub-acute perforation was produced in the ear drum, and spontaneous healing was measured. The mean epithelial membrane migration velocity of *Chinchilla laniger* was 0.095 ± 0.02 mm/day. No typical velocity can be attributed to this movement. The mean time for spontaneous healing of tympanic sub acute perforation was 10.04 ± 2.69 days. All tympanic perforations showed spontaneous healing. Any correlation was not observed between the rate of epithelial migration and time of spontaneous healing of sub acute tympanic membrane perforation of *Chinchilla laniger*.

Keywords: Tympanic membrane perforation, Wound healing, Epithelium, Tympanic membrane, Cell movement.

INTRODUÇÃO



1.1 Apresentação do problema

A membrana timpânica (MT) é responsável pela transmissão sonora, através da sua capacidade vibratória, proteção sonora à janela redonda e proteção da orelha média à infecções¹

A perfuração timpânica é um problema clínico frequente, principalmente em países em desenvolvimento^{2,3}. A doença pode ser, resultante de traumas, infecções, tumores, ou iatrogenias^{3,4}. A maioria das perfurações timpânicas agudas cicatrizam espontaneamente; não se conhecendo a causa da permanência da perfuração timpânica^{3,5-10}. A migração da camada epidérmica da MT é o provável responsável pela cicatrização espontânea de perfurações timpânicas^{11,12}.

O *Chinchilla laniger* é um modelo animal de alterações crônicas da orelha, principalmente, perfurações timpânicas; devido a semelhança a dos humanos¹³. Não é conhecida a velocidade de migração epitelial deste espécime.

Apesar da MT ter capacidade de cicatrizar espontaneamente, ainda não está clara a razão de, em alguns indivíduos, após uma ruptura, seja de causa traumática ou infecciosa, essa perfuração persistir definitivamente. Por isso, sabendo que o fechamento das perfurações se inicia pelo avanço da camada epidérmica do tímpano, justifica-se um estudo que procure correlacionar a velocidade de migração epitelial do tímpano e a cicatrização espontânea da perfuração. Este estudo busca demonstrar a relação entre a migração epitelial e a cicatrização da perfuração timpânica no chinchila.

OBJETIVOS



Objetivos

2.1 Geral

Avaliar a influência da velocidade de migração epitelial da membrana timpânica sobre o processo de cicatrização espontânea total da perfuração timpânica subaguda, induzida experimentalmente, em *Chinchilla laniger*.

2.2 Específicos

- Mensurar a velocidade de migração epitelial da MT do *Chinchilla laniger*;
- Avaliar a relação entre a velocidade de migração epitelial e o índice e o tempo de cicatrização total da perfuração timpânica subagudas, induzidas experimentalmente, em *Chinchilla laniger*.

LITERATURA



3.1 Membrana timpânica

A MT separa a orelha média da orelha externa, auxiliando a transmissão da pressão sonora da orelha externa à janela oval; proteção sonora da janela redonda; e proteção da orelha média contra infecções¹.

Anatomicamente, a MT é dividida em duas partes: a tensa, de maior extensão, e a flácida, menor e mais delgada. A divisão, entre as duas partes, é feita pelos ligamentos timpanomaleolares anterior e posterior, que se encontram concentricamente na apófise curta do martelo. A MT é inserida na profundidade da porção óssea do conduto auditivo externo por uma faixa circular de tecido conjuntivo, o ligamento de Gerlach¹⁴.

A parte tensa da MT, fibroelástica, responsável pela transmissão sonora para os ossículos com ampliação sonora, é constituída de três camadas^{14,15}:

1. A camada mais interna, mucosa, é relacionada ao ouvido médio, constituída por epitélio simples, pavimentoso a cubóide, derivado do endoderma;
2. A média é uma camada delgada, denominada lâmina própria, é composta: de elementos mesodérmicos; fibras colágenas (que confere as características vibratórias especiais); fibroblastos; e fibras elásticas- de orientação radial e circular, formando arcos do ligamento de Gerlach ao cabo do martelo ou do ligamento ao seu lado oposto, fibras circulares ao redor do umbo e, na periferia, fibras parabólicas anteriores e posteriores, fibras arciformes ou semilunares;



3. A camada externa é composta de epiderme delgada, originária do ectoderma, sendo a provável responsável pela migração epitelial.

A localização de máxima vibração ocorre nos quadrantes póstero-superior e póstero-inferior da parte tensa da MT¹⁶.

A parte flácida da MT localiza-se no segmento de Rivinus e é formada por apenas duas camadas: a externa e interna, não existindo a camada média. Esta região não tem função vibratória.

3.2 Migração epitelial

A migração epitelial da MT foi sugerida, desde o século XIX, pela capacidade autolimpante do conduto auditivo externo^{11,12}. A migração da camada superficial do extrato córneo, camada epidérmica da MT, é um mecanismo para a remoção da queratina e cerume, além da provável responsabilidade da cicatrização espontânea de perfurações timpânicas^{11,12}. Atividade mitótica da MT é exacerbada na parte tensa da MT, próxima ao ânulo timpânico e ao manúbrio do martelo^{12,17,18}.

A migração da camada superficial do extrato córneo representa um mecanismo para a remoção da queratina, cerume e corpos estranhos da MT e conduto auditivo externo, resultando em função vibratória normal^{12,19}.

O fenômeno da migração epitelial foi descrito, usando discos de papel em volta do martelo, como um movimento em direção póstero-superior da MT⁴. A tinta nanquim foi utilizada para determinar o sentido do movimento da migração, direção anterior para posterior na MT e lateralmente no conduto¹².



A migração da camada epitelial foi mensurada em 0,07 mm por dia na MT humana, observando o *umbus*, como ponto central deste movimento¹⁷. O tempo de percusso do *umbus* a inserção periférica da MT em cobaia, *Guinea pig*, durou 13 dias²⁰.

3.3 Perfuração timpânica

A perfuração timpânica provoca, normalmente, otorreia crônica e deficiência auditiva¹. As infecções causadoras de perfuração timpânicas são mais comuns em países em desenvolvimento, crianças, além de pessoas de classe social mais baixa dos países desenvolvidos. A causa traumática inclui agressões, explosões, traumas penetrantes e barotrauma. As causas iatrogênicas comuns são cirurgia otológica: miringotomia, timpanotomia, colocação de tubos de ventilação, estapedotomias^{2,3}.

Perfurações agudas traumáticas são associadas a perda auditiva condutiva inicial, diferença aéreo-óssea entre 13 e 32 decibéis (dB), geralmente com cicatrização espontânea, não determinando sequela auditiva^{21,22}. Nos casos de perfuração da MT, a perda auditiva ocorre por diminuição da área útil de vibração da MT. Uma perfuração de MT, de 0 até 25% do total desta área, pode causar uma perda de 12dB; perfurações de 26 a 50% podem causar até 22dB; e de 50 a 95% da área, as perdas podem ser de 28dB²³.

3.4 Cicatrização do tímpano



A cicatrização espontânea da perfuração timpânica, deriva de um avanço da camada epidérmica, formando uma união entre as margens do defeito timpânico, servindo de guia para a proliferação celular das camadas média e interna da MT^{24,25}; após perfuração da parte tensa da membrana, a retração das bordas da lesão tem início imediato. Em 48h, a hipertrofia do epitélio, o crescimento das bordas e das paredes da perfuração, são visualizados. O provável mecanismo da cronificação é a ocorrência de uma falha do crescimento epitelial, resultando em uma fistulização das camadas da MT, por epitelização das bordas da perfuração²⁶.

O provável mecanismo da cronificação da perfuração é a ocorrência de uma falha do crescimento epitelial, resultando em uma fístula crônica, caracterizada pela epitelização de suas bordas^{26,27}. Estudos demonstram, que a cicatrização total da perfuração inicia com o avanço da camada epidérmica, formando uma ponte entre as margens do defeito, guiando a proliferação celular das camadas média e interna da MT^{24,25}; a cicatrização da camada fibrosa é secundária, dependendo da distribuição vascular²⁵.

O reparo destas perfurações é estudado em duas correntes: a primeira explica que as matrizes proteicas servem de guia para o tecido de cicatrização na MT^{1,28}; a segunda, é mantida pela proliferação celular, através dos moduladores de crescimento e de fluxo sanguíneo^{29,30}.

O mecanismo normal de cicatrização pode ser dividido em: hemostasia, inflamação, proliferação, remodelação e contração. Inicialmente, há ação das plaquetas junto aos debrís celulares, formando trombos e vasoconstricção, promovendo hemostasia. Segue-se extravasamento de neutrófilos, citocinas e macrófagos nas bordas da ferida, promovendo a prevenção de infecção, e a



transformação da matriz de fibrina, iniciando a proliferação de fibroblasto e colágeno. O tecido de granulação servirá como matriz de epitelização¹². O início da cicatrização da MT é igual ao do tecido cutâneo, diferindo as fases proliferativa e migratória^{31,32}.

No manejo da perfuração timpânica aguda é indicada apenas a inspeção, evitando a manipulação da orelha, durante as duas primeiras semanas pós- trauma, devido ao risco aumentado de contaminação, exceto na existência de material contaminado no conduto auditivo externo ou infecção otológica ativa. Gotas otológicas antibióticas não são necessárias, podendo favorecer infecções oportunistas³³.

A cicatrização espontânea das perfurações traumáticas agudas apresenta índices elevados^{5-10,20}. A cicatrização espontânea apresentou correlação positiva com a idade do paciente, e correlação negativa com perfurações maiores de 50% da MT, presença de otorréia, manipulação do conduto auditivo por lavagem (introdução de líquido por seringa) em perfurações agudas, e lesão por instrumento penetrante e persistência deste no conduto auditivo externo. A localização da perfuração na MT não mostrou diferença na cicatrização⁸.

No caso de perfurações crônicas, a opção cirúrgica é a terapêutica de escolha, buscando a restauração da barreira formada pela MT, entre a orelha média e externa, a resolução dos quadros infecciosos e a proteção das janelas redonda e oval, restabelecimento da capacidade vibratória, com esperada melhora do limites auditivos²⁷.

3.5 *Chichilla laniger*

A MT tem similaridades entre as espécies da classe mamária, sendo a humana mais espessa^{2,34}.

Chinchilla é o nome genérico dos mamíferos roedores da família *Chinchillidae*, nativa da Cordilheira dos Andes, no Chile; significando literalmente "Chincha Pequena"; *chinch* é o nome dos nativos dos Andes, que utilizavam o pelo deste animal para compor peças do seu vestuário, no período em que os conquistadores espanhóis chegaram a esta região (Figura 1)³⁵.

O primeiro registro escrito deste animal surge no século XVI, quando um padre espanhol descreve as *Chinchillas* no seu livro sobre os animais da cordilheira dos Andes. Este animal sofreu extermínio, para retirada de sua pele, chegando a restar apenas 14 espécimes. No início do último século, um criador conseguiu reproduzir a espécie em cativeiro³⁵.



Figura 1. *Chinchilla laniger*



A semelhança da MT e da orelha externa, do *Chinchilla* e do homem, foi descrita em estudo experimental; após esta publicação, o *Chinchilla laniger* tornou-se um modelo de perfurações crônicas da MT¹³.

O *Chinchilla* apresenta um conduto auditivo externo curto e largo, facilitando a visualização da MT, aproximadamente 8mm de diâmetro; difere da humana, pela menor espessura e menor diâmetro. Estruturalmente, a diferença está na menor quantidade de fibras circulares, pertencentes a lâmina própria da camada média, deste animal^{13,34,36-39}. As curvas timpanométricas, também mostram similaridade⁴⁰.

O modelo de perfuração timpânica criada no *Chinchilla*, estruturalmente semelhante ao humano, mostrou na margem um tecido conjuntivo, coberto por camada fina de epitélio escamoso, com contato medial a face mucosa, além de hiperplasia e hipertrofia destas camadas¹³.

Em *Chinchillas*, o tratamento clínico e cirúrgico das perfurações foi realizado em diversos ensaios experimentais. O fechamento das perfurações crônicas foi comparado, empregando-se o uso do enxerto autógeno e a membrana de biopolímero em chinchilas⁴¹. O estímulo a cicatrização da perfuração com o uso o estímulo do fator de crescimento epidérmico foi empregado¹³; também, o uso do fator de crescimento de fibroblasto induzindo o fechamento das perfurações⁴².

A eficácia não cirúrgica do uso de derivados de plaquetas para tratamento de perfuração crônica da MT em chinchila não foi observada⁴³. O AlloDerm® (AlloDerm® Regenerative Tissue Matrix, LifeCell Corporation) foi utilizado como enxerto no tratamento da PT^{44,45}. O uso da celulose biossintética em perfuração traumática de MT em *Chinchilla laniger* foi testado com sucesso⁴⁶.

MATERIAIS E MÉTODOS



4.1 População e local do estudo

Foram incluídos no estudo 10 espécimes machos de *Chinchilla laniger*, pesando 350 a 500 gramas, com seis meses a um ano de idade, sem sinais de infecção, procedentes do biotério de experimentação no Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob supervisão veterinária de acordo com normas institucionais.

Durante os meses de junho e julho de 2009, período do experimento, os animais permaneceram em gaiolas individuais, com piso forrado por maravalha, com iluminação artificial durante 12h diárias e em ambiente aclimatado. Os chinchilas recebiam ração específica, constituída por: uva-passa, ameixa, milho, semente de girassol, aveia, alfafa e arroz integral. Foi utilizado suplemento alimentar para *Chinchilla laniger* e água *ad libitum*. Visando reduzir o estresse dos animais em cativeiro, disponibilizou-se pó de calcário para banho, segundo orientação dos criadores. Após o estudo, os espécimes seguiram para cuidados de criadores particulares, não houve sacrifício de nenhum animal.

4.2 Desenho do estudo

Estudo experimental, prospectivo e analítico.

4.3 Seleção da amostra

Um total de 10 animais tiveram suas orelhas estudadas em duas fases:

- ❖ 1ª fase: Usada para determinar a velocidade de migração epitelial da MT;
- ❖ 2ª fase: Usada para avaliar a cicatrização espontânea total da perfuração timpânica subaguda, induzida experimentalmente.



4.4 Procedimentos técnicos

4.4.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados previamente a todos os procedimentos cirúrgicos sobre a MT. Utilizou-se ketamina na dosagem de 25mg/Kg, administrado na coxa direita, e thiobarbital na dose de 25mg/Kg na coxa esquerda, ambos por via intramuscular. Os animais após o procedimento anestésico, foram colocados na mesa cirúrgica, em decúbito lateral, com a cabeça posicionada na direção oposta do pesquisador.

4.4.2 Determinação da velocidade de migração epitelial da MT

4.4.2.1 Marcação da membrana timpânica (dia 0)

As MT (n=20) dos animais foram marcadas à tinta nanquim azul (ponto), anteriormente ao *umbus*. Foi realizada a fratura da proeminência óssea existente na parede póstero-superior do conduto auditivo externo, à altura do ânulo timpânico com a introdução e abertura do espéculo aural auto-estático de Holmgreen. Foi usada fita milimetrada em todos os procedimentos da 1ª fase.

A imagem obtida da MT incluía: o *umbus*, o manúbrio do martelo, o ânulo timpânico (porção inferior), o ponto marcado, e a fita milimetrada (Figura 2); esta removida após o registro fotográfico em todos os procedimentos (Apêndice 1).

A fita milimetrada colocada em contato com o tímpano visou padronizar as medidas observadas na MT, pois a magnificação, promovida pelo microscópio e captada pela câmera fotográfica digital, variavam.

Padronizou-se a medida de 1 mm, em todos os registros fotográficos. Considerou-se, esta etapa de procedimento, o dia 0 do experimento.



4.4.2.2 Avaliação da migração epitelial (dia 7)

Decorridos sete dias da marcação (dia 7 do experimento), foi realizada nova avaliação de cada orelha (n=20).

As duas imagens, dia 0 e dia 7, foram comparadas mensurando-se a distância do ponto marcado ao *umbus*, definindo seu deslocamento na MT e, consequentemente, a velocidade de migração epitelial.

A determinação da velocidade de migração epitelial, primeira fase do experimento, foi realizada através da observação da mudança de localização do ponto marcado na MT (dia 0 e dia 7); calculando-se a velocidade deste deslocamento em relação ao *umbus*.

4.4.2.3 Perfuração da membrana timpânica (dia 7)

No dia 7, após a captação da imagem, realizou-se uma perfuração da MT, localizada no quadrante ântero-inferior, com o auxílio de estilete incandescente (n=20). Os animais receberam uma dose de antibiótico profilático (cefalotina 100mg/Kg) em dose única (Figura 3).

4.4.2.4 Avaliação da perfuração timpânica - fechamento

Catorze (n=14) orelhas foram submetidas a avaliação nos dias 14, 17, 21 e 28 dias, ou até cicatrização espontânea total (fechamento completo da perfuração). Três animais morreram nesta fase do experimento.

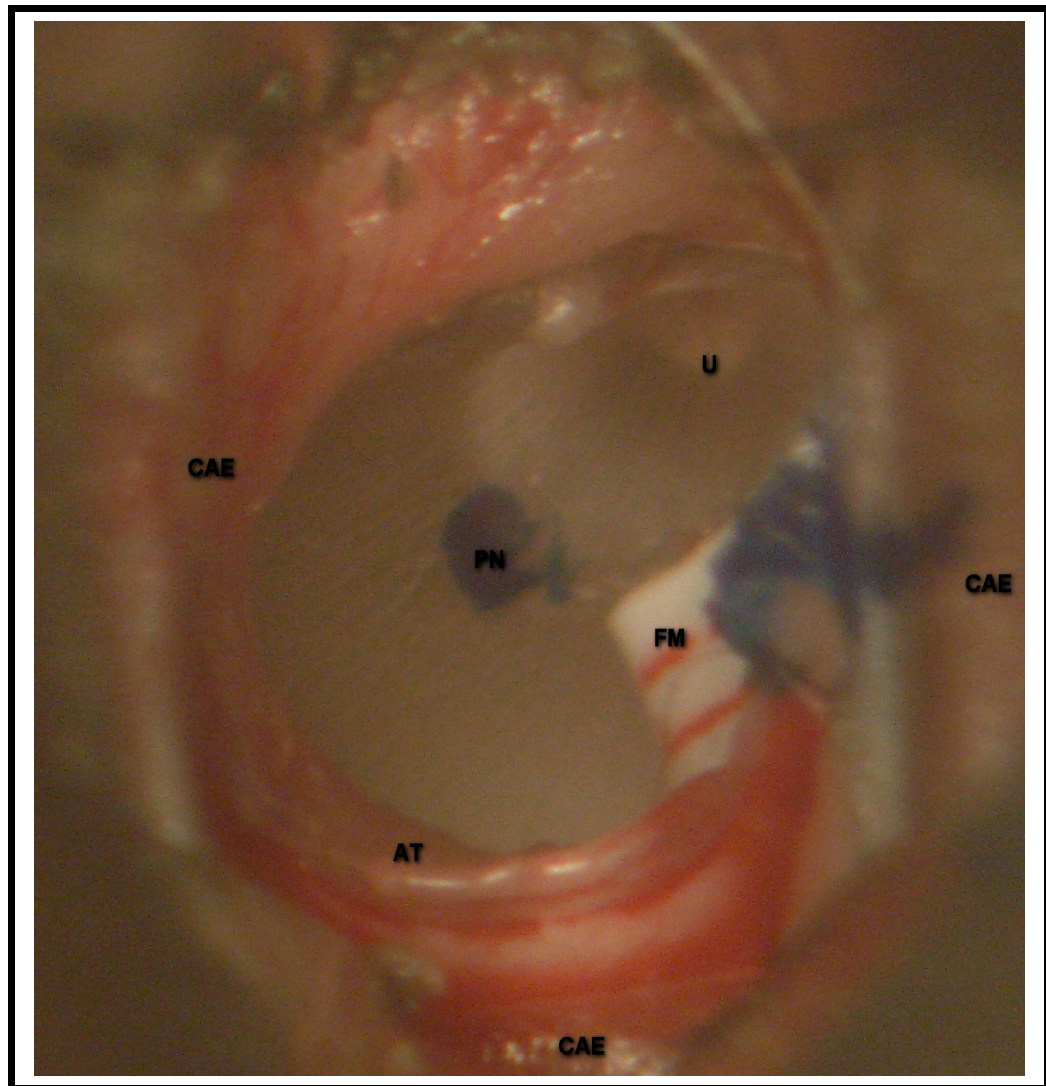


Figura 2. Aspecto da MT do chinchila. U– *umbus*, FM– fita milimetrada, AT– ânulo timpânico, PN– ponto marcado a tinta, CAE- conduto auditivo externo.

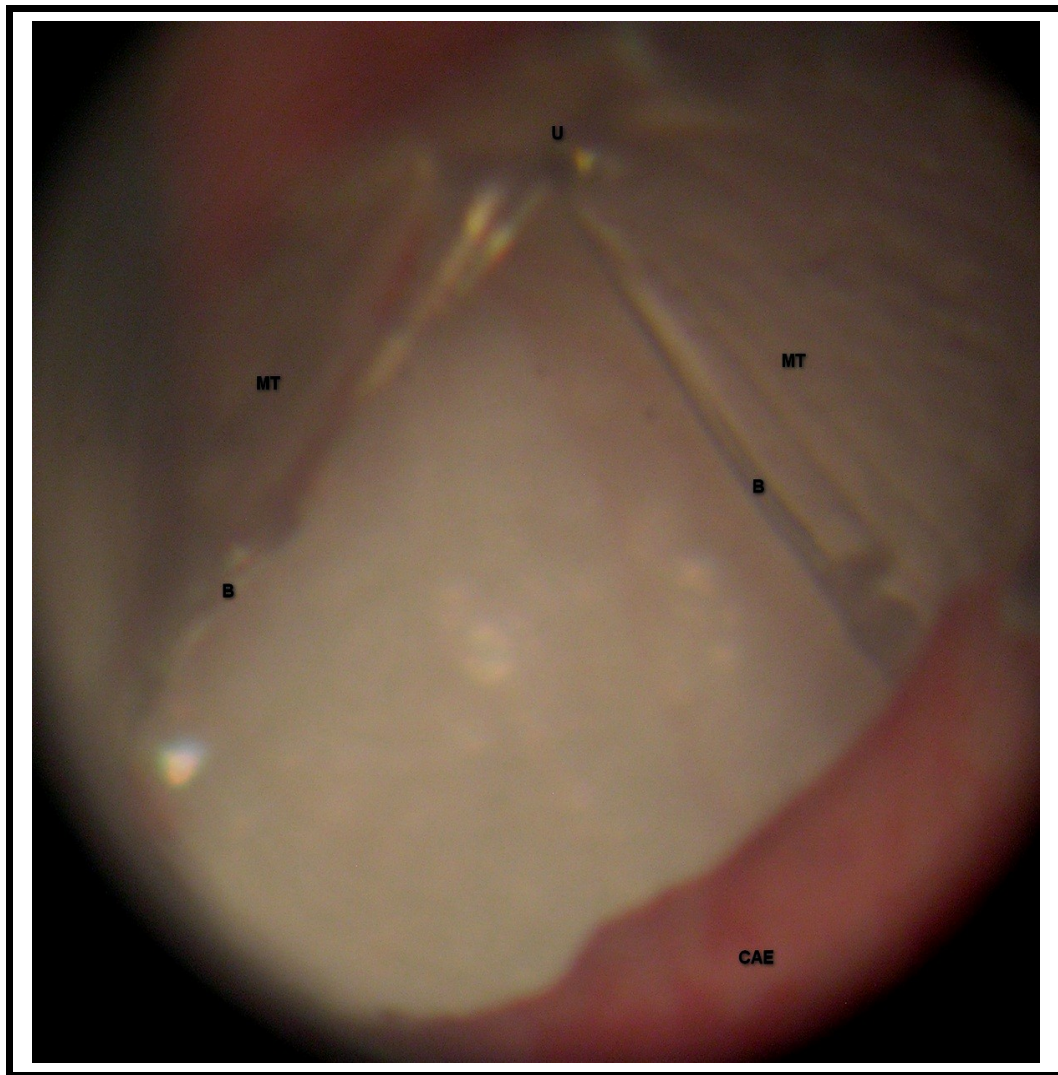


Figura 3. Aspecto da perfuração timpânica subaguda experimental no chinchila. MT- membrana timpânica, U- *umbus*, B- borda da perfuração, CAE- conduto auditivo externo.



4.5 Material empregado para microscopia e aquisição de imagens

Todos os procedimentos foram realizados sob microscopia, utilizando um microscópio cirúrgico D.F.Vasconcelos ® modelo FC 250; e uma câmera fotográfica digital OLYMPUS ® 4 megapixels, modelo C-765 Ultra Zoom, 10 X optical zoom.

4.6 Procedimentos analíticos

Para calculo da relação, entre a velocidade da migração epitelial e o tempo de cicatrização espontânea total da perfuração, foi empregada a correlação linear de Pearson (coeficiente de correlação), pois avalia duas variáveis de um mesmo indivíduo (a velocidade de migração epitelial e o tempo de cicatrização espontânea total da perfuração subaguda induzida).

A evidência obtida na correlação linear de Person, foi corroborada por um teste *t* bicaudal.

4.7 Procedimentos éticos

Esta pesquisa foi aprovada e seguiu os princípios que regem o código de ética experimental e as leis de proteção aos animais de acordo com as normas vigentes no Brasil, Lei 9.605 - art.32 e Decreto número 3.179-art. 17, de 21/09/1999 que trata da questão e normas para prática científica de vivisseção de animais.

O Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da UFPE (CCB-UFPE) estabeleceu aprovação integral em parecer concedido em 10 de março de 2009, ofício nº119/09, processo 23076.001455/2009 (Anexo 1).

RESULTADOS



Resultados

A mensuração da migração epitelial, primeira fase do experimento, avaliou 20 orelhas ($n=20$). As imagens obtidas foram estudadas no software FastStone Image View® 3.8, mensurando-se a distância do ponto marcado ao *umbus*. As imagens obtidas no dia 0 e dia sete foram comparadas, a diferença foi igual ao deslocamento do ponto sobre a MT. Os dados das duas imagens foram normalizados, com o uso do software Microsoft Excel®, e colocados em forma de tabela.

Tabela 1. Deslocamento do ponto marcado na MT, dia 0-dia 7.

<i>Chinchilla</i>	Deslocamento total (mm)	
	Orelhas	
	Direita	Esquerda
1	0,749	0,773
2	0,599	1,422
3	0	1,166
4	1,599	0,424
5	0,500	0,057
6	0,500	0,045
7	0,281	0,399
8	0,285	0,935
9	2,472	0,833
10	0,199	1,200

A migração epitelial ocorreu em todas as MT, exceto uma. A média do deslocamento do ponto foi de 0,7425mm em 7 dias, seus valores variaram de 0 e 2,472mm em 7 dias (Tabela 1).

A velocidade de migração epitelial mensurada no chinchila, apresentou uma média de 0,095153, erro padrão 0,0218, variando de 0 até 0,35317mm/dia (Tabela 2).



Resultados

Tabela 2. Velocidades de deslocamento do ponto marcado na MT

<i>Chinchilla</i>	Velocidade média (mm/dia)	
	Orelhas	
	Direita	Esquerda
1	0,10714	0,01105
2	0,08571	0,20317
3	0	0,16667
4	0,22857	0,06061
5	0,07143	0,00824
6	0,07143	0,06531
7	0,04018	0,05714
8	0,04082	0,01337
9	0,35317	0,11905
10	0,02857	0,17143
	Média	0,095153
	Erro Padrão da Média	0,021829

Na análise do tempo de cicatrização espontânea total da perfuração, segunda fase, foi realizada a perfuração timpânica experimental. As reavaliações demonstraram tempo de cicatrização espontânea total de 10,07, erro padrão de 2,79, variando de 7 a 21 dias (n=14) (tabela 3).

Tabela 3. Tempo para a cicatrização espontânea total da perfuração subaguda

<i>Chinchillas</i>	Cicatrização espontânea total da perfuração timpânica (dias)	
	Orelhas	
	Direita	Esquerda
1	7	7
2	7	10
3	21	21
4	10	10
6	7	7
7	8	8
8	10	14
Média	10,07 dias, erro padrão da média 2,79	



Resultados

A velocidade de migração epitelial e o tempo de cicatrização espontânea total da perfuração subaguda, foi estudada através da correlação linear de Pearson, índice de 0,004, este valor evidencia a ausência da correlação entre as variáveis. Valores foram agrupados em diagrama de dispersão, facilitando a visualização dos dados. Esta assertiva foi corroborada por um teste *t* bicaudal, com nível de rejeição 0,01 (1%), indicando confiabilidade no teste realizado, mostrando que as duas variáveis são independentes (Gráfico1). (migração epitelial)

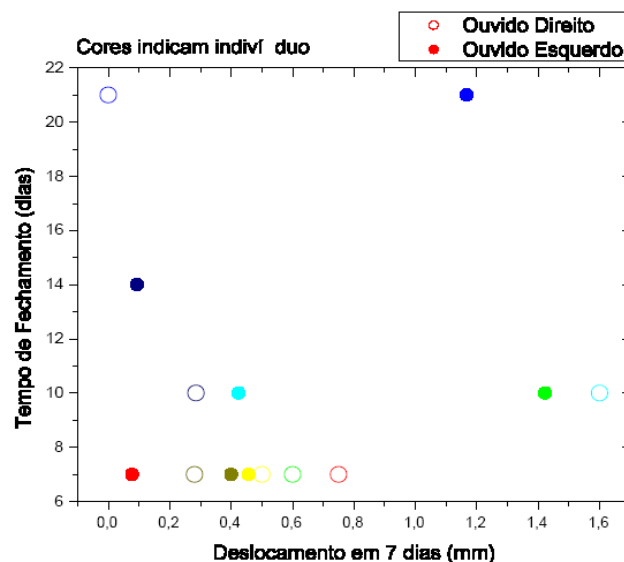


Gráfico 1. Disposição da relação: deslocamento do ponto (dia 0 – dia 7) e tempo para cicatrização espontânea total da perfuração (dias).

DISCUSSÃO



Grande parte das perfurações da membrana timpânica são decorrentes de traumas ou infecções³⁻⁷. Quando a perfuração ocorre, as funções da MT são prejudicadas, como proteção contra infecções da orelha média e suas estruturas, e transmissão sonora^{1,47}.

A maioria das perfurações timpânicas cicatriza espontaneamente, sem sequelas funcionais^{5-10,20}. O mecanismo fundamental na cicatrização da MT é o avanço da camada externa do tímpano^{24,25}; a ausência desta reparação espontânea, seria decorrente de uma falha do crescimento epitelial²⁶, porém a razão de algumas membranas não cicatrizarem, cronificando a perfuração, é desconhecida.

A falha da migração epitelial seria a causa esperada da cronificação das perfurações timpânicas. Buscando responder esta questão, procurou-se identificar a influência da velocidade desta migração epitelial sobre a cicatrização espontânea total de perfurações timpânicas na orelha do chinchila.

Inicialmente, determinou-se a velocidade migração epitelial no *Chinchilla laniger* 0,095+-0,021 mm/dia, sendo o primeiro modelo de migração epitelial estudado nesta espécie; resultado maior do que o mensurado na orelha humana 0,07mm/dia¹⁷. Apenas uma orelha (n=20) não apresentou o fenômeno da migração.

O modelo por ser inédito, ainda esta à prova e pode não corresponder ao ideal.

O número de animais utilizados no experimento seria um fator limitador na expressão deste dado (10 chinchilas), pois uma amostra maior aumentaria o grau de confiança na análise dos dados (correlação entre as variáveis testadas). O número restrito de animais justifica-se pelas questões éticas, dificuldade de manuseio dos animais e seu alto custo.



A aplicação da tinta nanquim no mesmo ponto de todas as MT foi um procedimento difícil, devido a precisão do ato e a dimensão da orelha, convencionamos um ponto no quadrante ântero-inferior. A localização do ponto marcado sobre os diferentes quadrantes da MT poderia modificar o resultado obtido.

Na mensuração dos dados, a utilização de imagens digitais e medidas computadorizadas, diminuiu a influência da observação humana.

O *Chinchilla laniger* foi escolhido para o estudo, por ser um espécime animal consagrado no estudo da otite média crônica¹³. As semelhanças entre as orelhas e o tímpano, do homem e do chinchila, justificam esta assertiva^{13, 34, 36-40}. Porém, sua labilidade, sua manutenção e seu custo são fatores limitadores para seu uso experimental^{13,41,46}.

O intervalo de observação das orelhas foi padronizado em 7 dias, pois não podíamos acompanhar diariamente os animais, em virtude dos procedimentos serem realizados sob anestesia geral, e o chinchila é, bastante, sensível ao estresse.

A relação entre a migração epitelial e a cicatrização espontânea total da perfuração subaguda do tímpano, não foi encontrada. Identificou-se nesta amostra, a inexistência da correlação entre as duas variáveis testadas; o teste de Pearson, 0,004, demonstrou este dado, corroborado por um teste *t* com significância de 0,01, isto é, independência das variáveis.

A inexistência de correlação entre a migração epitelial e a cicatrização espontânea total da MT perfurada apresentada por este estudo, apresenta hipóteses e críticas diversas.



A ausência de estudos prévios, experimentais ou clínicos, da correlação entre a migração epitelial e a cicatrização espontânea, dificulta a confecção de parâmetros, ou mesmo a análise comparativa entre estudos.

O tamanho da perfuração timpânica pode ser relacionado como fonte de erro neste estudo experimental. A totalidade da perfuração pode ser relacionada a migração epitelial, além do local desta lesão ter influência sobre esta variável ou o tempo de cicatrização espontânea. A perfuração, do nosso estudo, contemplou o quadrante antero-inferior da MT, local marcado para a fase de mensuração da migração epitelial.

A migração epitelial pode não estar relacionada a cicatrização espontânea da MT, isto é, o avanço das pontes epiteliais da cicatrização de uma perfuração timpânica não teria relação com a migração epitelial normal.

CONCLUSÃO



Conclusões

Neste estudo, a velocidade da migração epitelial na membrana do tímpano do *Chinchilla laniger* foi de 0,095 mm/dia.

Não foi observada, correlação entre a velocidade da migração epitelial e a taxa de cicatrização espontânea total da perfuração timpânica subaguda na membrana timpânica do *Chinchilla laniger*.

REFERÊNCIAS



1. Oliveira JAA, Hyppolito MA, Netto JC, Mrué F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003;69:138-55.
2. Gladstone HB, Jackler RK, Varav K. Tympanic membrane wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am.* 1995;28:913-32.
3. Calmels MN, Viana C, Wanna G, Marx M, James C, Deguine O, Fraysse B. Very far-advanced otosclerosis: stapedotomy or cochlear implantation. *Acta Otolaryngol.* 2007;127:574-8.
4. Ibekwe TS, Ijaduola GT, Nwaorgu OG. Tympanic membrane perforation among adults in West Africa. *Otol Neurotol.* 2007;28:348-52.
5. Persaud RD, Hajioff MW, Chevretton E. Otological trauma resulting from the Soho Nail Bomb in London, April 1999. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2003;28:203-6.
6. Berger G, Finkelstein Y, Harell M. Non-explosive blast injury of the ear. *J Laryngol Otol.* 1994;108:395-8.
7. Berger G, Finkelstein Y, Avraham S, Himmelfarb M. Patterns of hearing loss in non-explosive blast injury of the ear. *J Laryngol Otol.* 1997;111:1137-41.
8. Orji FT, Agu CC. Determinants of spontaneous healing in traumatic perforations of the tympanic membrane. *Clin Otolaryngol.* 2008;33:420-6.
9. Kristensen S. Spontaneous healing of traumatic tympanic membrane perforations in man: A century of experience. *J Laryngol Otol.* 1992;106:1037-50.
10. Kristensen S, Juul A, Gammelgaard NP, Rasmussen OR. Traumatic tympanic membrane perforations complications and management. *Ear Nose Throat J.* 1989;68:503-16.



11. Litton WB. Epidermal Migration in the ear: The location and characteristics of the generation center revealed by utilizing a radioactive desoxyribose nucleic acid precursor. *Acta Otolaryngol.* 1968;240:1-39.
12. Boedts D, Kuijpers W. Epithelial migration on the tympanic membrane. An Experimental Study. *Acta Otolaryngol.* 1978;85:248-52.
13. Amoils CP, Jackler RK, Lusting LR. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992; 107:669-83.
14. Nobrega M. Anatomia e fisiologia da orelha média. In: Campos CAH, Costa HOO, editores. *Tratado de Otorrinolaringologia.* São Paulo: Rocca; 2002. p. 377-81.
15. Gartner LP, Hiatt JL, editores. *Tratado de Histologia.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p. 431-40.
16. Khanna SM, Tonndorf J. Tympanic membrane vibration in cats studied by time-averaged holography. *J Acoust Soc Am.* 1972;51:1904-20.
17. Alberti PWRM. Epithelial migration on the tympanic membrane. *J Laryngol Otol.* 1964;78:808-30.
18. Litton WB. Epithelial migration over tympanic membrane and external canal. *Arch Otolaryngol.* 1963;77:254-7.
19. Deong KK, Prepageran N, Raman R. Epithelial migration of the postmyringoplasty tympanic membrane. *Otol Neurotol.* 2006;27:855-8.
20. Griffin WL Jr. A retrospective study of traumatic tympanic membrane perforations in a clinical practice. *Laryngoscope.* 1979;89:261-82.
21. Conoyer, J. Matthew MD; Kaylie, David M. MD; Jackson, C. Gary MD Otologic surgery following ear trauma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007; 137:757-61.



22. Vartiainen E, Nuutinen J. Success and pitfalls in myringoplasty: follow-up study of 404 cases. *Am J Otol*. 1993;14:301-5.
23. Austin DF. Sound conduction of the diseased ear. *J Laryngol Otol*. 1978; 92: 367-93.
24. Hellström S, Bloom GD, Berghem L, Stenfors LE, Soderberg O. A comparison of hyaluronan and fibronectin in the healing of tympanic membrane perforations. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1991;248:230-5.
25. Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. A two-dimensional histologic study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol*. 1990;109:406-15.
26. Spiegel JH, Kessler JL. Tympanic membrana perforation repair with acellular porcine submucosa. *Otol Neurotol*. 2005;26:563-6.
27. Bento RF, Miniti A, Marone SAM, editores. *Tratado de otologia*. São Paulo: EDUSP; 1998.
28. Laidlaw DW, Costantino PD, Govindaraj S, Hiltzik DH, Catalano PJ. Tympanic membrane repair with a dermal allograft. *Laryngoscope*. 2001;111:702-7.
29. 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;109:262-6.
30. Ramalho JRO, Bento RF. Healing of subacute tympanic membrane perforations in chinchillas treated with epidermal growth factor and pentoxifylline. *Otol Neurotol*. 2006;27:720-7.
31. McMinn RMH, Taylor M. The citology of repair in experimental perforations of the tympanic membrane. *Br J Surg*. 1966;53:222-32.



32. Reeve DR. Repair of large experimental perforations of the tympanic membrane, J Laryngol Otol. 1977; 91:767-78.
33. Toner JG, Kerr AG, editors. Ear trauma. Scott Brown's Otolaryngology. New York: Kerr AG, Booth JB. 1997.
34. Lim DJ. Human tympanic membrane: An ultrastructural observation. Acta Otolaryngol. 1970;70:176-86.
35. Wikipédia, A enciclopédia livre [internet], Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Chinchila>.
36. Masaki M, Wright C, Lee D, Meyerhoff W. Effects of otic drops on chinchilla tympanic membrane. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1988;114:1007-11.
37. Vrettakos P, Dear S, Saunders J. Middle ear structure in the chinchilla: a quantitative study. Am J Otolaryngol. 1988; 9: 58-67;
38. Siedentop KH, O'Grady K, Bhattacharyya TK, Shah A. Fibrin tissue adhesive and autologous concha cartilage for reconstruction of the posterior-superior canal wall of the chinchilla middle ear. Otol Neurotol. 2004;25: 220-2.
39. Weber DE, Semaan MT, Wasman JK, Beane R, Bonassar LJ, Megerian CA. Tissue-engineered calcium alginate patches in the repair of chronic chinchilla tympanic membrane perforations. Laryngoscope. 2006;116:700-4.
40. Margolis RH, Paul S, Saly GL, Schachern PA. Wideband reflectance tympanometry in chinchillas and humans. J Acoust Society Am. 2001;110:1453-64.
41. Silva DB, Aguiar JLA, Marques A, Coelho, ARB. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana de açúcar e fásia autóloga em *Chinchilla laniger*. An Fac Med Univ Fed Pernamb. 2006; 51:45-51.



42. Kato M, Jackler RK. Repair of chronic tympanic membrane perforations with fibroblast grow factor. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996;115:538-46.
43. Soumekh B, Hom DB, Levine S, Juhn SK, Antonelli PJ. Treatment of chronic tympanic-membrane perforations with a platelet-derived releasate. *Am J Otol.* 1996;17:506-11.
44. Saadat D, Ng M, Vadapalli S, Sinha UK. Office myringoplasty with alloderm. *Laryngoscope.* 2001;111:181-4.
45. Downey TJ, Champeaux AL, Silva AB. AlloDerm tympanoplasty of tympanic membrane perforations. *Am J Otolaryngol.* 2003;24:6-13.
46. Diniz JD. Da utilização de celulose biossintética na cicatrização de perfuração traumática de membrana do tímpano em *Chinchilla laniger*. [Tese doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 2001.
47. Boedts D. Tympanic membrane perforations. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 1995;49:149-58.

APÊNDICE



Apêndice 1. Mensurações da distância do *umbus* ao ponto marcado na MT,
dia 0 e dia 7

		1mm = cm	dist cm	1mm = cm	dist cm
				dia 7	dia 7
C1	od	2	3,5	2,5	2,5
C1	oe	2,8	4,3	2,4	3,5
C2	od	2	8	2,5	8,5
C2	oe	2,5	2	1,8	4
C3	od	1	1,3	1	1,3
C3	oe	1,2	3,8	1,5	3
C4	od	1	1,2	2,5	7
C4	oe	1,1	1	3	4
C5	od	3	0,5	1,5	1
C5	oe	2	0,5	2,6	0,5
C6	od	1,2	3	1,5	3
C6	oe	2,5	4	3,5	4
C7	od	2	1,5	3,2	1,5
C7	oe	2	2,7	2	3,5
C8	od	1,4	2,2	2,8	5,2
C8	oe	2,9	1,8	1,4	1
C9	od	1,2	3,5	2,7	1,2
C9	oe	1,2	1,2	3	0,5
C10	Od	1	2,2	1	2
C10	Oe	0,5	1,1	1	1

Anexos



Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 10 de março de 2009

Ofício nº 119/09

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Prof.º: Silvio Caldas Neto**
Departamento de Cirurgia - CCS
Processo nº 23076.001455/2009 - 19

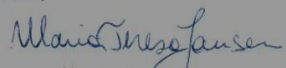
Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado *“Influência da migração epitelial no fechamento da perfuração timpânica: estudo experimental em Chinchila.”*

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof.ª Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

Observação:
Origem dos animais: Criadouro; Animal: Chinchila laniger;
Sexo: Machos; Idade: Adultos jovens; Número de animais previsto no protocolo: 10 animais.

CCB: Integrar para desenvolver

Anexo 2. Artigo formatado conforme Otology & Neurotology, Lippicott Williams & Wilkins será submetido para avaliação do Conselho Editorial



Influence of epithelial migration in spontaneous healing of tympanic perforation in *Chinchilla laniger*

Viana Pereira C¹, Caldas Neto SS¹, Leao RAS¹, Vasconcelos C¹, Viana Pereira L²

¹ Federal University of Pernambuco. ² Federal University of Alagoas. Recife, Brazil

Hypothesis

The epithelial migration of tympanic membrane (TM) has been suggested since the 19th century for the self cleaning capacity of the external auditory canal (EAC)¹.

Tympanic perforation is a frequent clinical problem especially in developing countries^{2,3}, as a result of trauma, infections, tumors or iatrogenic causes^{4,5,6,7}. Most acute perforations heals spontaneously although the reason why this tympanic damage does not close in some TM is unknown^{3,5,6,7,8,9,10}.

The *Chinchilla laniger* is the model animal for chronic ear changes, especially perforations, due to its similarity to human ears¹¹, but the pattern of epithelial migration of its TM was not yet described.

This capacity for spontaneous healing was probably influenced by the epithelial migration, which is not uniform for all membranes. This fact justifies a study aiming to correlate epithelial migration velocity of the eardrum to the rate and speed of total spontaneous healing of tympanic perforations.

This research has been approved by the Center for Biological Sciences Ethics Committee for Animal Experiments of the Federal University of Pernambuco (CEEAA-



UFPE), according to principles guiding the code of ethics for experiments as well as animal protection laws instituted by Brazilian legislation for scientific research.

Methods

This is an experimental, nonrandomized, prospective study. This study was conducted from June 2009 to August 2009, at Federal University of Pernambuco. Ten male specimens of *Chinchilla laniger*, weighing 350 to 500 grams, aged six months to a year were enrolled in the study; specimens with pathological alterations of the TM were excluded.

The animals were anesthetized before the start of the experiments by an intramuscular application of ketamine (25mg/kg) and thiobarbital (25mg/kg). All procedures were performed under microscopy and captured in digital images.

The experiment was divided into two phases; Phase 1 was a determination of the speed of tympanic membrane epithelial migration, and Phase 2 was an evaluation of the spontaneous healing of the induced subacute tympanic perforation.

During the first phase, 20 ears (n=20) were marked with blue nankin ink dot at the TM, anterior to the *umbus* (day 0) and re-evaluated on the 7th day. A self-retaining aural Holmgren speculum was introduced. A measuring tape was put over the TM surface in all Phase 1 procedures, in order to standardize the captured images and to calculate the distance between the *umbus* and the ink dot.

The two images, captured on Day 0 and on Day 7 were compared by measuring the distance from the ink marked dot to the NT to the *umbus*, thus



establishing its displacement in the TM, and determining the velocity of epithelial migration.

During Phase 2 of the experiment, a perforation was made on the animals TM, anteroinferior quadrant, with an incandescent knife (n=20). The animals received a one time dosage of prophylactic antibiotics (cephalotine, 100 mg/kg). Fourteen ears (n=14) were evaluated on days 14, 17, 21 and 28 or until full healing of the perforation.

Background

The part tense, fibro-elastic, of TM area is responsible for transmitting sound. The external epidermal layer of Tm is related to the epithelial migration phenomenon^{12,13}.

The epithelial migration phenomenon has been researched since the 19th century due to CAE self cleaning characteristics^{1,2}; migration of the corneal extract superficial layer is responsible for removal of keratin and cerumen from the TM and from external auditory canal thus maintaining its vibratory function^{4,18}. Mitotic activity at the TM is exacerbated in the MT tensa area, near the tympanic annulus and the *manubrium* of the malleus^{1,15,16}.

The epithelial migration was described by using paper discs around the malleus as a movement towards posterosuperior direction of TM². The direction of the migration in animal models was determined by using nankin ink, from anterior to posterior in the MT and laterally in the external auditory canal ¹.

The interest to find out the workings, or the answer, of the TM in situations of acute or subacute perforations is a concern due to the risk of a chronic tympanic perforation.



Spontaneous healing of the tympanic perforation is due to the advancement of an epidermal layer which leads to bonding of the margins of the tympanic fault thus serving as a guide for the proliferation of the TM middle and inner cellular layers¹⁷; this process begins immediately after perforation of the area tensa of the MT along with retraction of the shoulders of the injury. In 48 hours, epithelial hypertrophy and a growth on the perforation's shoulders and walls can be seen. Probable mechanism for the chronic state is failure of epithelial growth resulting in a fistula of the MT layer by a re-epithelization of the perforation's shoulders¹⁸.

Many authors described great indices of spontaneous healing in acute tympanic perforation^{19,20}. The location of perforation in the TM was not shown to affect healing²⁰.

Although the healing process of tympanic perforations is a well studied subject either in animals and humans, it is not quite well established why some does not heal. Although, epithelial advancement is the first step to heal a tympanic perforation, it is reasonable to imagine that this process could be influenced by the rate of epithelial migration.

The chronic TP model created in the chinchilla was structurally similar to the human, showing a margin of conjunctive tissue covered by a thin layer of squamous epithelium, resulting in a medial contact with the mucous face¹¹.

Results



Epithelial migration occurred in all TMs, except one. Average displacement from the ink dot was 0,742mm in 7 days, with amounts varying from 0 to 2,472mm in 7 days (Table 1). The measured epithelial migration was 0,095 mm/day, standard error 0,021, varying from 0 to 0,353 mm/day (Table 2).

Table 1. Ink dot displacement, 0-7 day.

<i>Chinchilla</i>	Displacement (mm)
	Ear
	Right
1	0,749
2	0,599
3	0
4	1,599
5	0,500
6	0,500
7	0,281
8	0,285
9	2,472
10	0,199

This experiment measured, for the first time in the literature, the epithelial migration velocity of the TM in the chinchilla; the migration of the human ear is 0,07 mm/day¹⁵. The transit time from the *umbus* to peripheral insertion of the TM in a guinea pig lasted an average of 13 days¹⁶.

**Tabela 2.** Velocity of ink dot (epithelial migration) displacement.

<i>Chinchilla</i>	Velocity – epithelial migration (mm/dia)	
	Ear	
	Right	
1	0,10714	
2	0,08571	
3	0	
4	0,22857	
5	0,07143	
6	0,07143	
7	0,04018	
8	0,04082	
9	0,35317	
10	0,02857	
	Mean	0,095153
	Standard erro	0,021829

At Phase 2, all TM showed complete spontaneous healing, with perforations closing on an average of 10,07 days, standard error 2,79, varying from 7 to 21 days (n=14).

The relationship between the epithelial migration velocity and the time to total spontaneous healing of subacute tympanic perforations was studied using Pearson linear correlation, 0,004. This correlation was grouped in a scatter diagram, pointing out a lack of correlation among the variables. This assertion was corroborated by a two-tailed *t* test with a rejection level of 0,01 (1%).

The absence of a correlation between the epithelial migration rate and the perforation healing observed in this study may reveal that the cellular migration of the epidermal layer of the TM follows principles other than those leading the advancement of epidermis in the perforation margins. However, some aspects must be considered related to the experimental model used.



First, the size of perforation, involving only one quadrant, may have been too small. If we have made a subtotal perforation, perhaps the rate of spontaneous healing could be different, with some cases of permanent perforation that could be related to the epithelial migration velocity.

Secondly, as there is no previous study of epithelial migration in chinchilla, this animal model is still to be proved as an ideal one¹¹. It is important to state that the chinchilla was chosen for this experiment because its ear size was more adequate for the technical procedures than other animals used, as rats or gerbils. Maybe, further studies describing more precisely the epithelial migration in chinchilla could allow in the future new attempts to relate this parameter with TM healing.

Finally, the sample size, due to ethics and financial restrictions, as well as to the characteristic fragility of the specimen may have been insufficient to prove our hypothesis.

Conclusions

In this study, we were able to observe that the epithelial migration occurs in the TM of the *Chinchilla laniger* and total spontaneous healing of tympanic perforations occurs in all ears. The mean epithelial membrane migration velocity of *Chinchilla laniger* was 0.095 mm/day. Any correlation was found between epithelial migration speed and time of total spontaneous healing of the subacute tympanic perforation at TM of *Chinchilla laniger*.

Referências



1. Boedts D, Kuijpers W. Epithelial migration on the tympanic membrane. An Experimental Study. *Acta Otolaryngol.* 1978; 85:248-52.
2. Gladstone HB, Jackler RK, Varav K. Tympanic membrane wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am*, 1995; 28:913-32.
3. Calmels MN, Viana C, Wanna G, Marx M, James C, Deguine O, Fraysse B. Very far-advanced otosclerosis: stapedotomy or cochlear implantation. *Acta Otolaryngol.* 2007;127:574-8.
4. Ibekwe TS, Ijaduola GT, Nwaorgu OG. Tympanic membrane perforation among adults in West Africa. *Otol Neurotol.* 2007; 28:348-52.
5. Persaud RD, Hajioff MW, Chevretton E. Otological trauma resulting from the Soho Nail Bomb in London, April 1999. *Clin. Otolaryngol Allied Sci.* 2003; 28:203-6.
6. Berger G, Finkelstein Y, Harell M. Non-explosive blast injury of the ear. *J Laryngol Otol.* 1994;108:395-8.
7. Berger G, Finkelstein Y, Avraham S, Himmelfarb M. Patterns of hearing loss in non-explosive blast injury of the ear. *J Laryngol Otol.* 1997; 111:1137-41.
8. da Lilly-Tariah OB, Somefun AO. Traumatic perforation of the tympanic membrane in University of Port Harcourt Teaching Hospital, Port Harcourt. Nigeria. *Niger Postgrad Med J.* 2007; 14:121-4.
9. Kristensen S. Spontaneous healing of traumatic tympanic membrane perforations in man: A century of experience. *J Laryngol Otol.* 1992; 106:1037-50.
10. Kristensen S, Juul A, Gammelgaard NP, Rasmussen OR. Traumatic tympanic membrane perforations Complications and management. *Ear Nose Throat J.* 1989; 68:503-16.



11. Amoils CP, Jackler RK, Lusting LR. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992; 107: 669-83;
12. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de Histologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2^a ed; 2003. p. 431-40.
13. Nobrega M. Anatomia e Fisiologia da Orelha Média. In: Campos CAH, Costa HOO. *Tratado de Otorrinolaringologia.* São Paulo: Rocca; 2002. p. 377-81.
14. Boedts D. Tympanic membrane perforations. *Acta Otorhinolaryngologica Belg.* 1995, 49:149-58.
15. Alberti PWRM. Epithelial migration on the tympanic membrane. *J Laryngol Otol.* 1964; 78:808-30.
16. Litton WB. Epithelial migration over tympanic membrane and external canal. *Arch Otolaryngol.* 1963; 77: 254-7.
17. Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. A two-dimensional histologic study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 1990; 109: 406-15.
18. Spiegel JH, Kessler JL. Tympanic membrana perforation repair with acellular porcine submucosa. *Otol Neurotol.* 2005; 26:563-6.
19. Griffin WL Jr. A retrospective study of traumatic tympanic membrane perforations in a clinical practice. *Laryngoscope* 1979; 89:261-82.
20. Orji FT, Agu CC. Determinants of spontaneous healing in traumatic perforations of the tympanic membrane. *Clin Otolaryngol.* 2008; 33:420–6.



Pereira, Corinto Viana

Influência da migração epitelial na cicatrização da perfuração timpânica em *Chinchilla laniger* / Corinto Viana Pereira. – Recife: O Autor, 2009.

xi, 48 folhas: il., fig., tab., gráf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Cirurgia, 2009.

Inclui bibliografia, anexos e apêndice.

Perfuração da membrana timpânica. 2. Membrana timpânica - Cicatrização. I. Título.

612.855
612.854

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2010-053