

PATRÍCIA FERREIRA DOS SANTOS



**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS ACHADOS
OTOMICROSCÓPICOS E HISTOLÓGICOS DA
MIRINGOESCLEROSE INDUZIDA EM RATOS:
ESTUDO CRÍTICO DE UM MODELO EXPERIMENTAL**

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

ORIENTADOR

PROF. DR. SILVIO DA SILVA CALDAS NETO

Professor Adjunto da Disciplina de Otorrinolaringologia da
Universidade Federal de Pernambuco

Chefe do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital das
Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE

2003

Santos, Patrícia Ferreira dos

Análise comparativa entre os achados otomicroscópicos e histológicos da miringoesclerose induzida em ratos : um estudo crítico de um modelo experimental / Patrícia Ferreira dos Santos. – Recife : O Autor, 2003.

xx, 46 folhas : il., tab., fotos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Cirurgia, 2003.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Otologia – Miringoesclerose. 2. Miringoesclerose – Exame otomicroscópico e histológico – Estudo comparativo. I. Título.

616.28

CDU (2.ed.)

UFPE

617.8

CDD (21.ed.)

BC2003-428

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Lins

VICE-REITOR

Prof. Geraldo Marques Pereira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Celso Pinto de Melo

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. Heloísa Mendonça de Moraes

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

Prof. Sílvio Romero Marques

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Carlos Teixeira Brandt

VICE-COORDENADOR

Prof. Sílvio Caldas Neto

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz
Prof. Antonio Roberto de Barros Coelho
Prof. Carlos Augusto Mathias
Prof. Carlos Roberto Ribeiro de Moraes
Prof. Carlos Teixeira Brandt
Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo
Prof. Edmundo Machado Ferraz
Prof. Frederico Teixeira Brandt
Prof. Jairo de Andrade Lima
Prof. Joaquim Alves Norões
Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar
Prof. Marcelo Silveira
Prof. Nelson Costa Rego Caldas
Prof. Oyama Arruda Frei Caneca
Prof. Renato Dornelas Câmara Neto
Prof. Ricardo José Caldas Machado
Prof. Salvador Vilar Correia Lima
Prof. Saulo Monteiro dos Santos
Prof. Sílvio Romero de Barros Marques
Prof. Tércio Souto Bacelar

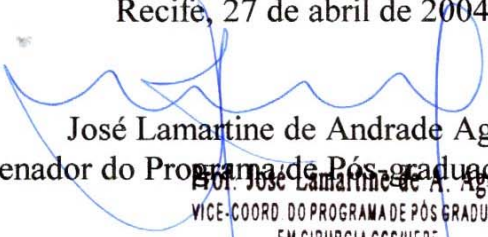


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
NÍVEL DE MESTRADO E DOUTORADO

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, e a quem interessar possa, que o **SRA. PATRÍCIA FERREIRA SANTOS**, TURMA 2002 – foi aluna do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia, Nível Mestrado, Área de Concentração: Cirurgia Clínica e Experimental, defendeu tese intitulada: **“ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS ASPECTOS OTOMICROSCÓPICOS E OS ACHADOS HISTOLÓGICOS DA MIRINGOESCLEROSE INDUZIDA EM RATOS: UM ESTUDO CRÍTICO DE UM MODELO EXPERIMENTAL”**, em 23.12.2003, às 9:00 horas, no Auditório Jorge Lobo, no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, com o conceito “Aprovada”, emitida pela Banca Examinadora, composta pelos Professores: Jairo de Andrade Lima (Presidente), Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE, Carlos Augusto de Carvalho Mathias, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE e Fernando Moraes, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE.

Recife, 27 de abril de 2004.


José Lamartine de Andrade Aguiar
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia

PROF. JOSÉ LAMARTINE DE A. AGUIAR
VICE-COORD. DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIRURGIA CCS/UFPE
NÍVELS MESTRADO E DOUTORADO
CRM-3415 CPF 045 998 514-20

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Carlos** e **Jesus**, e a minha irmã **Carla**, pelo incentivo e dedicação durante todo o decorrer da minha formação profissional.

Ao meu marido, **Ricardo**, grande companheiro desde o início do curso médico, pela compreensão e pela paciência com a minha ausência.

À minha filha, **Marina**, iluminação da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr Silvio Caldas** pelo apoio, incentivo e orientação desse trabalho.

Ao meu Mestre **Prof. Dr Nelson Caldas** pelos ensinamentos e incentivo.

Ao **Prof. Dr Roberto José Vieira de Melo** pela ajuda na interpretação dos achados histológicos.

Aos histotécnicos do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da UFPE, **Silvania Tavares** e **Sidcley Bernardino**, pela preparação das lâminas no estudo histológico.

Ao **Prof. José Eulálio** pelo ensinamento da análise estatística.

Ao **Prof. Dr Luciano Montenegro** pela ajuda na realização das fotografias.

A **todos** aqueles que colaboraram com este trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE	xi
ABREVIATURAS.....	
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
2.1 Geral.....	05
2.2 Específico.....	05
3. LITERATURA.....	06
3.1 Patologia.....	07
3.2 Incidência.....	08
3.3 Aspectos clínico-cirúrgicos.....	08
3.4 Modelo experimental	09
4.	12
MÉTODOS.....	
4.1 Área de Estudo.....	13
4.2 População de estudo.....	13

4.3 Desenho do estudo.....	13
4.4 Período de referência: coleta.....	13
4.5 Método de coleta.....	14
4.6 Análise estatística.....	15
4.7 Definição das alterações encontradas.....	16
4.7.1 Otomicroscopia.....	16
4.7.2 Histopatologia.....	16
4.8 Definição das variáveis.....	17
4.9 Considerações éticas.....	17
5. RESULTADOS.....	18
6. DISCUSSÃO.....	21
7. CONCLUSÕES.....	38
8. REFERÊNCIAS.....	40
9. ANEXO.....	45
Anexo 1 – Comissão de ética em experimentação animal.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

OM	(Orelha média)
MT	(Membrana timpânica)
UFPE	(Universidade Federal de PE)
UFC	(Unidades formadoras de colônias)
N	(Normal)
I	(Intenso)
L	(Leve)
VPP	(Valor preditivo positivo)
VPN	(Valor preditivo negativo)
CAE	(Conduto auditivo externo)
HE	(Hematoxilina-eosina)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos animais conforme otoscopia.....	19
Tabela 2. Distribuição dos animais conforme histologia.....	19
Tabela 3. Concordância entre os diagnósticos otoscópicos e histológicos...	19
Tabela 4. Acurácia.....	19
Tabela 5. Localização.....	20
Tabela 6. Miringoesclerose.....	20

RESUMO

O presente estudo objetiva avaliar a sensibilidade da otomicroscopia no diagnóstico de miringoesclerose em modelo experimental com ratos. Otite média foi induzida com a inoculação transtimpânica de *Streptococcus pneumoniae* na orelha média direita dos ratos. Foram utilizados 25 ratos Wistar pesando 200-400g. Estes foram examinados através de otomicroscopia quinzenalmente e após 8 semanas sacrificados, tendo suas bulas timpânicas retiradas e preparadas para estudo histopatológico. Na otomicroscopia, os resultados encontrados foram: normal, opacificação leve e opacificação intensa, enquanto que, à histologia, consideramos 5 fases no processo de cicatrização: grau 1 (exsudação), grau 2 (granulação), grau 3 (fibrose), grau 4 (hialinização) e grau 5 (metaplasia). A presença de miringoesclerose foi considerada na otomicroscopia e histologia, respectivamente, como opacificação intensa e grau 4 ou 5. As alterações encontradas nas membranas timpânicas dos ratos por otomicroscopia foram comparadas com as alterações histológicas. Obtivemos como resultado uma concordância significativa entre os métodos otomicroscópicos e histopatológicos ($p = 0,290$), demonstrando ter a otomicroscopia boa especificidade (78%) e sensibilidade (80%) em relação ao diagnóstico de miringoesclerose.

ABSTRACT

The present study evaluates the accuracy of the otomicroscopy in the diagnosis of myringosclerosis in rats. Otitis media was induced by transtympanic inoculation of *Streptococcus pneumoniae* into the right middle ear of 25 Wistar rats weighting 200 to 400 g. They were submitted to otomicroscopy every two weeks, and, after 8 weeks, they were sacrificed for hystologic studies of their tympanic membranes. At otomicroscopy, the following aspects could be distinguished: normal, mild opacification and severe opacification. At hystologic specimens, five stages of the inflammatory process were considered: stages 1 (exsudation), 2 (granulation), 3 (fibrosis), 4 (hialinization), and 5 (metaplasia). Myringosclerosis was considered to be present at otomicroscopy and hystology in the cases of severe opacification and stages 4 or 5, respectively. The abnormalities found on the rats' tympanic membranes were compared with the hystologic data, showing an agreement between the two methods, and demonstrating that otomicroscopy has good specificity and sensitivity for the diagnosis of myringosclerosis.

INTRODUÇÃO

A timpanoesclerose é o termo usado para descrever uma alteração histológica que ocorre na mucosa da orelha média (OM) e mastóide caracterizada por hialinização, calcificação e/ou ossificação¹. Foi descrita pela primeira vez por Von Tröltsch em 1873, relatando um processo patológico caracterizado por rigidez da mucosa da OM². Posteriormente, Zöllner, em 1955, introduziu o termo timpanoesclerose³.

A timpanoesclerose é o estágio final de um processo originado a partir de inflamação aguda, crônica ou recorrente da lâmina própria da OM. Durante a inflamação aguda, a lâmina própria torna-se edematosa e infiltrada por células inflamatórias. Estas mudanças são reversíveis, podendo, portanto, nenhuma sequela ocorrer com a resolução do processo infeccioso. Porém, em alguns casos, sobretudo quando o processo inflamatório se tornar crônico ou recidivante, pode ocorrer um infiltrado progressivo de fibroblastos, causando um aumento de fibras colágenas que origina uma formação pobre em células e em vasos sanguíneos, que sofre a seguir degeneração hialina e deposições calcáreas^{1,4}, podendo haver mesmo formação de cartilagem e/ou de tecido ósseo⁵. Estas alterações podem trazer prejuízos funcionais para a unidade timpano-ossicular, causando perda auditiva condutiva e repercutindo nas decisões cirúrgicas durante as timpanoplastias.

Quando a timpanoesclerose atinge a membrana timpânica (MT), ela pode ser diagnosticada à otoscopia, tomando um aspecto de placas brancas com extensão variável⁶.

Modelos experimentais têm sido utilizados para indução de timpanoesclerose desde 1971. Esses modelos costumam ser estudados com base na otoscopia, otomicroscopia e histopatologia. As vantagens da avaliação otomicroscópica da MT

em relação ao estudo histológico são a facilidade e rapidez com que é feita, os menores custos envolvidos e a não necessidade de sacrifício do animal. Entretanto, não sabemos até que ponto os achados otomicroscópicos podem ser confiáveis na identificação da miringoesclerose. A falta de uma correlação entre a otomicroscopia e a confirmação histológica, por razões óbvias, podem levar à conclusões inadequadas nos estudos que envolvam a indução de miringoesclerose em modelos experimentais. Nenhum trabalho da literatura de pesquisa atentou para a correlação detalhada, em cada animal, dos dois achados. Este estudo, portanto, se propõe a avaliar o grau de correlação entre o aspecto otomicroscópico e os achados histopatológicos da MT de ratos que sofreram indução de miringoesclerose.

OBJETIVOS

2.1 Geral

- ◆ Determinar a sensibilidade do exame otomicroscópico na identificação de áreas de miringoesclerose em ratos submetidos a inoculação da OM com *Streptococcus pneumoniae*.

2.2 Específico

- ◆ Comparar o aspecto das membranas timpânicas consideradas normais ou patológicas ao exame otomicroscópico com os achados do exame histológico das mesmas.
- ◆ Comparar, em termos de localização e intensidade, as áreas de esclerose identificadas na MT à otomicroscopia com as áreas de miringoesclerose percebidas ao exame histopatológico.

LITERATURA

3.1 Patologia

Em 1873, Von Troltsch descreveu um processo patológico com considerável rigidez da membrana mucosa da OM e, eventualmente, degeneração calcárea ou óssea². Mudanças similares foram reportadas por Walb (1878), que encontrou, na OM, neoformação de tecido conectivo com degeneração hialina⁷. Depois do final do século poucos trabalhos mostraram qualquer interesse neste quadro patológico, até que Zöllner, em 1956, publicou nove casos encontrados durante cirurgias de timpanoplastia⁸. Neste trabalho o termo timpanoesclerose foi introduzido.

O quadro histológico predominante da timpanoesclerose é uma neoformação de colágeno na lâmina própria da OM, que se torna pobre em célula e sofre, em seguida, hialinização^{1, 9-11}.

Depósitos calcáreos nessa matriz de colágeno foram primeiramente descritos por House; Sheehy (1960) e Zöllner (1963)^{1,4}.

Ainda em 1961, Harris descreveu duas fases no desenvolvimento da timpanoesclerose: mucosite esclerosante e mucoperiostite osteoplástica¹²

Por meio de estudos de microscopia eletrônica do material timpanoesclerótico não descalcificado, mudanças degenerativas na lâmina própria, com análise detalhada dos depósitos calcáreos foram descritas^{4,13}.

A timpanoesclerose possui uma matriz orgânica na qual o processo de calcificação se dá de modo semelhante ao que ocorre em outros tecidos patologicamente calcificados, como a arteriosclerose¹⁴. Os locais mais

freqüentemente envolvidos são a membrana timpânica (MT), epítimpano, pregas mucosas, músculos, tendões e ligamentos suspensores.

Em 2002, Russell, descreve, como características histológicas básicas da timpanoesclerose, um aumento das fibras colágenas bem como degeneração hialina na lâmina própria¹⁵.

3.2 Incidência

Vários trabalhos procuraram estudar a incidência da timpanoesclerose. Sheehy e House (1962) encontraram timpanoesclerose em 33% de 227 casos cirúrgicos, durante timpanoplastias. A miringoesclerose ocorreu na MT em 83% dos casos e no epítimpano em 37%, havendo fixação ossicular¹⁶.

Em 1988, Austin encontrou timpanoesclerose em 32 % de 1000 orelhas médias operadas para tratamento de diversos tipos de infecção¹⁷.

Bhaya et al (1993) estudaram 319 ossos temporais de indivíduos portadores de otite média crônica e encontraram timpanoesclerose em 14 %, sendo que a MT estava acometida em 89 %; o epítimpano, em 9 %; o mesotímpano, em 15,5 %; o protímpano em 4,5 % e; a mastóide, em 2 %¹⁸. Para Asiri et al (1999), entre 775 casos com otite média crônica, a timpanoesclerose foi encontrada em 90 (11,6 %), dos quais, 50 % acometia apenas a MT; 27 %, apenas a orelha média e; 18 %, ambos¹⁹.

3.3. Aspectos clínico-cirúrgicos

House; Sheehy (1960) descrevem as maneiras de se lidar com a timpanoesclerose encontrada intraoperatoriamente nas timpanoplastias e destacam os cuidados devidos durante a sua remoção e as possíveis complicações dessa manipulação¹.

Alguns autores chegam a considerar a timpanoesclerose como uma contra-indicação de timpanoplastia^{5,9}.

Em 1962, Sheehy; House mais uma vez detalham as repercussões cirúrgicas trazidas pela presença da timpanoesclerose na orelha média em 227 casos de otite média crônica. Neste estudo, eles comentam que houve suspeita pré-operatória de miringoesclerose que não foi confirmada cirurgicamente em 4 casos¹⁶.

Austin (1980) descreve as técnicas de reconstrução ossicular para cada um dos tipos de envolvimento timpano-ossicular pela timpanoesclerose¹⁷. As placas de miringoesclerose que envolvem, ao mesmo tempo, o cabo do martelo e o *anulus timpanicum* ou promontório podem reduzir significativamente a mobilidade timpânica com conseqüente déficit auditivo²⁰.

Asiri et al (1999) comentam que o diagnóstico da miringoesclerose pode ser facilmente feito por meio de otomicroscopia¹⁹

2.4. Modelo experimental

Apesar destes estudos citados e de tantos outros, há consenso entre os autores em que a histopatogênese da timpanoesclerose não é totalmente esclarecida merecendo ser alvo de investigação constante^{14,15,21-25}.

O primeiro estudo de indução experimental de timpanoesclerose foi feito em 1971 por Hybasek, com cobaia²⁶. Desde então, vários outros trabalhos têm-se utilizado de modelos experimentais diversos^{15,27-33}, a maior parte deles utilizando ratos.

Em 1982 foi feita uma descrição detalhada da anatomia da OM do rato e suas estruturas foram descritas como facilmente acessadas por meio da otomicroscopia, justificando a utilização deste animal para experimentos envolvendo a MT e a OM³⁴.

Por meio da inoculação transtimpânica de *Streptococcus pyogenes* na OM de ratos, associada à administração parenteral de vitamina D₃, conseguiu-se induzir a formação de timpanoesclerose e estudar alguns aspectos da sua patogênese. Posteriormente, este mesmo modelo experimental foi utilizado para estudar os efeitos de um antagonista do cálcio no processo de desenvolvimento da

timpanoesclerose. Os achados otoscópicos, entretanto, não são comentados nestes trabalhos^{28,29}.

Wielinga et al (1988) consideram que o modelo experimental de timpanoesclerose induzida em ratos tem alta reprodutibilidade e praticidade, sendo adequado para estudos histológicos desse tipo de processo patológico. Os autores mostram, ainda, que a estrutura da parte tensa da MT do rato é semelhante à dos humanos, com três camadas muito finas. Neste trabalho, os autores chegam a acompanhar as alterações produzidas por obstrução definitiva da tuba auditiva durante até dois anos. Descrevem as alterações otoscópicas como pequenos pontos brancos que se formam a partir das primeiras semanas e vão aumentando em número e tamanho até formar, em alguns casos, grandes placas. Entretanto, não é feita uma correlação entre os diferentes aspectos otoscópicos e a histopatologia. Finalmente, especulam sobre a possibilidade de a retração da MT poder atuar como um gatilho no desencadeamento do processo timpanoesclerótico³⁰.

Em 1988 outro estudo experimental demonstrou que o rato é o melhor animal para a indução de otite média aguda e secretora, pelas similaridades anatômicas e patológicas deste modelo com a OM de crianças. Estas patologias foram induzidas em 29 ratos e os resultados foram avaliados com base no aspecto otomicroscópico das membranas³⁵.

Mattsson et al (1997) estudaram a eficácia da aplicação de anti-radicaais livres na prevenção da miringoesclerose induzida, desta feita, por simples perfuração da MT. Analisam as alterações otomicroscópicas e histológicas, mas não fazem nenhuma correlação precisa entre um aspecto e outro³⁶. Os mesmos autores em 1998, compararam a indução de miringoesclerose por meio da inoculação bacteriana na OM e por meio de perfuração timpânica em ratos. Neste trabalho, os resultados mostram, entre outras coisas, que a miringoesclerose não ocorre em otite média aguda curada espontaneamente e que a miringoesclerose não pode ser diagnosticada por otomicroscopia³⁷.

Perfuração da MT foi novamente utilizada num modelo experimental para induzir miringoesclerose e estudar os efeitos da aplicação tópica de ácido ascórbico

na prevenção deste processo. Os autores descrevem detalhadamente o aspecto otomicroscópico das membranas, referindo as áreas de miringoesclerose como pontos esbranquiçados que posteriormente se confluíam para tomar uma forma em ferradura no quadrante antero-superior. Porém novamente não correlacionam estas imagens com os achados histológicos³².

Forséni Flodin (2001) induziu otite média aguda em ratos, estudando o papel dos macrófagos na patogênese da miringoesclerose³¹. Em seguida (2002), este autor, usou o mesmo modelo para analisar o papel de mediadores inflamatórios na miringoesclerose, que foi induzida em 30% dos ratos³³. Em nenhum desses dois trabalhos foi tentada uma correlação entre os aspectos otomicroscópicos e histopatológicos.

Russell; Giles (2002), da mesma forma que procedeu Wielinga (1988), induziram timpanoesclerose em ratos por meio da obstrução definitiva da tuba auditiva, com o objetivo de observar as etapas de formação da placa de timpanoesclerose por meio de microscopia óptica e eletrônica. Apesar de terem sido feitas otomicroscopias a cada 48 horas, os aspectos desta avaliação também não foram comentados e todos os animais foram sacrificados para o estudo histológico.^{15,30}.

Em 2003, estudo experimental induziu otite média aguda em ratos, e as reações na MT foram avaliadas por meio de otomicroscopia, o aparecimento de placas de miringoesclerose não foi relatado, mas a presença de timpanoesclerose na mucosa da OM foi descrita por meio de exame histológico³⁸.

MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

Núcleo de cirurgia experimental da Universidade Federal de Pernambuco(UFPE): local onde foi realizado todo o trabalho com os animais, desde a sua preparação, inoculação, otomicroscopias, até o sacrifício dos mesmos para o estudo histológico.

Departamento de Anatomia Patológica da UFPE e Departamento de Biologia Celular do Centro de Pesquisa Ageu Magalhães: locais onde foram feitas a preparação e análise das lâminas.

4.2 População de estudo

Vinte e cinco ratos Wistar, sadios, pesando entre 200-400g, adultos jovens, adquiridos no Biotério do Centro de Pesquisa Ageu Magalhães.

4.3 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo experimental, onde o pesquisador cria as condições artificiais, perfeitamente controladas, para estudar um determinado grupo. Longitudinal, prospectivo, como todo estudo experimental, e possível de análise estatística.

4.4 Período de referência: coleta

Agosto de 2002 a dezembro de 2002 (Desde a etapa de inoculação da bactéria na orelha média dos ratos a preparação das lâminas para estudo histológico).

4.5 Método de coleta

Os 25 animais foram mantidos num mesmo local, Núcleo de Cirurgia Experimental, mantidos em gaiolas individuais com piso de serragem de madeira de pinho, iluminação artificial, temperatura ambiente e alimentados com ração padrão Rhostr®. Os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% por injeção intra-peritoneal, após o que foram colocados sobre a bancada cirúrgica, em decúbito lateral esquerdo, de modo a expor a orelha direita para o pesquisador.

Os ratos foram examinados por otomicroscopia, utilizando-se um microscópio cirúrgico marca D.F. Vasconcelos, de coluna, modelo MC-M31. Não foi utilizado espéculo auricular. Utilizando-se uma seringa descartável de 1ml ref.1196 marca Kramer , foi inoculada, na orelha média direita de cada espécime, por via transtimpânica, 0,1 ml de solução contendo 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) de *Streptococcus pneumoniae* tipo 3, após o que os animais foram devolvidos às suas respectivas gaiolas^{31,33}.

Por um período de 8 semanas, foram realizadas, por dois examinadores simultaneamente, otomicroscopias quinzenais em todos os ratos, sob anestesia geral, realizada da mesma forma descrita acima. Após 1 semana todos os ratos apresentaram otite e na última otomicroscopia, as membranas timpânicas foram fotografadas com câmera digital marca Sony, modelo MVC-FD73, acoplada ao sistema de divisão de raios do microscópio. Além de fotografadas as membranas, eram anotadas e desenhadas as alterações encontradas pelos examinadores. Após isto, os ratos foram sacrificados com dose letal de hidrato de cloral^{34,39}.

Após o sacrifício dos ratos as bulas timpânicas foram retiradas, isolando-se das mesmas a MT juntamente com o conduto auditivo externo. As peças foram fixadas em formaldeído a 10% e descalcificadas em ácido nítrico a 7,5 %. No

processo pós-fixação as bulas foram colocadas na estufa por 40 minutos em álcool absoluto e 20 minutos em álcool-xilol e, posteriormente colocadas no xilol fora da estufa, para então, agora desidratadas, serem emblocadas em parafina (50 minutos). O material foi então seccionado com cortes sempre axiais de 4µm de espessura, com intervalos de 50µm, interessando toda a MT, e corado com hematoxilina e eosina, para ser, então, examinado sob microscopia óptica.

Todos os procedimentos que poderiam trazer sofrimento para os animais, como inoculação intratimpânica do *Streptococcus pneumoniae*, otomicroscopia e o sacrifício para a retirada do material, foram realizados sob anestesia geral com hidrato de cloral a 10% intra-peritoneal e após todos os cuidados de assepsia e antissepsia.

4.6 Análise estatística

Os dados foram descritos sob forma de frequências absolutas e relativas conforme as categorias estudadas. Para a comparação entre os diagnósticos otoscópicos e histológicos, o teste de McNemar foi empregado, visto que eram os mesmos indivíduos avaliados em duas oportunidades.

A avaliação de concordância entre os diagnósticos pelas referidas técnicas foi feita pela determinação do índice Kappa atribuindo-se os seguintes escores para o nível de concordância 0-20 (fraca), 20-40 (sofrível), 40-60 (regular), 60-80 (boa), 80-100 (ótima)⁴⁰.

A determinação da acurácia (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN)) foi realizada reunindo-se os diagnósticos otoscópicos normal (N) e leve (L) em uma categoria e o intenso (I) em outra; e o diagnóstico histológico reunindo-se o N e o grau ≤ 3 em uma categoria e o grau > 3 na outra.

4.7. Definição das alterações encontradas

4.7.1. Otomicroscopia

À otomicroscopia, foram definidos os seguintes tipos de aspecto:

- a. **MT normal** – Definida como uma membrana timpânica delgada e transparente;
- b. **Opacificação leve** – Definida como uma perda leve da transparência da MT, podendo ocorrer difusamente ou como áreas isoladas;
- c. **Opacificação intensa** – Definida como uma perda total da transparência, com nítido espessamento da MT, difusamente ou em áreas isoladas.

4.7.2. Histopatologia

Ao exame histológico, foram caracterizadas as fases do processo inflamatório que culminou com a miringoesclerose, sendo definidas 5 fases:

- a. **Fase 1** – de exsudação, caracterizada pelo infiltrado polimorfonuclear intenso;
- b. **Fase 2** – de granulação, caracterizada por intensa neovascularização e presença de elementos do sistema mononuclear macrofágico (fibroblastos, linfócitos, macrófagos);
- c. **Fase 3** – de fibrose, caracterizada pela grande proliferação de fibroblastos e formação de fibras colágenas, com diminuição da vascularização;
- d. **Fase 4** - de hialinização, caracterizada pela diminuição do número de fibroblastos, que são substituídos pelas fibras colágenas, que agora se fundem, formando placas;

- e. **Fase 5** – de calcificação, caracterizada pela deposição do cálcio e fósforo, dando à matriz de colágeno um aspecto semelhante a cartilagem ou tecido ósseo⁴¹.

Como, até a fase 3, as alterações vistas são ainda reversíveis, consideramos como mirringoesclerose apenas aquele material que apresenta em pelo menos um dos cortes o aspecto de fase 4 ou 5.

4.8 Variáveis

Neste estudo, a variável dependente foi a timpanoesclerose e a variável independente foi à inoculação de bactéria da OM.

4.9 Considerações éticas

Essa pesquisa seguiu os princípios que regem o código de ética experimental e as leis de proteção dos animais, 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. Teve aprovação integral do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, inclusive concordando que o sacrifício destes animais neste estudo justificasse pelo fato de não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico⁴².

RESULTADOS

Tabela 1. Distribuição dos animais conforme otoscopia.

Diagnóstico (Classificação)	n	%
Normal	4	16,0
Leve	13	52,0
Intensa	8	32,0
Total	25	100,0

Tabela 2. Distribuição dos animais conforme histologia.

Diagnóstico (Classificação)	n	%
Normal	4	16,0
≤ 3	15	60,0
> 3	6	24,0
Total	25	100,0

Tabela 3. Concordância entre os diagnósticos otoscópicos e histológicos.

		Histológico		
		> 3	≤ 3	Normal
Otoscópio	Intenso	4	5	0
	Leve	1	10	1
	Normal	0	1	3
	Total	5	16	4

Comparação: Teste de McNemar: $p=0,290$
Índice Kappa 0,46

Tabela 4. Acurácia.

		Histológico	
		>3	≤ 3 ou Normal
Otoscópio	Intenso	4	5
	Leve/Normal	1	15

Medidas de associação e intervalo de confiança de 95%

Sensibilidade: 80,0% (29,9 – 98,9)
Especificidade: 75,0% (50,6 – 90,4)
VPP: 44,4% (15,3 – 77,3)
VPN: 93,8% (67,7 – 99,8)

Tabela 5 – Localização

Coincide		Não coincide	
n	%	n	%
17	68,0	8	32,0

Tabela 6 – Miringoesclerose

		<i>Histológico</i>	
		+	–
Otosopia	+	4	4
	–	2	15

Medidas de associação e intervalo de confiança de 95%

Sensibilidade:	66,7%	(24,1 – 94)
Especificidade:	78,9%	(53,9 – 93)
VPP:	50%	(17,4 – 82,6)
VPN:	88,0%	(62,3 – 97,9)

DISCUSSÃO

A timpanoesclerose tem sido motivo de inúmeros estudos na literatura, pois sua ocorrência pode causar déficit funcional auditivo³⁰, bem como dificuldades técnicas durante a realização de timpanoplastias^{1,5,9,16,17}. É um processo patológico bastante prevalente em nosso meio, pois acompanha, com muita freqüência, as infecções agudas e, sobretudo, crônicas da mucosa da OM¹⁶⁻¹⁹. Sua etiologia e patogênese não são totalmente esclarecidas e uma melhor compreensão destes aspectos poderá trazer possibilidades futuras de tratamentos preventivos.

Por isso, são extremamente importantes os trabalhos experimentais que busquem definir melhor todas as etapas patológicas do desenvolvimento da timpanoesclerose, os fatores histoquímicos e as alterações moleculares envolvidas. Alguns desses trabalhos podem utilizar a avaliação otomicroscópica e/ ou histopatológica para estudar a incidência e a dinâmica da formação da timpanoesclerose em animais, frente a um possível fator etiológico ou terapêutico. Mann, por exemplo, em 1986, estuda a incidência da timpanoesclerose induzida pela inoculação de *Streptococcus pneumoniae* na OM de ratos, associada à administração parenteral de altas doses de vitamina D₃, analisando, assim, uma hipótese etiológica já evidente na prática clínica²⁸.

Outro trabalho experimental que estudou uma outra possibilidade etiopatogênica foi o de Wielinga et al, que, em 1988, correlacionaram o aparecimento da miringoesclerose com a retração da MT causada por obstrução permanente da tuba auditiva³⁰. Já Mattsson et al (1998) avaliaram o papel da miringotomia na gênese da miringoesclerose³⁷. Em 2002, Russell; Giles tentaram estabelecer a correlação etiopatogênica entre a otite média secretora (induzida por meio de obstrução da tuba auditiva) e a progressão do processo

timpanoesclerótico¹⁵. Tonnaer et al (2003) procuram comparar o desenvolvimento da miringoesclerose frente a estímulos antigênicos e não-antigênicos³⁸.

Outros estudos procuram compreender a dinâmica etiopatogênica da timpanoesclerose, caracterizando as alterações histológicas e ultraestruturais dessa entidade. É o caso dos trabalhos de Forséni Flodin (2001), que detalhou a atuação dos macrófagos durante todas as fases do processo inflamatório, desde a etapa supurativa até a etapa de reparação, quando tomam características de osteoclastos. Como também em 2002, estudou a presença de macrófagos, linfócitos T e B, interleucina 6, fator de indução da óxido nítrico sintetase (iNOS) e MHC classe II^{31,33}.

Há ainda aqueles trabalhos que objetivam encontrar algum efeito benéfico de substâncias no sentido de impedir a progressão da doença timpanoesclerótica. Como é o caso do estudo em que é demonstrada, a capacidade de um antagonista do cálcio de obstruir a deposição deste elemento na matriz extracelular da mucosa inflamada²⁹, e em outro que avalia o efeito preventivo de anti-radicais livres sobre o desenvolvimento da miringoesclerose³⁶. Já Spratley et al (2001) mostram claramente a eficácia da aplicação tópica de ácido ascórbico em membranas de ratos perfuradas³². O próprio trabalho de Forséni Flodin (2002), já comentado, abre janelas para a possibilidade de se interferir na dinâmica da timpanoesclerose por meio de drogas anti-inflamatórias³³.

Finalmente, há os trabalhos que se destinam apenas à apresentação ou discussão de um modelo experimental.^{26,23,35,30,36}.

A utilização de ratos em modelo experimental tem contribuído bastante, na medida que torna possível a indução de otite média e timpanoesclerose. A alta reprodutibilidade destes trabalhos oferece, portanto, possibilidade de estudo dos efeitos das drogas, re-aeração da OM, comportamento evolutivo da lesão e estudos histológicos em qualquer estágio da doença³⁰. Apesar de a função de algumas estruturas da OM, como o músculo tensor do tímpano e a tuba auditiva, serem ainda pobremente compreendidas, como também algumas condições patológicas como o colesteatoma e otite média secretora, onde a patogênese é desconhecida. A

maior parte da nossa compreensão vem de trabalhos experimentais. Como a anatomia da OM difere apreciavelmente de uma espécie para a outra, a seleção da espécie influenciará consideravelmente o resultado³⁴.

Trabalhos como o de Hermansson (1988) demonstraram que é possível induzir otite na OM de ratos e comentam a similaridade das mudanças ocorridas em resposta à infecção bacteriana com aquelas encontradas na otite média em crianças³⁵. Os ratos demonstraram ser adequados em estudos experimentais de otite média, são de valor na pesquisa otológica por muitas razões. Por exemplo as estruturas do ouvido médio são facilmente acessadas³⁴. A OM do rato é caracterizada por ter uma bula pequena e tuba de eustáquio horizontal, correspondendo a das crianças, que é mais curta e mais horizontal que a dos adultos³⁵.

Diversos trabalhos experimentais utilizam a otomicroscopia como forma de avaliação do processo timpanoesclerótico^{15,23,26,27,30,32} porém nenhum deles procura fazer uma correlação precisa entre as alterações encontradas nesta avaliação com os achados da histopatologia, não havendo, portanto, nenhum trabalho que demonstre a confiabilidade das imagens vistas à otomicroscopia, ou seja a acurácia deste exame.

Hermansson et al (1988) utilizam a otomicroscopia para avaliação de otite média aguda induzida em ratos. Entretanto, não realizam uma confirmação histológica dos achados otoscópicos, podendo deixar passar despercebida a presença de outros tipos de processos patológicos, como a timpanoesclerose³⁵.

A otomicroscopia é facilmente realizada sob anestesia geral, não causando nenhum sofrimento ao animal e dispensando o sacrifício do mesmo. Evidentemente, a simples observação otomicroscópica da MT não é capaz de fornecer qualquer dado a respeito das alterações histoestruturais ou histoquímicas presentes no processo timpanoesclerótico, aspectos estes fundamentais para a formulação de várias hipóteses etiopatogênicas ou fisiopatológicas. É claro também que a otomicroscopia só permite a identificação da timpanoesclerose ocorrida na MT (miringoesclerose). Já foi demonstrado no homem que a timpanoesclerose

pode ocorrer apenas no interior da orelha média, poupando a MT¹⁶⁻¹⁹. Desta forma, trabalhos realizados usando a otomicroscopia como método isolado de avaliação da timpanoesclerose, podem eventualmente subestimar a incidência da timpanoesclerose, por não conseguir identificar placas que não envolvam a MT.

Entretanto, para aqueles trabalhos dirigidos à introdução de novos modelos experimentais, bem como aqueles destinados a estabelecer análises comparativas tipo caso-controle, a otomicroscopia pode-se prestar muito bem. Também nos estudos cronológicos da progressão da timpanoesclerose a otomicroscopia isolada pode satisfazer plenamente às necessidades metodológicas. Mas, para isso, é essencial que as imagens observadas ao exame otomicroscópico da MT tenham boas especificidade, sensibilidade e acurácia, sob pena, por razões óbvias, de se fazerem interpretações equivocadas da presença ou ausência da miringoesclerose.

A miringoesclerose é em geral uma alteração fácil de ser identificada à otomicroscopia como placas brancas na MT¹⁹, totalmente opacas, que contrastam nitidamente com as áreas normais, que possuem uma transparência bastante expressiva. Todavia, imagens otomicroscópicas de áreas com aspecto intermediário da MT são bastante comuns, normalmente aceitas como normais, não tendo sido encontrado na literatura nenhum estudo histológico dessas áreas. No rato, sobretudo, pelo tamanho reduzido da MT, os aspectos podem-se confundir. Uma opacificação total da MT pode, por exemplo, representar um processo edematoso agudo ou subagudo ou um processo reparativo com ou sem timpanoesclerose.

No presente trabalho, portanto, procurou-se relacionar os achados otomicroscópicos com as alterações encontradas na avaliação histológica da MT. Utilizou-se o rato como animal de experimentação por este apresentar muitas vantagens práticas e semelhanças anatômicas e patológicas com a OM humana, como referem vários autores, e também por ser o animal mais utilizado na literatura para este fim^{30,34,35}.

A técnica de indução da timpanoesclerose por meio da inoculação transtimpânica da OM com o *Streptococcus pneumoniae* foi também escolhida pela sua

simplicidade, assim como foi também a escolha do método anestésico. Só a orelha direita de cada animal foi inoculada para que, durante as otomicroscopias, a orelha esquerda pudesse servir de parâmetro de comparação para a identificação das alterações encontradas no lado em estudo. Foram feitas otomicroscopias quinzenais por um período de 8 semanas porque alguns aspectos da MT podem variar conforme a evolução do processo inflamatório. Algumas alterações das membranas que surgiam no início, demonstravam posteriormente ser decorrentes da inflamação aguda e desapareciam em pouco tempo, para dar lugar, depois, a uma MT normal. As 8 semanas foram escolhidas para o sacrifício dos animais porque, na maior parte dos trabalhos, as alterações histológicas compatíveis com a timpanoesclerose já podiam ser vistas após este período.

O método do exame histológico utilizado, a microscopia óptica com coloração com hematoxilina-eosina(HE) , permite facilmente a identificação de todas as fases do processo inflamatório que culmina com a timpanoesclerose. Esta é definida na literatura como uma degeneração hialina que ocorre na matriz do colágeno que se forma durante o processo de reparação, na qual podem-se depositar cristais de cálcio e fósforo^{1,4,9,10,11-14,25}. Porém, nem sempre esses depósitos ocorrem, podendo o processo timpanoesclerótico caracterizar-se fundamentalmente pela hialinização do tecido colágeno neoformado na lâmina própria.

Assim, no presente trabalho, o processo inflamatório/reparativo foi graduado didaticamente em cinco fases: de supuração, granulação, esclerose, hialinização e calcificação. Para efeito de análise estatística, separamos estas fases em dois aspectos histológicos: com miringoesclerose (quando, em pelo menos um corte se identificavam as fases 4 ou 5) e sem miringoesclerose (quando só se percebiam alterações típicas das fases 1, 2 ou 3).) As figuras 1 a 11 mostram o aspecto histológico da MT normal e das diferentes fases evolutivas do processo inflamatório/reparativo.

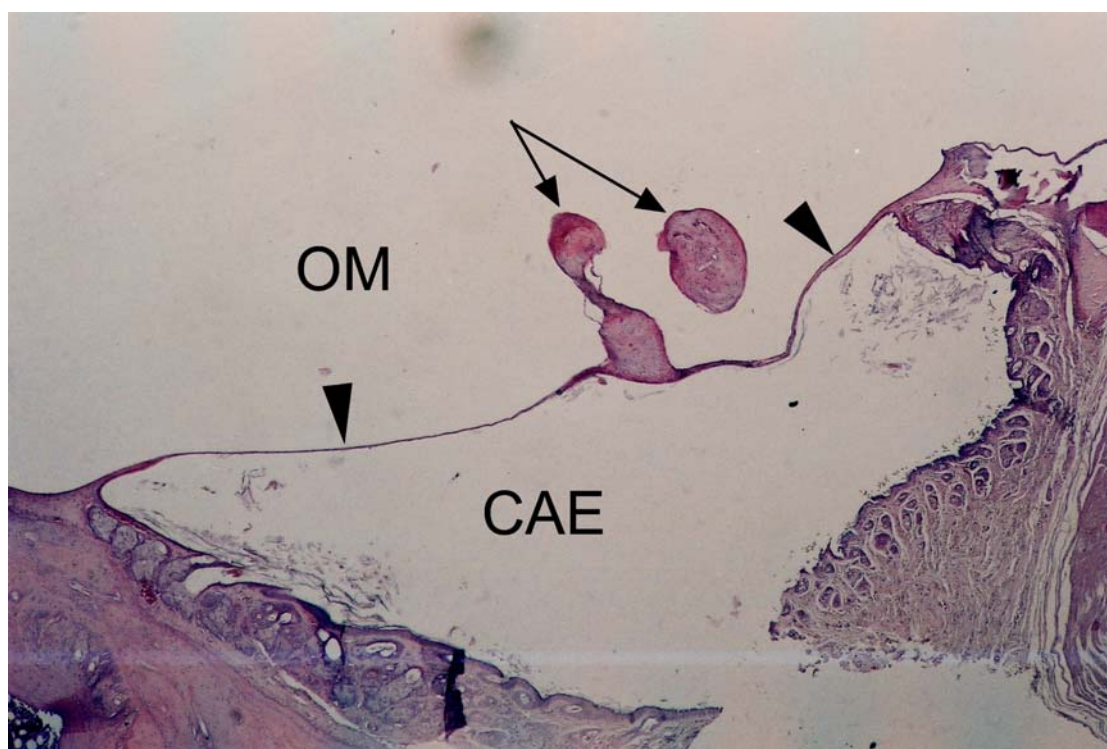


Fig. 1 – HE, 10X: Note-se a MT normal (cabeças de seta), os ossículos (setas), a orelha média (OM) e o conduto auditivo externo (CAE).



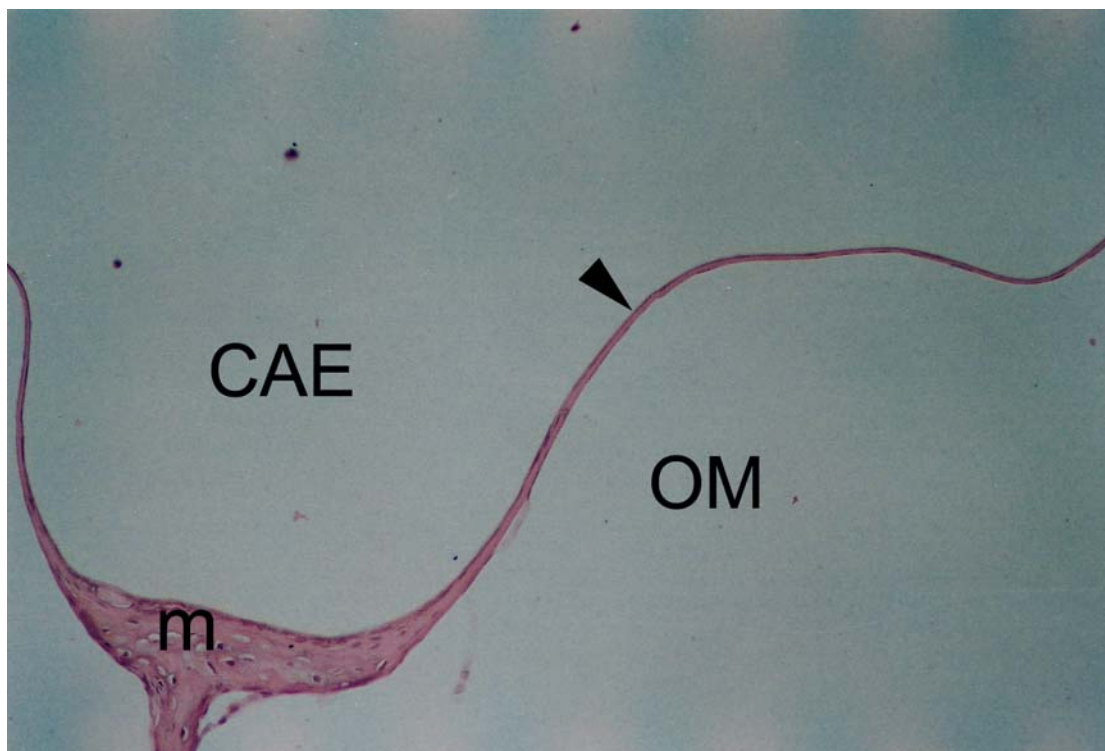


Fig. 3 – HE, 50X: Outro corte, ao nível do cabo do martelo (m), de uma MT normal (cabeça de seta). CAE – conduto auditivo externo; OM – orelha média.

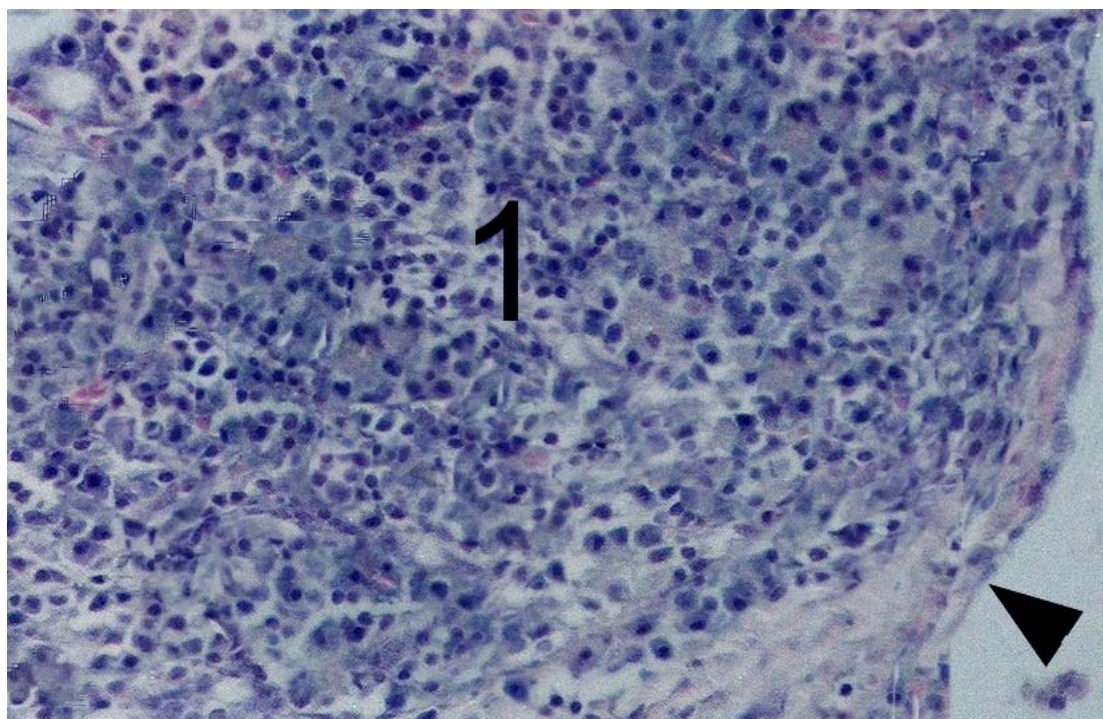


Fig. 4 – HE, 100X: Mucosa da OM na fase exsudativa do processo inflamatório (1), com intenso infiltrado polimorfonuclear e superfície mucosa (cabeça de seta)

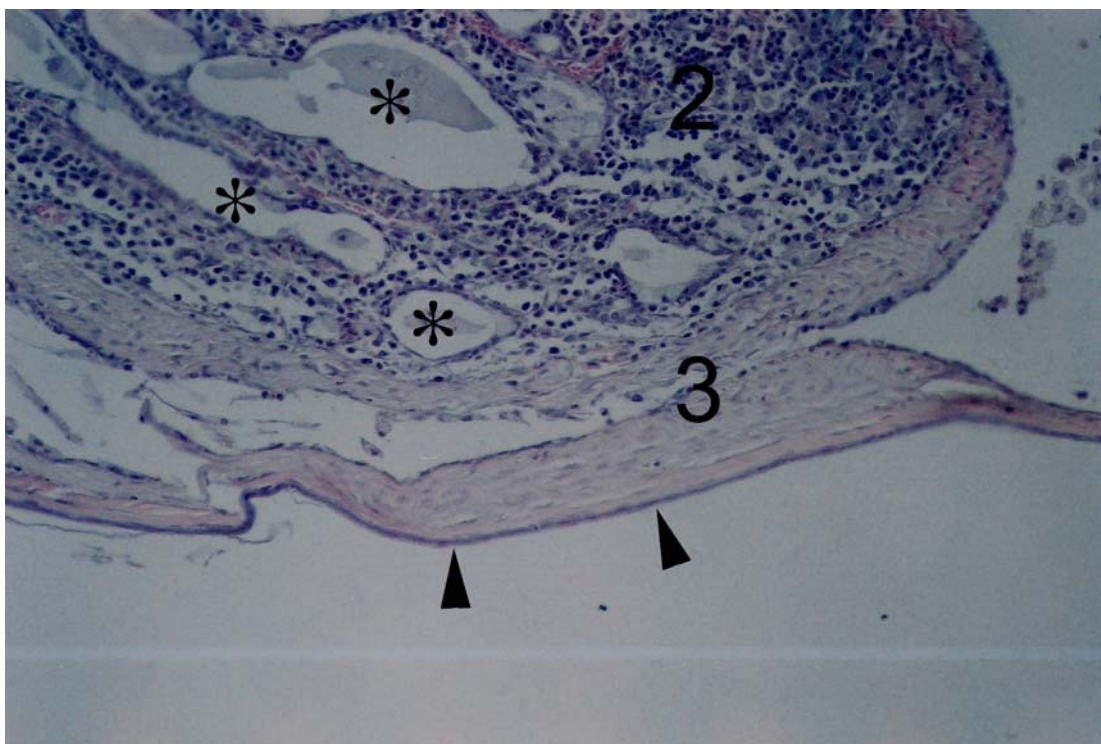


Fig. 5 – HE, 50X: MT mostrando área em fase de granulação (2), com infiltrado polimorfonuclear e grande neoformação vascular (***), coexistindo com fase de fibrose (3). As cabeças de seta mostram a superfície cutânea da MT.

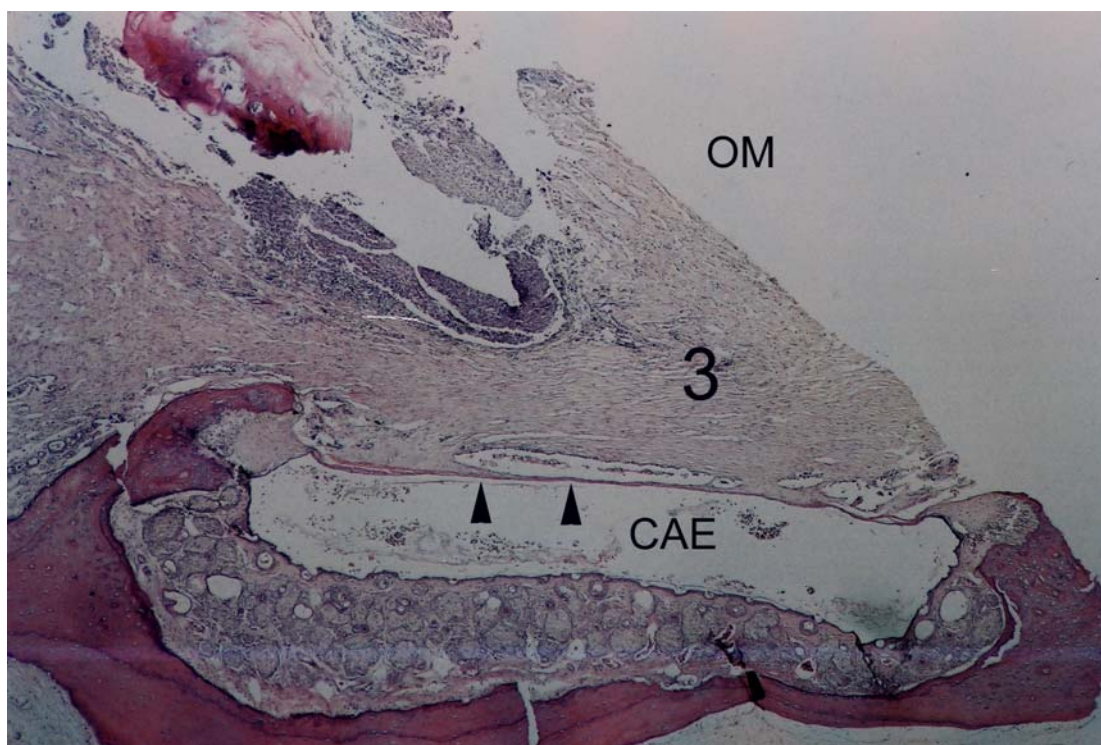


Fig. 6 – HE, 10X: Fase de fibrose (3) espessando de forma importante a MT (cabeças de seta). CAE – conduto auditivo externo; OM – orelha

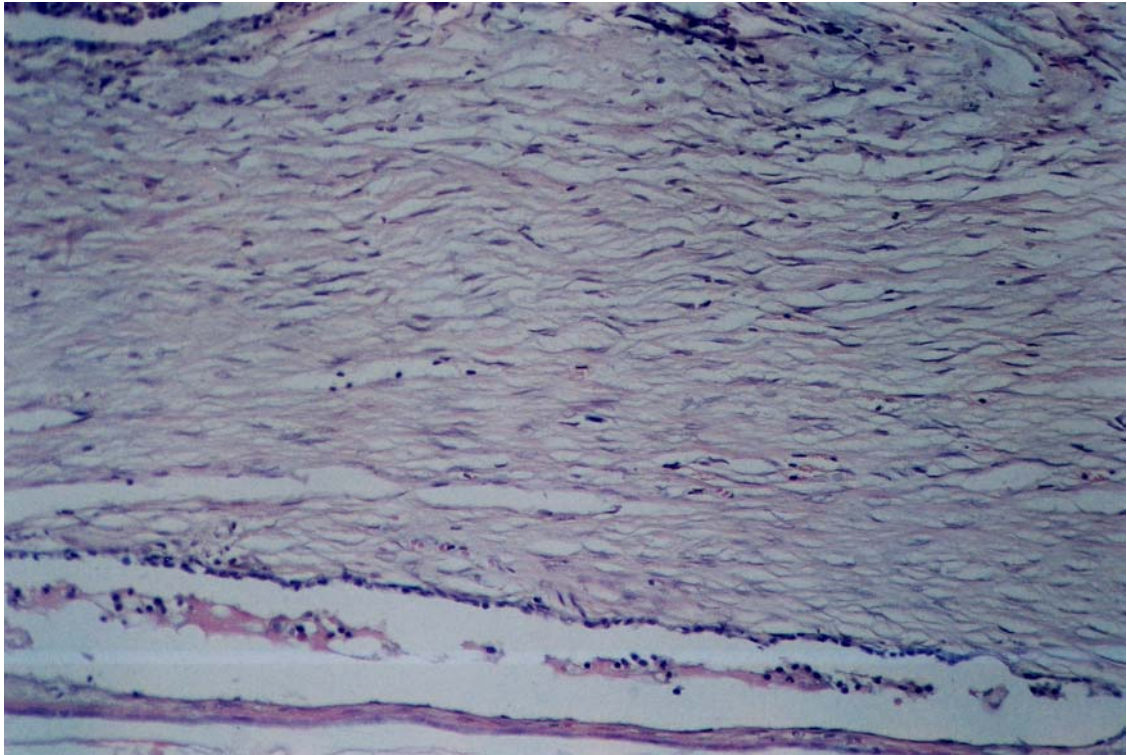


Fig. 7 – HE, 50X: Detalhe da mesma peça acima. Aspecto típico da fase 3, com proliferação de fibroblastos e presença de fibras colágenas com arrumação fibrilar.

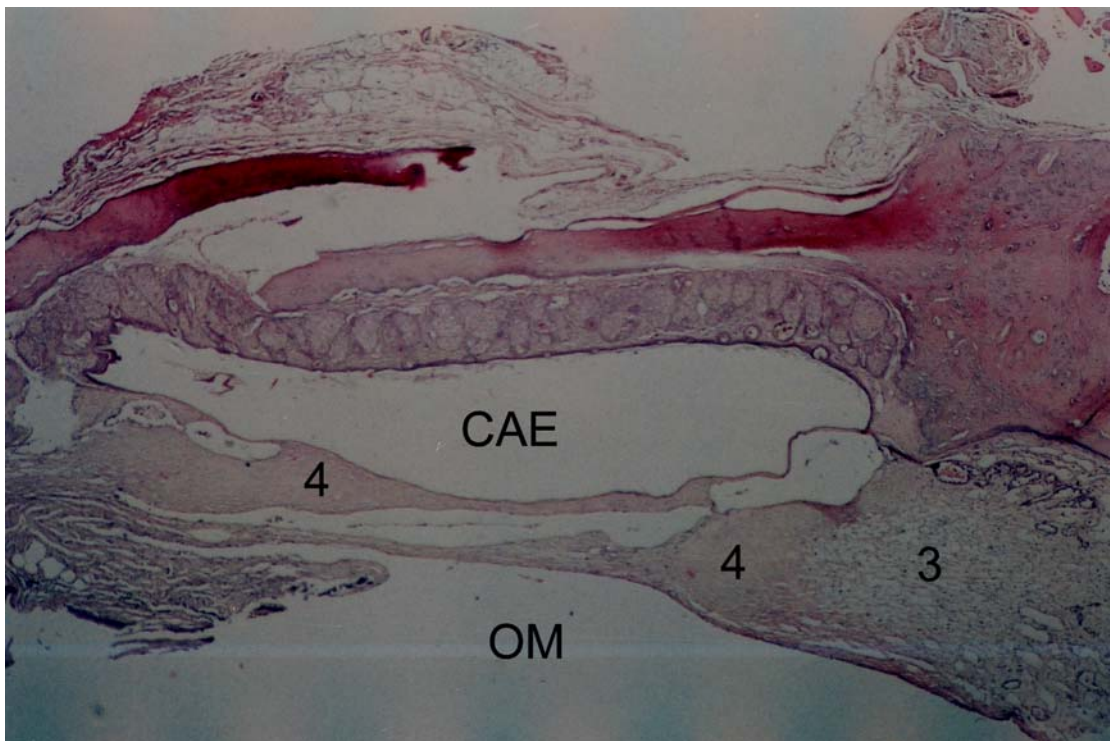


Fig. 8 – HE, 10X: MT' espessada, coexistindo as fases 3 e 4. Nas áreas de fase 4, percebem-se placas de tecido conjuntivo denso avascular na espessura da MT.



Fig. 9 – HE, 50X: Detalhe da peça anterior, mostrando menor quantidade de fibroblastos e presença de áreas de hialinização do colágeno, que perde a sua organização fibrilar e torna-se homogêneo (setas).

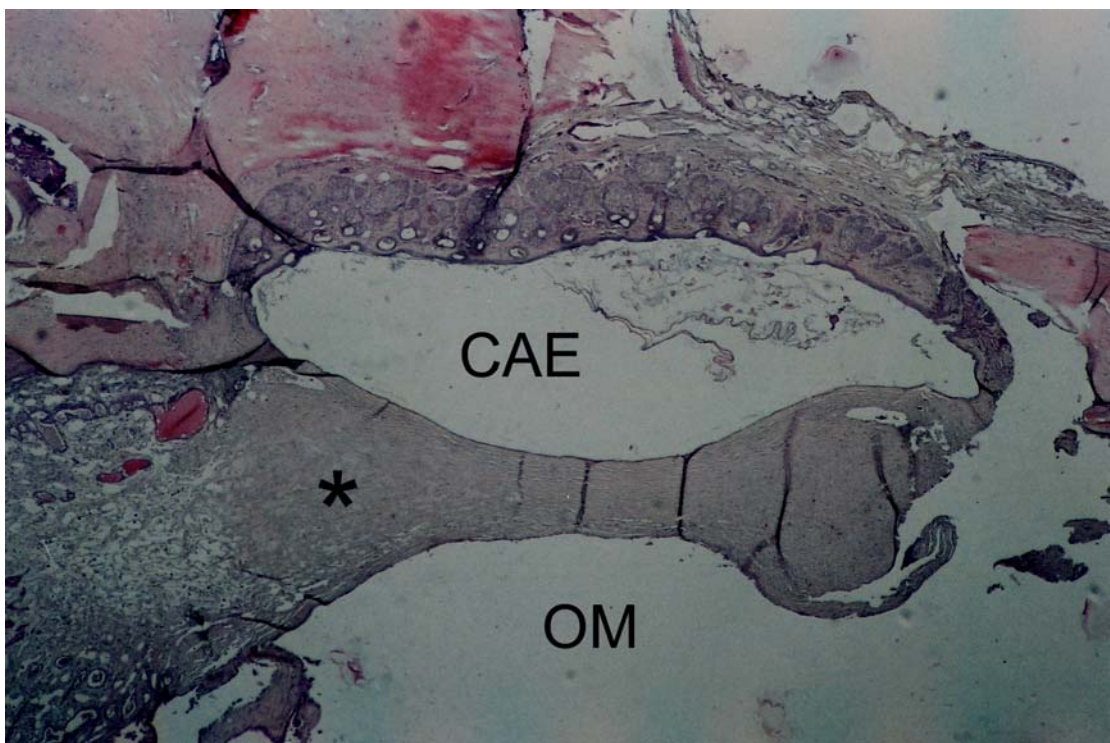


Fig. 10 – HE, 10X: MT em fase de calcificação (*). Note-se a coloração mais arroxeada do tecido, denotando a presença de depósitos de cálcio no material.

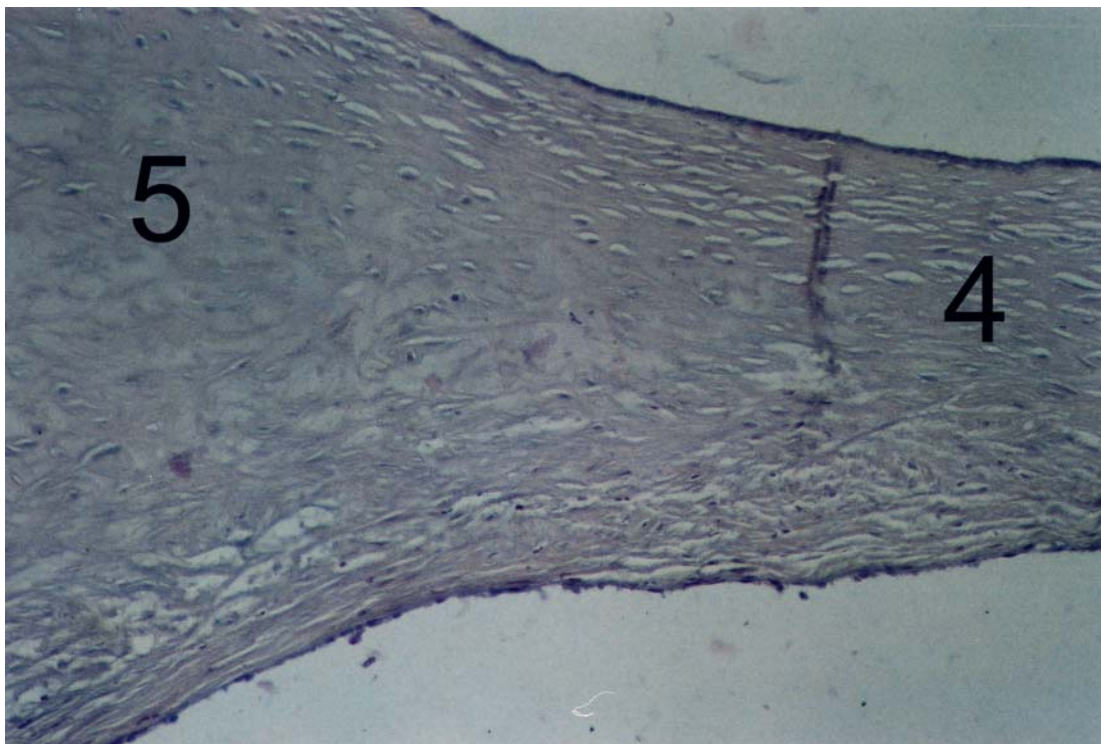


Fig. 11 – HE, 50X: No detalhe da figura anterior, vemos a coexistência das fases 4 e 5. Nesta última, percebem-se os desenhos que caracterizam o tecido ósseo e a transformação morfológica dos fibroblastos em osteoblastos.

Os achados da otomicroscopia, apesar de bastante variados, puderam ser classificados em três grupos: **normal** (quando a transparência era preservada, igual à da orelha esquerda), **opacificação leve** e **opacificação intensa**. Foram fotografadas, anotadas e desenhadas as alterações encontradas para que, na ocasião da avaliação histológica, se pudesse analisar as áreas específicas consideradas alteradas e as áreas tidas como normais, nas suas exatas localizações na MT. Para que isso fosse possível, todas as bulas timpânicas foram emblocadas em uma mesma posição e cortadas seguindo sempre a mesma orientação (axial). As figuras 12 a 17 mostram diferentes aspectos encontrados à otomicroscopia.

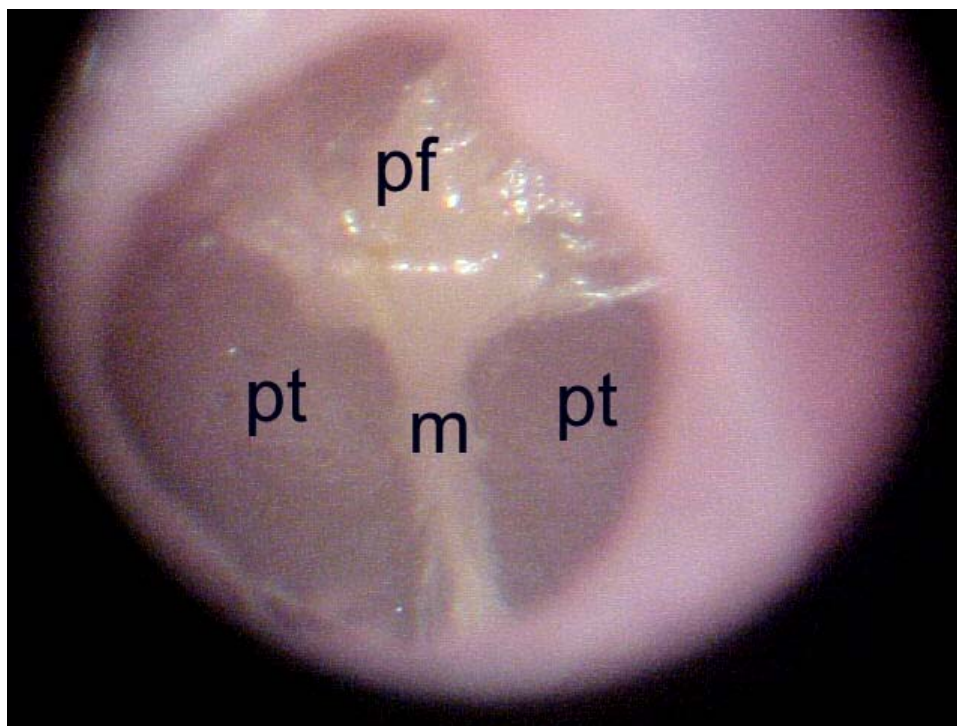


Fig. 12 – Aspecto normal da MT direita à otomicroscopia. Vêem-se a parte tensa (pt), a parte flácida (pf) e a impressão do cabo do martelo (m).

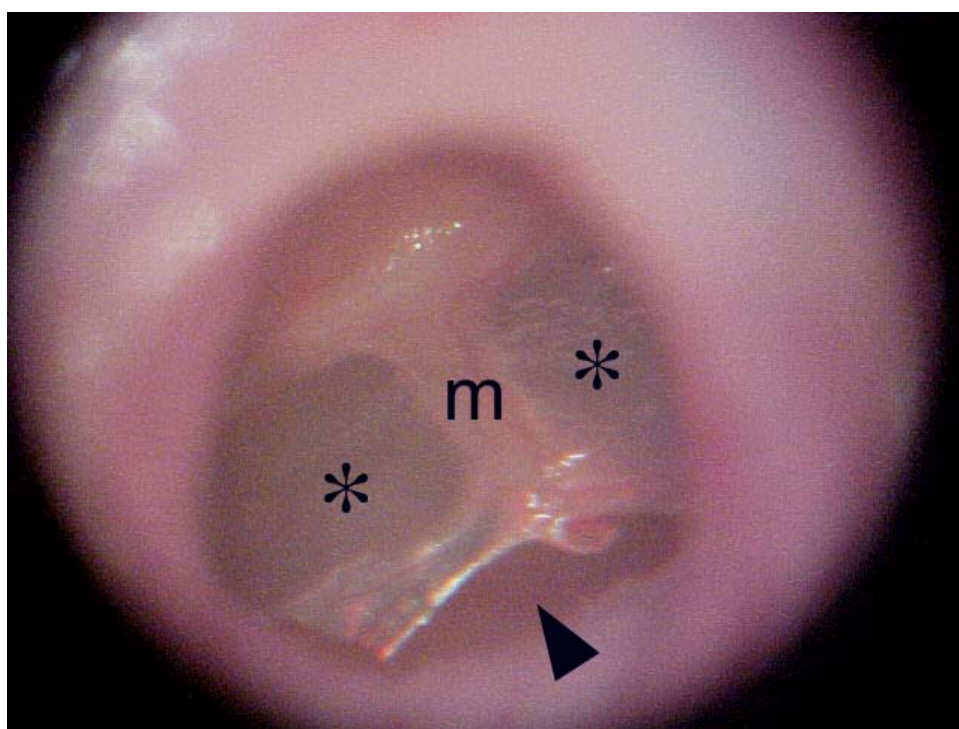


Fig. 13 – Aspecto otomicroscópico considerado como opacificação leve. Note-se que, tanto anteriormente, quanto posteriormente ao cabo do martelo (m) há uma perda da transparência da MT (**), quando comparada com a porção inferior da mesma (cabeça de seta).

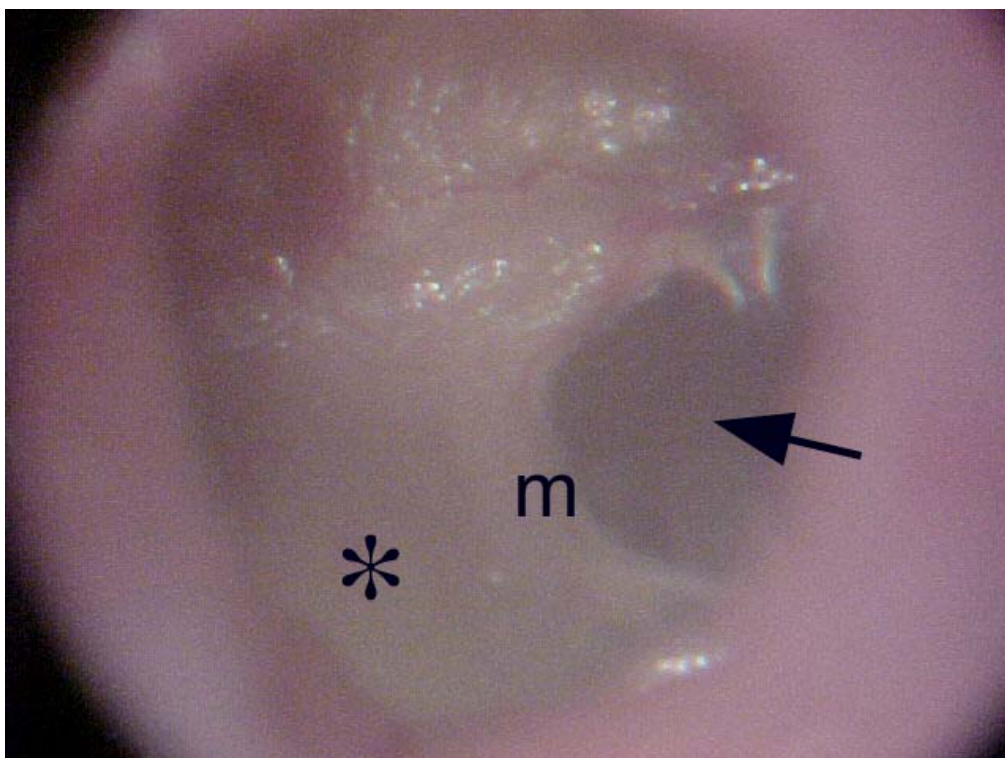


Fig. 14 – Opacificação leve segmentar (*) da MT, posterior ao cabo do martelo (m). Compare-se com a parte anterior normal (seta).

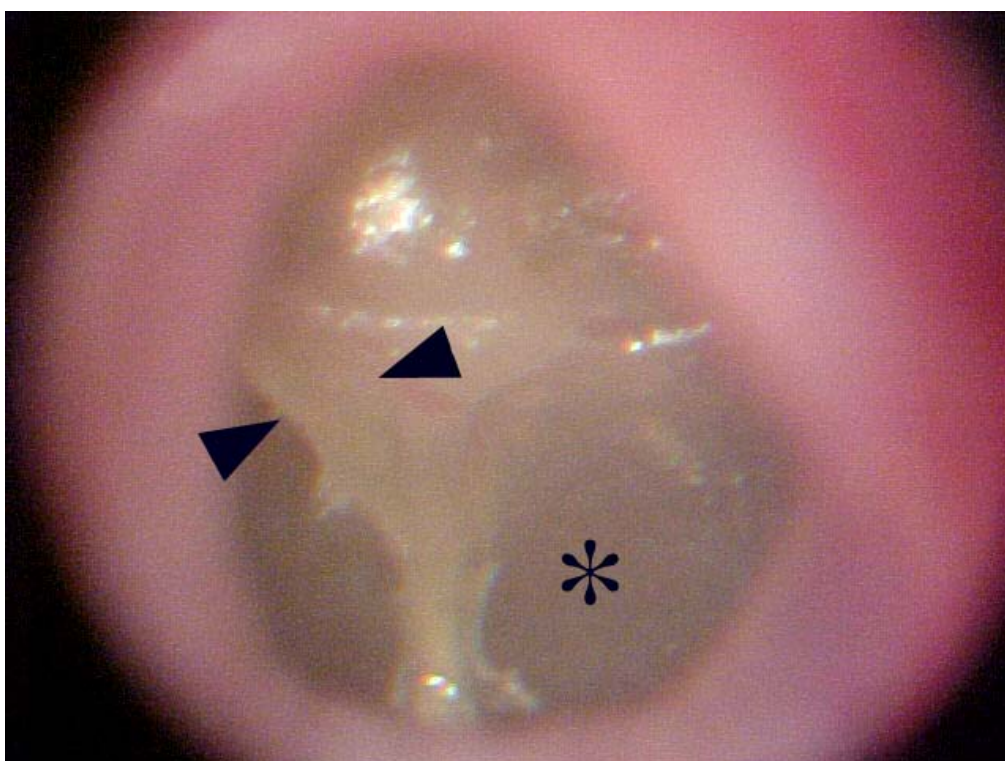


Fig. 15 – Opacificação intensa segmentar (cabeças de seta) localizada postero-superiormente ao martelo. Compare-se com o restante da MT, normal (*).

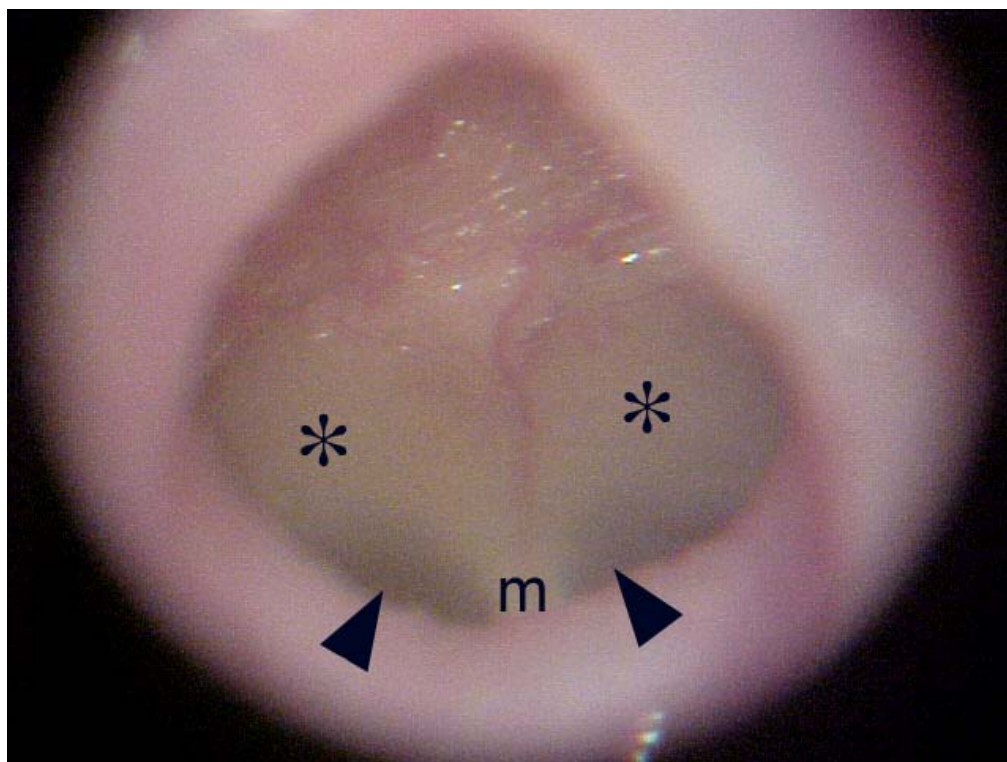


Fig. 16 – Outro aspecto de opacificação intensa segmentar (**) tomando a metade superior da MT. Logo abaixo, vê-se a MT com transparência normal (cabeças de seta).

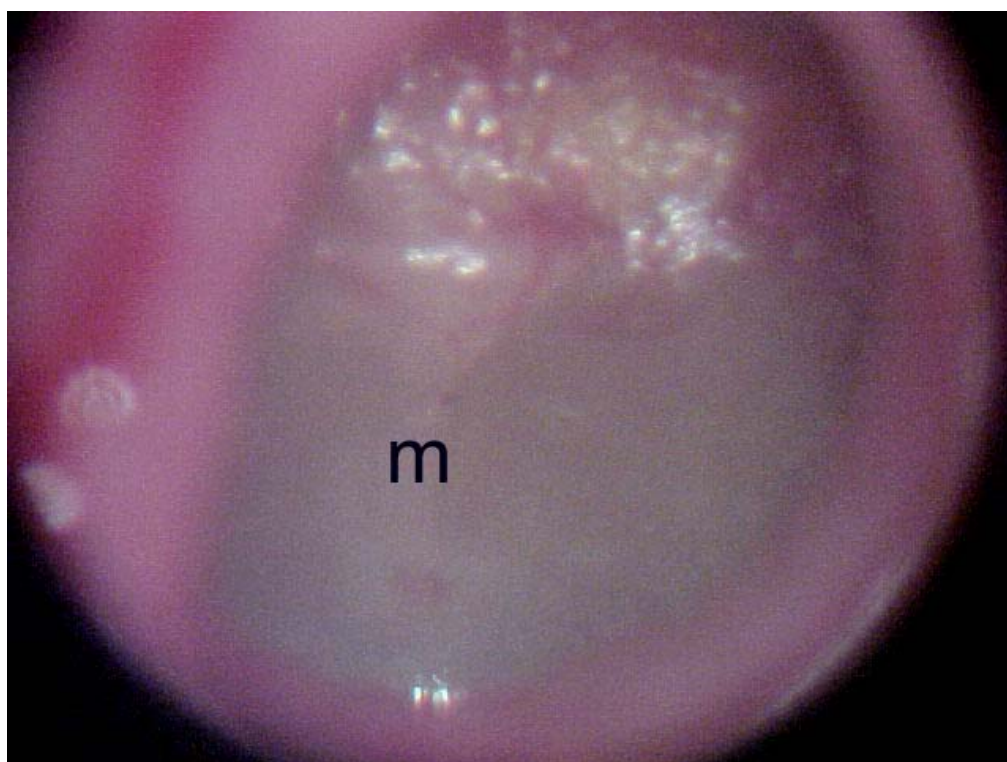


Fig. 17 – Opacificação intensa difusa, com perda total da transparência de toda a MT, quase não se podendo distinguir o cabo do martelo (m).

Os resultados deste trabalho mostraram uma concordância quando comparamos os achados otomicroscópicos com os histopatológicos (ver tabela 3). O teste de McNemar foi utilizado com o objetivo de verificar se houve ou não mudança com os dois métodos diagnósticos, obtivemos neste caso um resultado de $p=0,290$ indicando que não houve mudança significativa. O índice de Kappa é também um índice de concordância e foi utilizado para expressar a confiabilidade do teste. O resultado obtido (46%) indica uma concordância regular entre os métodos diagnósticos. Isto ocorreu provavelmente devido à grande variabilidade dos achados. Considerando como miringoesclerose a presença de opacificação intensa no exame otomicroscópico e grau 4 ou 5 (hialinização ou metaplasia) no exame histopatológico e ausência de miringoesclerose, o exame normal ou opacificação leve no exame otomicroscópico e até o grau 3 (fibrose) no exame histopatológico, procuramos estudar a acurácia dos resultados obtidos neste estudo (ver tabela 4). Através deste teste obtivemos a sensibilidade de 80%, considerada boa, o que mostra que a otomicroscopia tanto quanto o exame histopatológico, são métodos capazes de predizer se a miringoesclerose está realmente presente naqueles casos considerados positivos, ou seja, mostra a proporção de positivos verdadeiros. Em relação à especificidade dos métodos diagnósticos, o resultado obtido (78%), demonstra que tanto a otomicroscopia quanto a histopatologia são bons para predizer a proporção dos negativos verdadeiros. Procuramos avaliar não só a presença da miringoesclerose, mas também a concordância em termos de localização entre os dois métodos diagnósticos. Na tabela 5 observa-se que houve uma coincidência na localização do achado da otomicroscopia com o da histopatologia em 68%. Mais um resultado que reforça a concordância do método otomicroscópico com o histopatológico. Consideramos neste estudo, baseados na literatura consultada, miringoesclerose, os achados de opacificação intensa à

otomicroscopia e grau 4 ou 5 à histopatologia. A presença ou não de mirringoesclerose nos exames otomicroscópicos e histopatológicos foi comparada e os resultados estão descritos na tabela 6. Os resultados mostraram que estes exames têm uma especificidade boa , ou seja, eles se prestam para afastar a presença de mirringoesclerose naqueles casos onde ela realmente não existe.

CONCLUSÕES

Foi observada concordância significativa entre os métodos otomicroscópicos e histopatológicos no diagnóstico de miringoesclerose.

A otomicroscopia pode ser utilizada como método diagnóstico para estudo da miringoesclerose com boa especificidade.

REFERÊNCIAS

1. House WF, Sheehy JL. Tympanosclerosis. Archives of Otolaryngology 1960; 72:38-43.
2. Von Tröltsch A F. Lehrbuch der Ohrenheilkunde. 5th ed. F.G.M. Vogel. Leipzig, 1873.
3. Zöllner F , Beck C. Die Paukensklerose. Z Laryngol Rhinol Otol 1955; 34:137-55.
4. Zöllner F.Tympanosclerosis. Arch Otolaryngol 1963; 78:538-44.
5. Schuknecht HF. Pathology of ear . Cambridge, M.A:Harvard University Press, 1974.
6. Forséni M, Eriksson A, Bagger- Sjöbäck D. et al. Development of Tympanosclerosis: Can predicting factors be identified? The American Journal of Otology 1997; 18:298-303.
7. Walb H. IH.Schwartz: Handbuch der Ohrenheilkunde 2, 145.Hirschwald, Berlin.1893.
8. Zöllner F. Tympanosclerosis.Journal of Laryngology and Otology 1956; 70:77-85.
9. Brockmann SJ. Problems encountered in tympanoplastic surgery. Laryngoscope, 1961; 71:859-66.
10. Joseph RB, Gordon J. Tympanosclerosis. Arch Otolaryng; 1963; 77: 186-90
11. Igarashi M, Konishi S, Alford BR, Guilford FR. The pathology of tympanosclerosis. Laryngoscope 1970; LXXX: 233-43.
12. Harris I. Tympanosclerosis – a revived clinico-pathologic entity. Laryngoscope 1961; 71:1488-533.
13. Chang JW. Tympanosclerosis: electron microscopic study. Acta Otolaryngol 1969; 68:62-72.
14. Friedmann I, Galey FR. Initiation and stages of mineralization in tympanosclerosis. The Journal of Laryngology and Otology 1980; 94: 1215-229.
15. Russell JD, Giles JJ. Tympanosclerosis in the rat tympanic membrane: An experimental study. Laryngoscope 2002; 112:1663-666.
16. Sheehy JL , House WF. Tympanosclerosis. Archives of Otolaryngology 1962; 76:65-71.
17. Austin DF. Reconstructive techniques for tympanosclerosis. Ann Otol Rhinol Laryngol 1988; 97:670-74.
18. Bhaya MH, Schachern PA, Morizono T, Paparella MM. Pathogenesis of tympanosclerosis. Otolaryngol Head Neck Surg 1993; 109:3, 413-20.
19. Asire S, Alaa H, Anazy FA, Zakzouk S, Banjar A. Tympanosclerosis: review of literature and incidence among patients with middle-ear infection.The Journal of Laryngology and Otology 1999; 113:1076-80.

20. Wielinga EWJ , Kerr AG. Tympanosclerosis.Clin. Otolaryngol 1993; 18:341-49.
21. Sorensen H, True O. Histology of tympanosclerosis. Acta Otolaryng 1971; 73: 18-26.
22. Ferlito A. Histopathogenesis of tympanosclerosis . The Journal of laryngology and otology 1979; 93:25-37.
23. Schiff M. Tympanosclerosis: Clinical implications of the theory of pathogenesis. Ann Otol.Rhinol. Laryngol 1983; 92: 635-39.
24. Zallone AZ, Teti A, Iurato S. Metaplastic bone tissue in tympanosclerosis. Acta otolaryngol 1983; 95:554-59.
25. Buyanover D, Tietz A, Luntz M, Sade J. The biochemical composition of tympanosclerotic deposits.Arch otorhinolaryngol 1987; 243:366-69.
26. Hybasek I. Morphological model of tympanosclerosis produced by calciphylaxis on the middle-ear mucosa in guinea pig. Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd 1971; 200(3):199-208. German.
27. Hybasek I. Experimental calcifications of the tympanic membrane in guinea pigs. Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove 1976; 19(5):553-8.
28. Mann W. Experimental tympanosclerosis following infection with Streptococcus pyogenes and vitamin D3 intoxication. Arch otorhinolaryngol 1986; 243:296-303.
29. Mann W, Beck C, Schaefer HE. The significance of calcium antagonists in rat experimental tympanosclerosis. Arch otorhinolaryngol 1987; 243:382-386.
30. Wielinga EWJ, Kuijpers W, Tonnaer ELGM, Jap PHK. An experimental model for tympanosclerosis. Acta Otolaryngol 1988; 105:537-42.
31. Forséni M. Macrophages and possible osteoclast differentiation in the rat bullar bone during experimental acute otitis media with reference to tympanosclerosis. Otolology and neurotology 2001; 22:771-75.
32. Spratley JE, Mattsson CK, Hellstrom SO, Clemente MP. Topical ascorbic acid reduces myringosclerosis in perforated tympanic membranes a study in the rat. Ann otol rhinol laryngol 2001; 110:585-91.
33. Forséni M, Hultcrantz M. Possible inflammatory mediators in tympanosclerosis development. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology april 2002; 149-54.
34. Hellstrom S, Salén B, Stenfors LE. Anatomy of the rat middle ear. Acta Anat. 1982; 112:346-52.
35. Hermansson A,Emgard P, Prellner K, Hellstrom S.A rat model for pneumococcal otitis media. Am J Otolaryngol 1988; 9:97-101.

36. Mattsson C, Marklund SL, Hellstrom S. Application of oxygen free radical scavengers to diminish the occurrence of myringosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:513-18.
37. Mattsson C. Myringotomy: a prerequisite for the development of myringosclerosis. *Laryngoscope* 1998; 108:102-6.
38. Tonnaer ELGM, Ingels KJAO., Rijkers GT, Curfs JHA. Antigenic as well as nonantigenic stimuli induce similar middle ear responses in the rat. *Laryngoscope* 2003; 113:322-27.
39. Michaels L. Ear. *Histology for pathologists* 1992; 48:925-49.
40. Métodos de investigação epidemiológica em doenças transmissíveis Vol I OPAS/ Fundação Nacional de Saúde 1997.
41. Robbins K. Revisão de patologia 1th ed. Rio de Janeiro –Guanabara e Koogan 2002.
42. Heitman E, Reiser SJ, Bulger RE. Legal, ethical and educational problems in experimental surgery. In: Lindkaer S. *Essentials of experimental surgery: Gastroenterology*. Gordon and Breach publishing group. 1995.1: 1-12.

NORMAS CONSULTADAS

Este trabalho seguiu as normas estabelecidas pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas que são denominadas Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomed Journals, e conhecidas como o estilo de Vancouver. Atualmente, mais de 500 periódicos em todo o mundo seguem essas normas, podendo ser localizado na Internet no endereço: <http://www.cma.ca/publications/mwc/uniform.htm>

ANEXO

ANEXO 1



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Recife, 24 de março de 2003

Ofício nº 122/2003

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Ao Prof. Sílvia da Silva Caldas
Departamento de Cirurgia da UFPE

Prezada Professora,

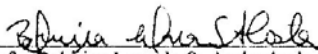
Após o recebimento de seu projeto de pesquisa intitulado “Influência da Hipercalemia na indução de timpanosclerose em ratos: estudo experimental em ratos da espécie Wistar” os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) analisaram os aspectos relativos aos protocolos experimentais adotados.

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.

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, ressaltamos ainda que o sacrifício dos animais experimentais, realizado no presente trabalho, justifica-se pelo fato de não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico.

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

Atenciosamente,


Profª. Belmira Lara da S. Andrade da Costa

Coordenadora da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE


Daniel Marques
Membro do Departamento de Cirurgia
C.C.S. - UFPE