

**ANTONIO ANTUNES MELO**



**EFEITO DA MITOMICINA C INTRATIMPÂNICA NO  
DESENVOLVIMENTO DO COLESTEATOMA  
E DA OTITE MÉDIA EM RATOS**

Tese 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 Doutor em Cirurgia.

Orientador

**Prof. Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto**

Prof. Adjunto da Disciplina de Otorrinolaringologia do  
Departamento de Cirurgia, Centro de Ciências da Saúde - UFPE

**RECIFE  
2007**

Melo, Antonio Antunes

Efeito da Mitomicina C intratimpânica no desenvolvimento do colesteatoma e da otite média em ratos / Antonio Antunes Melo. – Recife: O Autor, 2007.

xvii 98 folhas; il., fig., gráf., tab., quadros.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Cirurgia, 2007.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Mitomicina C. 2. Colesteatoma. 3. Otite média  
I. Título.

616.284  
617.84

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

UFPE  
CCS2007-139

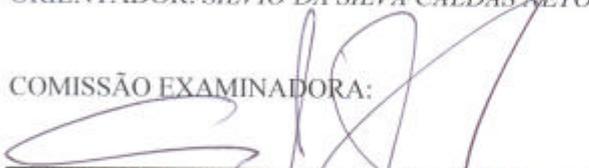
**"EFEITO DA MITOMICINA C INTRATIMPÂNICA NO DESENVOLVIMENTO  
EXPERIMENTAL DO COLESTEATOMA E DA OTITE MÉDIA"**

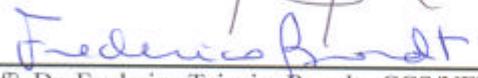
*Antonio Antunes Melo*

APROVADA EM: 15/08/2007

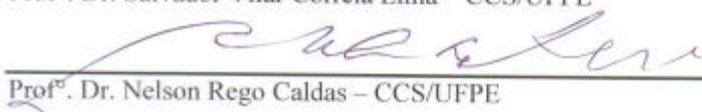
ORIENTADOR: *SÍLVIO DA SILVA CALDAS NETO*

COMISSÃO EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>o</sup>. Dr. Carlos Teixeira Brandt - CCS/UFPE

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>o</sup>. Dr. Frederico Teixeira Brandt - CCS/UFPE

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>o</sup>. Dr. Salvador Vilar Correia Lima - CCS/UFPE

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>o</sup>. Dr. Nelson Rego Caldas - CCS/UFPE

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Erideise Gurgel da Costa - UNICAP

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

Relatório da Defesa de Tese do Dr. Antonio Antunes Melo aluno do Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Área de Concentração: Cirurgia: Clínica e Experimental.

Às oito horas do dia quinze de agosto de dois mil e sete no Anfiteatro do Centro de Ciências Aplicadas Universidade Federal de Pernambuco, tiveram início os trabalhos de defesa de tese da Dr. Antonio Antunes Melo, para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia. A comissão Julgadora – eleita pelo Colegiado do Programa e homologada pela Câmara de Pesquisa e Pós-graduação – foi integrada pelos professores: Dr. Carlos Teixeira Brandt, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE (Presidente da Banca Examinadora); Dr. Frederico Teixeira Brandt, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. Salvador Vilar Correia Lima, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; Dr. Nelson Costa Rêgo Caldas, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE; e Dra. Erideise Gurgel da Costa, Doutora do Departamento de Fonoaudiologia da Universidade Católica de Pernambuco; e, para suplentes: interno: Edmundo Machado Ferraz, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE e, finalmente, externo, Dr. Marcelo Longman Mendonça, Doutor do Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP); tendo, como orientador interno, o Dr. Silvio da Silva Caldas Neto, Doutor do Departamento de Cirurgia do CCS/UFPE. A tese apresentada pelo doutorando Antonio Antunes Melo versou sobre: **“EFEITO DA MITOMICINA C INTRATIMPÂNICA NO DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL DO COLESTEATOMA E DA OTITE MÉDIA**. 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 datashow, foram realizadas as arguições na seguinte ordem: Profa. Dra. Erideise Gurgel da Costa, Prof. Dr. Nelson Costa Rego Caldas, Prof. Salvador Vilar Correia Lima, Prof. Dr. Frederico Teixeira Brandt, e Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt (Presidente da Banca Examinadora); 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 “Aprovado”, Prof. Dr. Frederico Teixeira Brandt, menção “Aprovado”, Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima, menção “aprovado”, Prof. Dr. Nelson Costa Rego Caldas, menção “aprovado” e a Profa. Dra. Erideise Gurgel da Costa, menção “aprovado”. Conclusão, o candidato, obteve a menção “Aprovado”. Nada mais havendo a registrar foram encerrados os trabalhos do que, para constar, elaborei o presente relatório que vai por mim, Niége Maria de Paiva Melo, Secretária, assinados depois do Senhor Presidente, e demais integrantes da Comissão Examinadora. Recife, 15 de agosto de 2007.

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Frederico Teixeira Brandt

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Nelson Costa Rego Caldas

Prof. Erideise Gurgel da Costa

Niége Maria de Paiva Melo (secretária)

conferido com o documento  
Original em 02/10/2007  
Niége Melo

Niége M. de Paiva Melo  
Sec. Executiva do Programa de  
Pós-graduação em Cirurgia  
CCS/UFPE  
Nível Mestrado Doutorado  
Cad. 00112566  
SIAPE 1134690

**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  
DIRETORA SUPERINTENDENTE**

Prof. Heloísa Mendonça de Morais

**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**

Prof. Marcelo Salazar da Veiga Pessoa

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA  
COORDENADOR**

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

**VICE-COORDENADOR**

Prof. Carlos Teixeira Brandt

**CORPO DOCENTE**

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Frederico Teixeira Brandt

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto

*“Queremos, até onde for possível, introduzir a sutileza e o rigor das matemáticas em todas as ciências; não que imaginemos, com isso, que chegaremos a conhecer as coisas; queremos somente constatar a nossa relação com elas. A matemática não é mais do que o meio para o conhecimento geral e último dos homens.”*

Friedrich Nietzsche - *A Gaia Ciência*

# DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

**Cleonice e Antônio**, pelo exemplo de trabalho e dedicação de toda uma vida e pelo carinho com que cercaram seus filhos, procurando fazer deles pessoas dotadas de humanidade e decência.

À minha esposa,

**Rosário**, companheira paciente e dedicada, que estimula a minha atividade profissional e compreende a ausência que esta acarreta em vários momentos da nossa vida em comum.

Aos meus filhos,

**Maria Luísa e Antônio Henrique**, que talvez ainda não percebam, mas ao me dedicar a esta tese eu estava retirando deles tempo precioso de nossa convivência; e também às minhas recém-chegadas afilhadas **Laura** e **Juliana**, novas integrantes da família Antunes. Que juntas àqueles outros possam ser, no futuro, uma nova íclita geração.

Aos meus irmãos,

**Alice e José**, companheiros de sempre.

# AGRADECIMENTOS

Ao Professor Emérito da Universidade Federal de Pernambuco, **Dr. Nelson Costa Rêgo Caldas**, mentor e amigo dileto que tenho o orgulho e a honra de ter, por tornar a mim possível ter a grata missão de defender esta tese.

Ao Professor Adjunto Livre-Docente da Disciplina de Otorrinolaringologia da Universidade Federal de Pernambuco, **Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto**, meu orientador e amigo de longa caminhada, pela sua generosidade, incentivo e entusiasmo na realização deste trabalho.

Ao Professor da Disciplina de Deontologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, **Dr. Horácio Mário Fittipaldi Júnior**, pela sua enorme paciência e inestimável colaboração neste trabalho, desvendando os segredos da Patologia.

Ao Professor do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, **Dr. José Roberto Vieira de Melo**, pela ajuda na interpretação dos achados histológicos e por disponibilizar as dependências daquele Setor a esta pesquisa.

Ao Professor de Estatística, **José Natal Figueiroa**, pela sua cuidadosa orientação na análise estatística.

Ao Professor Coordenador do Núcleo de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco, **Dr. Antônio Roberto de Barros Coelho**, por disponibilizar aquele Setor para a realização desta pesquisa.

Aos colegas **Fernando Souza Leão** e **Alexandre José Costa Campos**, que, no seu período de Residência Médica na Disciplina de Otorrinolaringologia da Universidade Federal de Pernambuco, movidos por entusiasmo pela especialidade e pela curiosidade científica, foram incansáveis na ajuda direta a esta pesquisa.

À veterinária **Adriana Cruz**, do Núcleo de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco, pela ajuda nos experimentos e nos cuidados com os animais desta investigação.

À histotécnica **Silvânia Tavares Paz**, do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, pelos seus relevantes préstimos na preparação das lâminas e estudo histológico.

Às assessoras de produção dos Anais da Faculdade de Medicina – UFPE, **Márcia e Mércia**, pelo esmero na confecção desta tese.

A **todos** que, direta ou indiretamente, colaboraram com este trabalho.

# SUMÁRIO

|  |             |
|--|-------------|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>                     | <b>xi</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                   | <b>xii</b>  |
| <b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>                                  | <b>xiii</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                   | <b>xiv</b>  |
| <b>RESUMO.....</b>   | <b>xvi</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>xvii</b> |
| <br>   |             |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                      | <b>01</b>   |
| <br>   |             |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                       | <b>05</b>   |
| 2.1 Geral.....   | 06          |
| 2.2 Específicos.....   | 06          |
| <br>   |             |
| <b>3. LITERATURA.....</b>                                      | <b>07</b>   |
| 3.1 Otite média crônica colesteatomatosa.....                  | 08          |
| 3.1.1 Histórico.....   | 08          |
| 3.1.2 Epidemiologia.....                                       | 10          |
| 3.1.3 Classificação.....                                       | 11          |
| 3.1.4 Patogênese.....  | 13          |
| 3.1.5 Considerações sobre histologia e biologia molecular..... | 16          |
| 3.2 Indução experimental de colesteatomas.....                 | 23          |
| 3.3 Mitomicina C.....  | 27          |
| <br>   |             |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                              | <b>32</b>   |
| 4.1 População e local do estudo.....                           | 33          |
| 4.2 Tipo de estudo.....  | 33          |
| 4.3 Seleção.....   | 33          |
| 4.4 Procedimentos.....   | 34          |
| 4.4.1 Ambiente.....  | 34          |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.4.2 Anestesia.....  | 34        |
| 4.4.3 Indução do processo inflamatório.....   | 34        |
| 4.5 Coleta das bulas timpânicas.....  | 35        |
| 4.6 Preparo histológico.....  | 36        |
| 4.6.1 Análise histológica.....  | 36        |
| 4.7 Análise estatística.....  | 38        |
| 4.8 Considerações éticas.....   | 38        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>   | <b>39</b> |
| 5.1 Resultados qualitativos.....  | 40        |
| 5.1.1 Grupo controle.....   | 40        |
| 5.1.2 Grupo experimental.....   | 41        |
| 5.2 Resultados quantitativos.....   | 42        |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES.....</b>   | <b>78</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>80</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>  | <b>94</b> |
| <b>Anexo 1</b> Comitê de Ética em Pesquisa.....   | 95        |
| <b>Anexo 2</b> Resultados quantitativos dos grupos controle e experimental (exsudato, colesteatoma e fibrose).....                                | 96        |
| <b>Anexo 3</b> Resultados quantitativos dos grupos controle e experimental (espessamento da mucosa da bula timpânica e da membrana timpânica).... | 97        |
| <b>Anexo 4</b> Normatização.....  | 98        |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |   |
|---------------|---|
| CAE           | conduto auditivo externo                    |
| DNA           | ácido desoxirribonucléico                   |
| EUA           | Estados Unidos da América                   |
| g             | grama                                       |
| HE            | hematoxilina-eosina                         |
| IL-1          | interleucina 1                              |
| Ki-67         | antígeno nuclear Ki-67                      |
| mg            | miligrama                                   |
| MIB 1         | anticorpo monoclonal MIB 1                  |
| mL            | mililitro                                   |
| mm            | milímetro                                   |
| MMC           | mitomicina C                                |
| OMC           | otite média crônica                         |
| OMCC          | otite média crônica colesteatomatosa        |
| PG            | propilenoglicol                             |
| RNA           | ácido ribonucléico                          |
| TGF- $\beta$  | fator transformador do crescimento- $\beta$ |
| TNF- $\alpha$ | fator de necrose tumoral- $\alpha$          |
| UFPE          | Universidade Federal de Pernambuco          |
| $\mu$ m       | micrômetro                                  |

# LISTA DE TABELAS

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Tabela 1</b> | Principais parâmetros avaliados do grau de espessura da mucosa das bulas timpânicas nos grupos controle e experimental .....     | 43 |
| <b>Tabela 2</b> | Distribuição do grau de espessura da mucosa das bulas timpânicas nos grupos controle e experimental.....                         | 44 |
| <b>Tabela 3</b> | Principais parâmetros avaliados do grau de espessura das membranas timpânicas nos grupos controle e experimental.....            | 45 |
| <b>Tabela 4</b> | Distribuição do grau de espessura das membranas timpânicas nos grupos controle e experimental.....                               | 46 |
| <b>Tabela 5</b> | Distribuição da integridade das membranas timpânicas analisada através da otomicroscopia nos grupos controle e experimental..... | 47 |
| <b>Tabela 6</b> | Distribuição dos achados das otomicroscopias nos grupos controle e experimental.....   | 48 |
| <b>Tabela 7</b> | Distribuição da presença de exsudato na bula timpânica nos grupos controle e experimental.....                                   | 49 |
| <b>Tabela 8</b> | Distribuição da presença de colesteatoma na bula timpânica nos grupos controle e experimental.....                               | 50 |
| <b>Tabela 9</b> | Distribuição da presença de fibrose na mucosa da bula timpânica nos grupos controle e experimental.....                          | 51 |

# LISTA DE GRÁFICOS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Gráfico 1</b> | Principais parâmetros avaliados do grau de espessura da mucosa das bulas timpânicas nos grupos controle e experimental.....   | 43 |
| <b>Gráfico 2</b> | Distribuição do grau de espessura da mucosa da bula timpânica nos grupos controle e experimental.....                         | 44 |
| <b>Gráfico 3</b> | Principais parâmetros avaliados do grau de espessura das membranas timpânicas nos grupos controle e experimental.....         | 45 |
| <b>Gráfico 4</b> | Distribuição do grau de espessura da membrana timpânica nos grupos controle e experimental.....                               | 46 |
| <b>Gráfico 5</b> | Distribuição da integridade da membrana timpânica analisada através da otomicroscopia nos grupos controle e experimental..... | 47 |
| <b>Gráfico 6</b> | Distribuição dos achados das otomicroscopias nos grupos controle e experimental.....  | 48 |
| <b>Gráfico 7</b> | Distribuição da presença de exsudato na bula timpânica nos grupos controle e experimental.....                                | 49 |
| <b>Gráfico 8</b> | Distribuição da presença de colesteatoma na bula timpânica nos grupos controle e experimental.....                            | 50 |
| <b>Gráfico 9</b> | Distribuição da presença de fibrose na mucosa da bula timpânica nos grupos controle e experimental.....                       | 51 |

## LISTA DE FIGURAS

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Figura 1</b> | Capa do livro <i>Traité de l'organe de l'ouïe</i> (Tratado do órgão da audição), de Guichard Joseph Duverney, Edição de 1731.....   | 09 |
| <b>Figura 2</b> | Molécula da mitomicina C.....   | 28 |
| <b>Figura 3</b> | Fotomicrografia da membrana timpânica de rato normal (BT = luz da bula timpânica; CAE = conduto auditivo externo; seta fina = membrana timpânica; e seta grossa = martelo). Hematoxilina-eosina (aumento 100x).....   | 52 |
| <b>Figura 4</b> | Fotomicrografia de mucosa da bula timpânica de rato normal (BT = luz da bula timpânica; seta fina = mucosa da bula timpânica; e seta grossa = parede óssea da bula timpânica). Hematoxilina-eosina (aumento 100x).....  | 52 |
| <b>Figura 5</b> | Fotomicrografia de mucosa da bula timpânica de rato do grupo controle (seta fina = epitélio colunar ciliado simples; seta grossa = lâmina própria infiltrada com células nonucleares; e BT = luz da bula timpânica). Hematoxilina-eosina (aumento 400x).....  | 53 |
| <b>Figura 6</b> | Fotomicrografia de mucosa da bula timpânica de rato do grupo experimental (BT = luz da bula timpânica; seta fina = queratina em descamação; seta grossa = epitélio pavimentoso estratificado queratinizado [colesteatoma]; seta curva = lâmina própria com espessamento intenso; e círculo = parede óssea da bula timpânica). Hematoxilina-eosina (aumento 100x)..... | 53 |
| <b>Figura 7</b> | Fotomicrografia anterior em aumento 200x. Mucosa da bula timpânica de rato do grupo experimental (BT = luz da bula timpânica; seta fina = queratina em descamação; seta grossa = epitélio pavimentoso estratificado queratinizado; e seta curva = lâmina própria com espessamento e fibrose intensos). Hematoxilina-eosina.....                                       | 54 |
| <b>Figura 8</b> | Fotomicrografia da membrana timpânica de rato do grupo controle (BT = luz da bula timpânica; CAE = conduto auditivo externo; círculo = parede óssea da bula timpânica; seta fina = membrana timpânica espessada; e seta grossa = epitélio do conduto auditivo externo com glândulas sebáceas e queratina em descamação). Hematoxilina-eosina (aumento 200x).....      | 54 |
| <b>Figura 9</b> | Fotomicrografia da membrana timpânica de rato do grupo experimental (BT = luz da bula timpânica com exsudato inflamatório; CAE = conduto auditivo externo; seta grossa = membrana timpânica espessada com descamação de queratina na sua camada mucosa interna; e seta fina = epitélio do conduto auditivo externo) Hematoxilina-eosina (aumento 200x).....           | 55 |

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Figura 10</b> | Fotomicrografia de bula timpânica de rato do grupo controle mostrando acúmulo intenso de queratina em descamação e exsudato inflamatório no seu interior (seta fina = queratina; seta grossa = exsudato inflamatório; e BT = luz da bula timpânica). Hematoxilina-eosina (aumento 100x).....                                       | 55 |
| <b>Figura 11</b> | Fotomicrografia de membrana timpânica de rato do grupo experimental mostrando colesteatoma com descamação de queratina e presença de exsudato inflamatório (BT = luz da bula timpânica; seta grossa = queratina em descamação; seta fina = martelo; e seta curva = exsudato inflamatório). Hematoxilina-eosina (aumento 200x)..... | 56 |
| <b>Figura 12</b> | Fotomicrografia da mucosa da bula timpânica de rato do grupo controle (seta fina = lâmina própria espessada por edema com afluxo de células inflamatórias; seta grossa = epitélio da bula timpânica; BT = luz da bula timpânica; círculo = parede óssea da bula timpânica). Hematoxilina-eosina (aumento 100x).....                | 56 |
| <b>Figura 13</b> | Fotomicrografia de bula timpânica de rato do grupo experimental mostrando fibrose intensa na mucosa e exsudato (seta curva = fibrose na mucosa; seta grossa = parede óssea da bula timpânica; seta fina = exsudato inflamatório; e BT = luz da bula timpânica). Hematoxilina-eosina (aumento 100x).....                            | 57 |
| <b>Figura 14</b> | Otomicroscopia de rato do grupo controle (aumento 10x): membrana timpânica normal (PF = parte flácida; PT = parte tensa; e M = cabo do martelo).....   | 57 |
| <b>Figura 15</b> | Otomicroscopia de rato do grupo controle (aumento 10x): membrana timpânica opaca (PT = parte tensa; e M = cabo do martelo).....  | 58 |
| <b>Figura 16</b> | Otomicroscopia de rato do grupo experimental (aumento 10x): membrana timpânica opaca e abaulada pela presença de fluido na orelha média (PF = parte flácida; e PT = parte tensa).....  | 58 |
| <b>Figura 17</b> | Otomicroscopia de rato do grupo experimental (aumento 10x): membrana timpânica opaca e retração leve (PF = parte flácida; PT = parte tensa; e M = cabo do martelo).....  | 59 |
| <b>Figura 18</b> | Otomicroscopia de rato do grupo experimental (aumento 10x): membrana timpânica perfurada (PERF) e presença de otorréia (OT).....   | 59 |
| <b>Figura 19</b> | Otomicroscopia de rato do grupo experimental (aumento 10x): membrana timpânica (MT) perfurada e presença de otorréia (OT).....   | 60 |

## RESUMO

**Introdução:** O colesteatoma da orelha média é uma doença inflamatória crônica associada muitas vezes à destruição do osso temporal. Há bastante tempo é conhecida a possibilidade de indução de colesteatomas pela introdução de certos agentes irritantes na orelha média, como misturas de talco e fibrina ou quinino. O propilenoglicol foi, recentemente, considerado uma droga eficaz na indução experimental do colesteatoma e é bastante usada, atualmente, com este objetivo. A mitomicina C tem uma ação antiproliferativa sobre os fibroblastos e apresenta efeitos de diminuição do tecido cicatricial após as cirurgias otorrinolaringológica e oftalmológica. **Objetivos:** Determinar se a administração da mitomicina C poderia evitar que a exposição ao propilenoglicol induzisse na orelha média de ratos o colesteatoma e a otite média. **Métodos:** O estudo foi experimental controlado e pareado. Vinte e quatro ratos albinos da linhagem Wistar foram submetidos a um total de três injeções intratimpânicas a cada semana nas suas orelhas direitas (grupo controle) e esquerdas (grupo experimental). A solução injetada na orelha média direita continha 0,2 mL de propilenoglicol a 50%, 0,1 mL de sulfato de gentamicina (40 mg/mL) e 0,1 mL de soro fisiológico a 0,9%. A solução injetada na orelha média esquerda continha 0,2 mL de propilenoglicol a 50%, 0,1 mL de sulfato de gentamicina (40 mg/mL) e 0,1 mL de mitomicina C (0,5 mg/mL). Os animais foram mortos após dez semanas para exames otomicroscópico e de microscopia de luz. **Resultados:** Houve diferença com significância estatística entre os grupos controle e experimental, em relação ao espessamento da mucosa ( $p = 0,004$ ) e à distribuição do espessamento da mucosa na bula timpânica ( $p = 0,038$ ). Não houve diferenças com significância estatística entre os grupos controle e experimental, no que se relaciona à espessura da membrana timpânica ( $p = 0,371$ ), à distribuição da espessura da membrana timpânica ( $p = 0,223$ ), à distribuição da integridade da membrana timpânica ( $p = 0,219$ ), à distribuição dos achados otomicroscópicos ( $p = 0,262$ ), à presença do exsudato ( $p = 0,125$ ), da fibrose ( $p = 1,000$ ) e do colesteatoma ( $p = 0,687$ ). **Conclusão:** A mitomicina C intratimpânica não foi eficaz para impedir na orelha média de ratos a formação de colesteatoma e otite média.

**Palavras-Chave:** Mitomicina C, Colesteatoma, Otite média, Propilenoglicol, Ratos Wistar.

## ABSTRACT

**Background:** Middle ear cholesteatoma is a chronic inflammatory disease associated often with destruction of the temporal bone. It has long been known that it is possible to produce cholesteatoma by introducing certain irritants in the middle ear as talc-fibrin mixtures and quinine. Propylene glycol has recently been found to be an effective drug for induction of experimental cholesteatoma and it is used widely with this purpose nowadays. Mitomycin C has an antiproliferative action on fibroblasts and it has been shown to decrease scar tissue after otolaryngologic and ophthalmologic surgeries. **Objectives:** To determine whether the administration of mitomycin C to rats would prevent propylene glycol exposure from inducing middle ears cholesteatomas and otitis media. **Methods:** It was an experimental controlled paired study. Twenty-four Wistar albino rats underwent a total of three intratympanic injections at each week in their right (control group) and left (experimental group) ears. The solution injected in the right ear contained 0.2 mL 50% propylene glycol, 0.1 mL gentamycin sulfate (40 mg/mL), and 0.1 mL physiologic saline (0.9%). The solution injected in the left ear contained 0.2 mL 50% propylene glycol, 0.1 mL gentamycin sulfate (40 mg/mL), and 0.1 mL mitomycin C (0.5 mg/mL). Animals were killed at ten weeks for otomicroscopic and light microscopic examination. **Results:** There were statistically significant differences between control and experimental groups regarding tympanic bulla mucosal thickness ( $p = 0.004$ ) and the distribution of tympanic bulla mucosal thickness ( $p = 0.038$ ). There were not statistically significant differences between control and experimental groups regarding tympanic membrane thickness ( $p = 0.371$ ), distribution of tympanic membrane thickness ( $p = 0.223$ ), distribution of tympanic membranes integrity ( $p = 0.219$ ), distribution of otomicroscopic findings ( $p = 0.262$ ), presence of exsudate ( $p = 0.125$ ), fibrosis ( $p = 1.000$ ), nor cholesteatoma ( $p = 0.687$ ). **Conclusion:** Intratympanic mitomycin C was ineffective in preventing middle ear cholesteatoma and otitis media in rats.

**Key Words:** Mitomycin C, Cholesteatoma, Otitis media, Propylene Glycol, Rats, Wistar.

# **INTRODUÇÃO**

A otite média crônica colesteatomatosa (OMCC) ou colesteatoma é uma doença que, segundo Schucknecht, acomete preferencialmente a orelha média e a mastóide em humanos<sup>1</sup>. Pode ser congênita em alguns casos, porém freqüentemente é adquirida, e classifica-se como primária ou secundária<sup>1</sup>. As verdadeiras causas da formação do colesteatoma em nível celular ainda não estão completamente esclarecidas e, devido às suas capacidades infecciosa e destrutiva na orelha média e na mastóide, freqüentemente cursa com otorrêia associada à perda auditiva<sup>2</sup>.

Além desses sintomas, o colesteatoma pode ser acompanhado de complicações intratemporais, tais como: mastoidite, paralisia facial periférica, fístula labiríntica, labirintite serosa ou purulenta e petrosite<sup>3</sup>. A OMCC também pode evoluir, mais raramente, para o surgimento de complicações intracranianas, tais como: meningite, abscessos (que podem ser extradurais, subdurais, cerebrais e cerebelares), além de tromboflebite do seio sigmóide<sup>4</sup>.

Ao longo dos últimos cinquenta anos, com a introdução e a disseminação da antibioticoterapia como importante ferramenta no controle das infecções da orelha média e o avanço na cirurgia otológica microscópica, têm diminuído proporcionalmente as complicações já descritas<sup>5</sup>. No entanto, o potencial patogênico considerável do colesteatoma não pode ser menosprezado, e o seu tratamento representa sempre um desafio para o cirurgião e um grande óbice para o paciente. Dessa forma, é sempre válida a investigação da patogênese e de possíveis outras formas de tratamento para essa doença. Isso é tão verdade que mesmo o tratamento cirúrgico, atualmente o padrão-ouro, pode apresentar taxas de colesteatomas residuais e recorrentes<sup>6</sup>.

É conhecida, há bastante tempo, a possibilidade de se produzir colesteatoma pela introdução de agentes irritantes na orelha média, conforme referiu Rüedi<sup>7</sup>. Assim sendo, vários pesquisadores vêm estudando a patogênese dos colesteatomas desde as suas primeiras descrições, através de estudos clínicos e experimentais<sup>7-13</sup>. As teorias que surgiram sobre a

natureza dos colesteatomas foram, no entanto, sempre insuficientes para responder de forma inequívoca aos questionamentos que se fazem sobre a sua etiopatogenia. Uma das perguntas centrais, por exemplo, é saber por que os queratinócitos da pele começam a penetrar na cavidade timpânica, a crescer como um colesteatoma e a levar à destruição do osso adjacente<sup>14</sup>. Tentar responder a essas indagações é a missão daqueles que trabalham na Otologia e se deparam com esta doença de complexa natureza molecular e celular em que consiste o colesteatoma<sup>9</sup>.

Ainda hoje, as discussões em torno deste assunto são freqüentes, ocupando o centro das atenções na Otologia, precisamente porque muitas questões não foram até agora satisfatoriamente esclarecidas. Isso se pode constatar, facilmente, pela enorme quantidade de material científico publicado que trata desse assunto, e que, naturalmente, tem um viés direcionado à pesquisa de novas possibilidades de tratamento<sup>15-21</sup>.

Nos últimos vinte anos, tem sido introduzida experimentalmente e na prática clínica a utilização da mitomicina C (MMC), droga que age na diminuição da proliferação de fibroblastos, para diversos fins<sup>22</sup>. Apesar disso, especificamente em Otorrinolaringologia, relativamente poucas pesquisas foram realizadas para estudar seus efeitos nesse campo.

As cirurgias otorrinolaringológicas são realizadas em cavidades pequenas, tendo grande potencial de formação de sinéquias e adesões, que podem influenciar negativamente os seus resultados<sup>23,24</sup>. Desta forma, o uso da MMC poderia ter eventual utilidade nesses casos. De todo modo, as propriedades farmacológicas da MMC permitem inferir uma possível capacidade de atuação no processo de formação do colesteatoma, e que pode ser estudada, apesar de, até o momento, não haver relatos do seu uso na literatura mundial no campo das otites médias crônicas colesteatomatosas<sup>25,26</sup>. À semelhança de diversas drogas testadas anteriormente, com o objetivo de reduzir a formação de colesteatoma, é preciso elaborar um

modelo de experimentação animal que contemple efetivamente a sua formação, bem como avaliar criteriosamente a atuação da MMC na sua gênese<sup>15-18,20,22</sup>.

Neste estudo, pretende-se induzir um processo inflamatório e a formação do colesteatoma na orelha média de animais de experimentação, a fim de verificar se a utilização da MMC pode influenciar seu tamanho e desenvolvimento. A possibilidade da aplicação em humanos em estudos posteriores, caso a droga tenha o potencial de reduzir a formação do colesteatoma, é a intenção subjacente que impulsiona e justifica a realização desta pesquisa.

## **OBJETIVOS**

## 2.1 Geral

Analisar os efeitos da mitomicina C no desenvolvimento do colesteatoma e da otite média em ratos, submetidos à injeção intratimpânica de propilenoglicol (PG).

## 2.2 Específicos

### **Realizar análise das seguintes alterações histopatológicas:**

- ✍ a presença de epitélio queratinizado (colesteatoma) na orelha média;
- ✍ o tipo e a extensão da inflamação na mucosa da orelha média;
- ✍ as alterações morfológicas na membrana do tímpano;
- ✍ a presença de exsudato e de fibrose na mucosa na orelha média;
- ✍ **Determinar as alterações otomicroscópicas da orelha média.**

## **LITERATURA**

### 3.1 Otite média crônica colesteatomatosa

#### 3.1.1. Histórico

A primeira descrição do colesteatoma relatada na literatura foi realizada por Guichard Joseph Duverney, anatomista e otologista francês, em 1683, no seu livro *Traité de l'organe de l'ouïe* (Tratado do órgão da audição) (Figura 1)<sup>27</sup>. Ele o denominou “esteatoma”, e literalmente dizia o seguinte<sup>28,29</sup>:

“La carie de l’os arrive quelque fois après ses abcès du conduit, qui s’ouvrent derrière l’oreille, et pour lors on a remarqué qu’il s’est fait une fistule au dessus de l’apophyse mastoïde, qui a pénétré dans les sinuosités, et qui a fait tomber em formes d’écailles les petites feuilles qui les composent. Cette carie est accompagnée d’une très mauvaise odeur, et de très fâcheux accidents, et elle pénètre très facilement dans la caisse par le moyen du conduit... ce qui détruisant toutes les parties qui y sont enfermées cause une surdité”.

Uma tradução livre do texto seria:

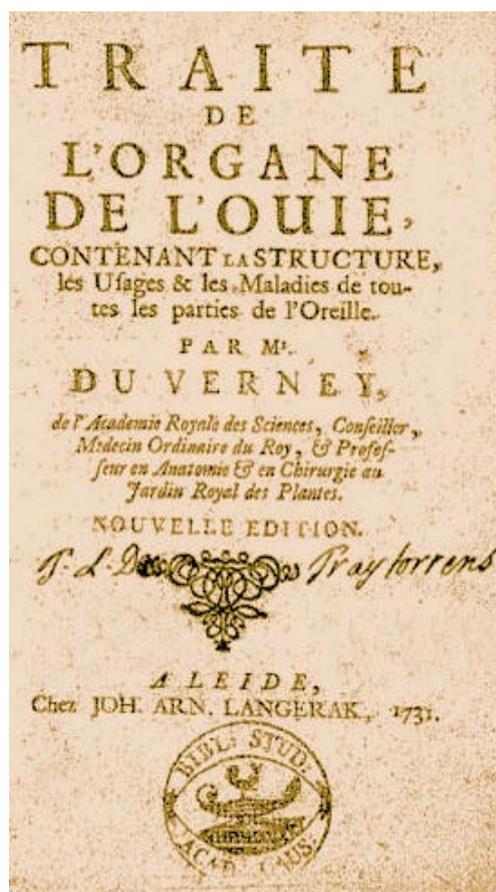
“A cárie do osso aparece algumas vezes após abscessos do conduto (auditivo externo), os quais se abrem na parte de trás da orelha, e por onde se observa que se faz uma fístula acima da apófise mastóide e que, penetrando em suas sinuosidades, arranja-se em forma de escamas de pequenas folhas que as compõem. Essa cárie é acompanhada por um odor fétido, por sintomas muito importunos, e penetra facilmente na caixa (do tímpano) por meio do conduto (auditivo externo)..., destruindo aí todas as partes que estão doentes, causando surdez”.

Apesar de o termo “colesteatoma” não estar presente, todos os pontos importantes da doença foram mencionados, tais como: perda auditiva, fístula retroauricular, otorrêia fétida a partir do conduto auditivo externo (CAE) e da fístula, além da presença de lâminas de tecido colesteatomatoso na mastóide fistulizada.

Em 1829, Cruveilhier denominou o colesteatoma de “tumor perolado”, ou *tumeur perleé*”, devido às suas características macroscópicas<sup>30</sup>. Na realidade, pensava tratar-se de um tumor avascular originado de células do espaço subaracnóideo<sup>30</sup>. É interessante notar que, na descrição feita por Duverney, não é usado o termo “colesteatoma”, que só seria introduzido

cerca de 150 anos depois, em 1838, por Johannes Müller, para designar uma afecção que ele acreditava tratar-se de um tumor de colesterina e gordura<sup>29</sup>.

Obviamente, o termo se revelou inapropriado, pois o colesteatoma não pode ser considerado um tumor e não tem a sua natureza determinada pela presença de colesterina, nem de gordura (*chole*, de bile; *steator*, de gordura; e *oma* de tumor)<sup>30</sup>. Schuknecht o denominou “queratoma”, mas esse termo, ainda que mais apropriado, não foi adotado de forma ampla no meio científico<sup>29</sup>. Apesar de o termo “colesteatoma” ser uma denominação inadequada, ele está firmemente enraizado na literatura e persiste até nossos dias, estando consagrado pelo uso<sup>2,30</sup>. Virchow designou de “colesteatomas primitivos” aos que atualmente se conhecem como “colesteatomas congênitos”<sup>29</sup>.



**Figura 1.** Capa do livro *Traité de l'organe de l'ouïe* (Tratado do órgão da audição), de Guichard Joseph Duverney, Edição de 1731 (Adaptado de Mudry<sup>27</sup>).

Uma definição clássica, proposta por Schuknecht, considera que o colesteatoma consiste em um acúmulo de queratina esfoliada na orelha média, na mastóide ou em outras áreas pneumatizadas do osso temporal e que as invade a partir do conduto auditivo externo<sup>1</sup>. Um outro conceito, mais recente, poderia ser aquele formulado por Bujía, que referiu ser o colesteatoma uma doença comum da orelha média (histologicamente composta pela presença de uma matriz epitelial e outra de tecido conjuntivo), caracterizada por uma alteração da regulação dos queratinócitos e comportamento hiperproliferativo, acompanhados da destruição de ossículos e do osso temporal<sup>8</sup>.

Na realidade, histologicamente, o colesteatoma é uma estrutura formada por epitélio escamoso estratificado queratinizado que repousa sobre tecido conjuntivo, contendo fibras colágenas, elásticas, fibras de reticulina, fibroblastos, linfócitos, histiócitos, plasmócitos, além de vasos neoformados<sup>30</sup>. Possui características hiperproliferativas e causa frequentemente destruição óssea, levando a diversas complicações, dentre as quais as mais graves são as meningites e os abscessos cerebrais<sup>30</sup>.

### 3.1.2 Epidemiologia

Em estudo epidemiológico realizado na Finlândia, a otite média crônica colesteatomatosa apresentou incidência média de 9,2 casos por ano/100.000 habitantes (variação de 3,7 a 13,9), tendo ocorrido mais frequentemente em adultos do sexo masculino com predomínio entre a quarta e a quinta década de vida<sup>31</sup>. Os pacientes com colesteatoma apresentaram passado de episódios de otite média em sua maioria (72%), além de antecedentes cirúrgicos, anteriores ao tratamento de colesteatoma, tais como: timpanotomia (10,2%) e adenoidectomia ou adenoidectomia com tonsilectomia (15,9%)<sup>31</sup>. Foram encontrados também antecedentes de trauma ou cirurgia otológica prévia em 13,2% dos

casos<sup>31</sup>. Em um total de 522 orelhas com colesteatoma estudadas, a incidência do mesmo com membrana timpânica intacta foi de 0,6%<sup>31</sup>. Nos pacientes com fenda palatina esteve presente em 8% dos casos<sup>31</sup>. O colesteatoma foi bilateral em 4,4% dos pacientes estudados<sup>31</sup>. É interessante notar que, nesse estudo, não houve acúmulo de casos de colesteatoma em pacientes de baixo poder aquisitivo<sup>31</sup>.

Em outro estudo epidemiológico, realizado nos Estados Unidos da América (EUA), foi observada uma incidência de seis casos por ano/100.000 habitantes, no estado de Iowa, com predominância dos casos na segunda e terceira décadas de vida, respectivamente 9,1 e 8,1 casos por ano/100.000 habitantes<sup>32</sup>.

Segundo Cody, em seu estudo na Clínica Mayo, entre 1963 e 1969, os colesteatomas adquiridos primários estiveram presentes em 80,5% dos seus casos, de um total de 483 pacientes operados; os colesteatomas adquiridos secundários, em 17,5%; e os colesteatomas congênitos, em 2%<sup>33</sup>. Nos pacientes com colesteatomas adquiridos (primários e secundários), ele observou que 63% ocorreram no sexo masculino e 37% no feminino<sup>33</sup>. Os colesteatomas congênitos perfizeram um total de 80% nos pacientes do sexo masculino e 20% nos do feminino<sup>33</sup>.

### **3.1.3 Classificação**

O colesteatoma pode ser classificado, quanto a sua patogênese, em congênito, adquirido (primário ou secundário) ou, ainda, menos freqüentemente, em iatrogênico<sup>1</sup>. O colesteatoma adquirido primário ocorre no epítimpano como consequência da invasão epidérmica a partir da perfuração ou retração da membrana timpânica de Shrapnell<sup>1</sup>. Pode estender-se posteriormente para o antro, para as células periantrais, para a mastóide e, anteriormente, para o recesso epítimpânico anterior ou, inferiormente, para a orelha média<sup>1</sup>. O

colesteatoma adquirido secundário ocorre pela invasão de pele através de uma perfuração marginal pósterio-superior, que se estende ao mesotímpano posterior e daí para o epítímpano e para a mastóide<sup>1</sup>. Não há diferenças óbvias, entretanto, nos padrões moleculares e celulares nos vários tipos de colesteatoma<sup>9</sup>.

Uma outra situação é a dos colesteatomas ditos congênitos, ou mesotimpânicos, que estão presentes por trás de uma membrana timpânica estruturalmente intacta<sup>10</sup>. Há evidências de que o colesteatoma pode surgir a partir de um resto epidérmico atrás de uma membrana timpânica intacta, a partir de uma retração resolvida da parte tensa da mesma, conforme relataram Sudhoff e Linthicum<sup>10</sup>. Todavia, o colesteatoma congênito verdadeiro é aquele em que não há passado de otite média, timpanotomias, colocação de tubos de ventilação ou outra cirurgia otológica prévia<sup>29,34</sup>.

Tos enfatiza que as doenças da orelha média durante a infância exibem uma dinâmica intensa com deteriorações, melhoras e novas recorrências de disfunção tubária, otite secretora e otite média supurativa aguda<sup>11</sup>. As retrações das membranas timpânicas podem repetidamente fixar-se ao martelo e à bigorna, seguidas da diminuição da tensão e retorno ao seu estado normal<sup>11</sup>. Pode ocorrer, fortuitamente, a inclusão de epitélio escamoso queratinizado, levando, algumas poucas vezes, a casos de formação de colesteatoma com membrana timpânica intacta<sup>11</sup>.

Ainda com relação à origem dos colesteatomas congênitos, o estudo de ossos temporais humanos de crianças até um ano de idade, que haviam sofrido a síndrome da morte súbita na infância, bem como de fetos que não completaram o período gestacional, não mostrou, como já se cogitou no passado, a presença de aspiração de epitélio escamoso e líquido amniótico na orelha média e na mastóide<sup>35</sup>.

Com base na história otológica, na otoscopia, na pneumatização da mastóide e na função da tuba auditiva, Fisch elaborou a seguinte classificação (Quadro 1) para o

colesteatoma com a criação da categoria do colesteatoma adquirido terciário (conseqüente à cirurgia otológica prévia)<sup>36</sup>:

**Quadro 1.** Classificação do colesteatoma proposta por Fisch<sup>36</sup>

| Colesteatoma         | História otológica   | Otoscopia  | Pneumatização | Função da tuba |
|----------------------|--|--|---------------|----------------|
|                      |  |  | mastóidea     | auditiva       |
| Congênito            | Ausente  | Membrana timpânica intacta; massa branca atrás da membrana timpânica | Muito boa     | Geralmente boa |
| Adquirido primário   | Otites médias frequentes na infância; ausência de otorréia | Perfuração da membrana de Shrapnell                                  | Má            | Variável       |
| Adquirido secundário | Otorréia frequente desde a infância                        | Perfuração marginal da parte tensa                                   | Má            | Má             |
| Adquirido terciário  | Cirurgia otológica prévia                                  | Variável   | Variável      | Variável       |

### 3.1.4 Patogênese

Soldati e Mudry realizaram revisão da literatura sobre o colesteatoma, compreendendo o período de 1683 a 1999, e procederam a um relato cronológico das diversas teorias que tiveram lugar para explicar a sua gênese. Essas teorias serão descritas a seguir<sup>28</sup>.

Virchow, em 1855, considerou que o colesteatoma seria derivado da metaplasia das células mesenquimais em epidérmicas<sup>28</sup>. Em 1868, Gruber, Wendt e Von Troeltsch lançaram a teoria da metaplasia das células da mucosa timpânica em epitélio malpighiano, mais tarde referendada por Sadé<sup>30</sup>. Politzer, em 1869, referiu que o colesteatoma seria uma neoplasia glandular da mucosa da orelha média<sup>28</sup>. Em 1889, Bezold e Habermann preconizaram que o

colesteatoma seria o resultado da migração do epitélio do conduto auditivo externo para dentro da orelha média, a partir de uma perfuração marginal após uma otite média aguda ou crônica<sup>28</sup>.

Young e Chole, estudando as diversas teorias que se poderiam confirmar como verdadeiras na etiopatogenia do colesteatoma (como as teorias da invaginação, da hiperplasia de células basais, da metaplasia e da invasão epitelial), sugeriram que as duas primeiras, em combinação, poderiam ser responsáveis pelos colesteatomas formados a partir das bolsas de retração<sup>37</sup>. A teoria da invaginação, segundo esses autores, originalmente proposta por Wittmaack, em 1933, seria um mecanismo primário de formação de colesteatomas a partir de pressão negativa criada na orelha média por disfunção tubária<sup>37</sup>. Uma vez que este processo não se resolva, os padrões de migração epitelial normal tornam-se alterados e levam ao acúmulo de queratina nessas bolsas, e subsequente formação de colesteatoma<sup>37</sup>.

A teoria de células basais, ou de crescimento papilar, seria explicada pela ruptura da membrana basal com aparecimento de pseudópodes na lâmina própria, que formam cones epiteliais e, eventualmente, microcolesteatomas<sup>37</sup>. Com base em achados clínicos e de imunohistoquímica, e combinando as teorias da retração e da proliferação, Sudhoff e Tos propuseram um modelo para a formação do colesteatoma atical, que estaria dividida em quatro estágios: 1. estágio da bolsa de retração; 2. estágio de proliferação da bolsa de retração através da formação e fusão de cones; 3. estágio de expansão do colesteatoma atical; e 4. reabsorção óssea<sup>12</sup>.

A teoria da invasão epitelial pode ser responsável pela formação de colesteatoma através do processo denominado “orientação por contato”, no qual há migração de células epiteliais deslocando-se sobre uma superfície, e que cessa quando estas encontram outra superfície epitelial, fenômeno conhecido como “inibição de contato”<sup>37</sup>. Esse mecanismo teria lugar, tipicamente, na otite média, quando a inflamação causa perfuração da membrana

timpânica, permitindo a invasão de células epiteliais escamosas na orelha média<sup>37</sup>. Essa teoria ganha suporte a partir do fato de que o colesteatoma humano apresenta componentes cerato-hialínicos e expressa algumas citoqueratinas localizadas preferencialmente na pele, e não na mucosa da orelha média<sup>38</sup>. Contudo, não está claro por que o processo de hiperqueratinização se inicia, e pareceu, inclusive, não haver esta predisposição quando foram estudados pacientes com colesteatoma, ao contrário daqueles com psoríase, nos quais foi detectada uma hiperproliferação generalizada<sup>38</sup>. Lim e colaboradores referiram que as reações inflamatórias podem ser a causa da migração celular para a cavidade da orelha média pela ruptura da membrana basal<sup>39</sup>.

A disfunção tubária tem sido responsabilizada pelo aparecimento da atelectasia da orelha média e das bolsas de retração<sup>37</sup>. A bolsa de retração consiste numa invaginação para dentro do espaço da orelha média a partir da membrana timpânica e pode ocorrer na parte tensa ou na membrana de Shrapnell<sup>1</sup>. Em estudo no qual foi utilizada a análise por vídeo com sistema de câmera lenta, em pacientes com doenças da orelha média, foram evidenciados como causas principais da falha na função tubária o edema mucoso seguido da redução do movimento de dilatação da parede lateral da tuba auditiva<sup>40</sup>. No entanto, não foi possível correlacionar a gravidade da doença na orelha média com a da disfunção tubária<sup>40</sup>.

Apesar de a disfunção crônica da tuba auditiva poder levar à alteração da pressão na orelha média, tornando-a inferior à pressão atmosférica, ou comumente dita negativa, Sadé identificou uma condição em que aquela era superior a esta, e cunhou para ela o termo “hiperectasia”, tendo observado que mastóides pobremente pneumatizadas estariam relacionadas tanto com a atelectasia como com a hiperectasia<sup>41</sup>. A mastóide pneumatizada atuaria, assim, como um tampão regulando a pressão na orelha média<sup>41</sup>.

Foram descritos por Sadé quatro estágios para a retração timpânica da parte tensa, a saber: estágio I (retração timpânica leve); estágio II (retração timpânica sobre a articulação

incudo-estapediana); estágio III (retração sobre o promontório); e estágio IV (adesão da parte tensa ao promontório)<sup>42</sup>. No estágio III, a membrana timpânica poderia ser levantada do promontório, enquanto que no estágio IV isso não é possível<sup>42</sup>. Essas bolsas de retração seriam secundárias à longa disfunção tubária, e seriam precursoras dos colesteatomas<sup>42</sup>.

Há fortes evidências de que as bactérias podem infectar a matriz de queratina dos colesteatomas, formando biofilmes e levando à infecção crônica e à proliferação epitelial<sup>43</sup>. Isso explicaria a persistência e a recorrência de infecção em colesteatomas previamente infectados e, assim, a erradicação cirúrgica torna-se o único tratamento efetivo<sup>43</sup>.

Após essa breve exposição das teorias, com conclusões ainda conflitantes, parecem acertadas as palavras de Duverney, pioneiro na descrição do colesteatoma, que ao final de seu trabalho escreveu:

“Eu não acredito que meu trabalho seja aceito por todos: minhas teorias parecem ser muito factíveis para mim, mas outros podem não concordar. De qualquer forma, eu acredito ter realizado um bom trabalho e espero que alguém encontre algo melhor”<sup>28</sup>.

### 3.1.5 Considerações sobre a histologia e a biologia molecular

As pesquisas realizadas em colesteatomas, sob a visão da biologia molecular e da microscopia eletrônica, permitiram que várias descobertas fossem realizadas, as quais, por sua importância, devem ser descritas para ampliar o entendimento acerca dessa doença.

Lim e colaboradores, a partir dos estudos de microscopia de luz e eletrônica, analisaram a estrutura histológica dos colesteatomas e observaram que eles apresentam um epitélio e uma camada subepitelial, os quais denominaram, respectivamente, “matriz” (ou epiderme) e “perimatriz” (ou lâmina própria) do colesteatoma<sup>39</sup>. O epitélio é escamoso estratificado queratinizado, com as quatro camadas clássicas da epiderme (basal, espinhosa, granulosa e córnea), além de células de Langerhans em quantidade variável, grânulos cerato-hialínicos e desmossomas<sup>39</sup>. Abaixo do epitélio, na perimatriz, observaram a presença de um

tecido conjuntivo frouxo, contendo fibras colágenas, fibras reticulares, fibrócitos, capilares e células inflamatórias<sup>39</sup>. À microscopia eletrônica, observaram uma membrana basal bem desenvolvida, na junção dermo-epidérmica, que está aderida às células basais por hemidesmosomas e parcialmente ancorada à derme por fibras reticulares<sup>39</sup>. Na camada basal há células com pseudópodes que migram por meio destes e promovem o crescimento do colesteatoma<sup>39</sup>.

Encontra-se, na membrana basal, uma glicoproteína chamada “fibronectina”, que tem um importante papel na cicatrização de feridas, estimulando a migração de células epiteliais, além de neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais<sup>44</sup>. No entanto, no colesteatoma não há perda de expressão da fibronectina, como acontece na pele e na córnea após algum tempo de cicatrização, ocorrendo acúmulo da mesma no tecido subepitelial inflamado e no tecido de granulação<sup>44</sup>. Pode-se depreender, portanto, que o colesteatoma é uma doença da orelha média, de características inflamatória crônica e hiperproliferativa, exibindo comportamento semelhante aos processos regenerativos de cicatrização de feridas<sup>44</sup>.

As células epiteliais possuem filamentos protéicos no seu citoplasma, denominados “citoqueratinas”, que fazem parte do seu citoesqueleto e que chegam a vinte tipos diferentes<sup>45</sup>. O colesteatoma possui as citoqueratinas 1, 2 e 10, típicas do epitélio escamoso estratificado queratinizado, e as citoqueratinas 5 e 14, típicas dos epitélios estratificados, sejam queratinizados ou não<sup>30,45</sup>. A mucosa da orelha média, todavia, tem padrão diferente, apresentando as citoqueratinas 8, 18 e 19, características dos epitélios simples<sup>45</sup>.

Esses achados explicam a razão pela qual a teoria da migração epitelial pode ser considerada na gênese do colesteatoma adquirido. Outro aspecto interessante é a presença da citoqueratina 16, filamento protéico situado no citoplasma das células epiteliais, característico dos epitélios em estágio de hiperproliferação e na matriz dos colesteatomas em humanos, bem

como do antígeno nuclear Ki-67 (Ki-67), que também aparece nas células em estágio de proliferação<sup>9,45</sup>.

As citocinas, conjuntamente com as citoqueratinas, são substâncias que vêm sendo estudadas no intuito de se compreender melhor a natureza agressiva dos colesteatomas<sup>30</sup>. Elas são produzidas por macrófagos e linfócitos no local da infecção, em resposta a algum estímulo, e são capazes de alterar o seu comportamento ou das células vizinhas, sendo potentes mediadoras dos processos inflamatórios e da resposta imune, podendo ser identificadas por meio de técnicas de imuno-histoquímica<sup>46</sup>. Estão presentes no epitélio dos colesteatomas e modulam o processo da reabsorção óssea característico dessa doença<sup>30</sup>. Podem ser enumeradas as seguintes citocinas: Interleucinas 1 (IL-1), 6 e 8; Interferon; Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); Fator de Crescimento de Fibroblastos; Receptor do Fator de Crescimento Epitelial; e Fator Transformador do Crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>30</sup>.

As Interleucinas 1 e 6 estimulam a reabsorção óssea por indução da formação de osteoclastos, produção de prostaglandinas e collagenases, e estão em maior concentração no colesteatoma do que na pele normal<sup>46,47</sup>. O TNF- $\alpha$  aumenta a atividade das collagenases, que expõem o tecido ósseo à ação dos osteoclastos, bem como aumenta a produção de queratina, que leva ao aumento da formação do tecido de granulação<sup>48</sup>. O TNF- $\alpha$  também tem ação tumoricida pela necrose tissular por coagulação, e tem efeito sinérgico com a IL-1<sup>49</sup>.

O TGF- $\beta$  tem efeito antiinflamatório e inibidor sobre os osteoclastos e os queratinócitos e, potencialmente, pode lentificar o seu crescimento e proliferação, e a resultante destruição tissular do colesteatoma na orelha média<sup>46</sup>. As moléculas de adesão, como a Molécula de Adesão Intercelular 1 e a Molécula de Adesão Derivada do Endotélio de Leucócitos 1, que recrutam células inflamatórias e modulam a resposta imune, têm relação com o epitélio da perimatriz do colesteatoma<sup>50</sup>. O Fator de Crescimento Epidérmico atua no desenvolvimento dos colesteatomas, estimulando o crescimento e a proliferação das células

epiteliais<sup>51</sup>. A Fosfolipase C Gama-1 parece estar envolvida nas vias de sinalização celular para estímulo de proliferação e diferenciação do colesteatoma<sup>52</sup>. O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular representa um marcador confiável de proliferação celular, mostrando que o colesteatoma prolifera a uma taxa mais elevada do que a epiderme normal e os queratinócitos têm maior proliferação em crianças do que em adultos<sup>8,53</sup>.

Existe uma colagenase, denominada Metaloproteína 1 da Matriz, presente nos fibroblastos do estroma do colesteatoma, que está com sua expressão aumentada, podendo ser a causadora da destruição óssea observada nessa doença<sup>54</sup>. As metaloproteinases e o Fator de Crescimento Fibroblástico Básico podem ter importante papel na manutenção da atividade proliferativa e no comportamento agressivo do colesteatoma, tendo sido observadas áreas de inflamação intensa com protrusões, duplicações, espessamento e ruptura da lâmina densa da membrana basal<sup>55</sup>. Em síntese, o colesteatoma comporta-se mais como um processo de cicatrização de ferida do que propriamente como uma neoplasia, caracterizando-se como uma resposta idiopática potencial hiperproliferativa a estímulos internos e externos<sup>9</sup>.

Estudo recente mostrou que há um aumento da regulação e expressão do Receptor Gama Ativado por Proliferador de Peroxissomo no colesteatoma humano, que é responsável por limitar a proliferação e promover a diferenciação de várias linhagens celulares, tanto benignas como malignas<sup>56</sup>. Também foi observado que o colesteatoma estava com expressão aumentada do anticorpo nuclear Ki-67<sup>56</sup>. Esses achados, em conjunto, permitiram concluir que, apesar de o colesteatoma estar em um estado hiperproliferativo, suas células permanecem com capacidade de diferenciação<sup>56</sup>. Em estudo com gerbilos da Mongólia, foram observados indícios de que há diferenças entre a natureza biológica das células epiteliais normais e a das células do colesteatoma, especialmente nas camadas basais, e suas características parecem não mudar uma vez que esse se desenvolva<sup>57</sup>. Nesse mesmo trabalho, também foi identificada a pele do conduto auditivo externo como origem do colesteatoma<sup>57</sup>. A infecção bacteriana, por

outro lado, impede que o colesteatoma volte ao estado quiescente<sup>9</sup>. Este tema é controverso, pois, em outro estudo, não foram observadas diferenças entre colesteatomas infectados e não-infectados, indicando que seu padrão hiperproliferativo é independente de influências externas, como a contaminação bacteriana<sup>8</sup>. Há relato, contudo, de que o tratamento com antibiótico não afeta o nível de concentração de citocinas em pacientes com otite média crônica (OMC) e colesteatoma, embora a otorrêia diminua e os sintomas relacionados à inflamação regridam em alguns casos<sup>49</sup>.

Em crianças há, caracteristicamente, um crescimento mais extenso e rápido dos colesteatomas na orelha média e na mastóide, requerendo maior atenção para o diagnóstico precoce, a remoção cirúrgica total e o seguimento pós-operatório rigoroso<sup>58</sup>. Essas peculiaridades dos colesteatomas em crianças podem ser explicadas pela taxa aumentada da proliferação dos queratinócitos, que pode ser avaliada usando o anticorpo monoclonal anti-MIB-1 (MIB-1), usado largamente como marcador de proliferação celular, que reage com o antígeno nuclear Ki-67 que está presente nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, estando ausente em G0 e início de G1<sup>58</sup>. O uso do MIB-1 poderia identificar os casos com maior potencial agressivo, dando ao clínico uma sinalização para o acompanhamento pós-operatório<sup>58</sup>.

O processo de apoptose no colesteatoma é mediado por uma família de proteases denominadas caspases<sup>59</sup>. O TNF- $\alpha$  ativa a caspase-8 que, por sua vez, ativa a caspase-3, e esta, as nucleases que induzem a apoptose<sup>59</sup>. As caspases estão presentes na matriz do colesteatoma, sendo que a caspase-3 está nas camadas granulosa e escamosa, e a caspase-8 na camada granulosa<sup>59</sup>. Elas estão aparentemente associadas à acumulação de grande quantidade de debris de queratina e infecção que ocorre no colesteatoma<sup>59</sup>.

Apesar de haver uma proliferação celular aumentada no colesteatoma, que pode ser identificada pela presença do marcador celular Ki-67, existem também complexos de ciclinas

(das quais a p27<sup>Kip1</sup>, inibidora das quinases ciclino-dependentes, é uma representante e promotora de apoptose) que atuam no ciclo celular<sup>60</sup>. Desta forma, apesar de haver tendência à proliferação aumentada no colesteatoma, as suas células retêm a capacidade de controle do ciclo celular, o que não acontece, por exemplo, em tumores malignos<sup>60</sup>. Foi demonstrado que a expressão da proteína p53, gene supressor tumoral, que exerce papel crítico no controle do ciclo celular, na apoptose e na oncogênese, estava aumentada cerca de nove a vinte vezes em amostras de colesteatomas, quando comparadas à de pele da região pós-auricular ou da membrana timpânica<sup>61</sup>. Não houve, no entanto, nesse estudo, diferenças clínicas ou patológicas em relação aos diversos grupos de colesteatoma, sejam adquiridos primários, adquiridos secundários, recorrentes ou congênitos<sup>61</sup>.

Em colesteatomas humanos, a proteína ErbB-2, oncogene presente nas células basais de epitélio escamoso, está com sua expressão aumentada, e a proliferação celular e a apoptose dos queratinócitos estão aceleradas<sup>62</sup>. Essa proteína está presente em todas as camadas da matriz colesteatomatosa e pode ter efeito modulador sobre a diferenciação terminal e a apoptose dos queratinócitos da mesma<sup>62</sup>.

O c-MYC, proto-oncogene que atua no controle da proliferação celular, na diferenciação e na apoptose, está aumentado ou com expressão aberrante em diversos tumores, como câncer de mama, de pulmão e espinocelulares de cabeça e pescoço<sup>63</sup>. Também se observou expressão aumentada do c-MYC em colesteatomas, o que talvez explique a sua tendência de hiperproliferação, apesar de sua base genética ainda não estar suficientemente clara<sup>63</sup>.

No colesteatoma humano podem ser encontrados diversos genes com expressão aumentada. Entre esses, alguns são relacionados à proliferação e diferenciação celular (calgranulina A, calgranulina B, psoriasina, timosina beta-10), e outros com a invasão celular

(catepsina C, catepsina D, catepsina H)<sup>64</sup>. As catepsinas podem contribuir para a invasão do colesteatoma, agindo como proteases, já que realizam a degradação da sua membrana basal<sup>64</sup>.

A proteína morfogenética do osso-2 é um fator de crescimento que funciona como indutor da diferenciação de osteoblastos<sup>65</sup>. No entanto, passa a ser um indutor da diferenciação de osteoclastos na presença de IL-1 e potencialmente da prostaglandina E2<sup>65</sup>. Em um ambiente sem inflamação há um equilíbrio entre a geração de osso por osteoblastos e a sua destruição pelos osteoclastos, porém uma vez que exista inflamação há uma tendência a um predomínio destes e, portanto, um possível papel na patogênese do colesteatoma<sup>65</sup>.

A hipóxia foi, recentemente, sugerida como um dos principais precursores do início e da progressão do colesteatoma, a partir da proliferação de queratinócitos na bolsa de retração atical, evidenciado por estudo que mostrou a presença, nessa bolsa, do Fator Indutor de Hipóxia 1-a e da proteína de Von Hippel Lindau, que regulam genes responsáveis pelo aumento da disponibilidade de oxigênio ou permitem adaptação metabólica a sua diminuição<sup>14</sup>.

Existe a suposição de que os colesteatomas congênitos derivem de restos vestigiais ou aberrantes, diferentemente daqueles adquiridos<sup>66</sup>. Após análise do comprimento dos telômeros, pelo método de extração do ácido desoxirribonucléico (DNA), em colesteatomas congênitos e adquiridos, verificou-se diferença entre eles<sup>66</sup>. Ao se avaliar a atividade da telomerase, que está menos intensa nos colesteatomas congênitos, porém se encontra preservada nos colesteatomas adquiridos e na pele normal, aventou-se a possibilidade de que esses tecidos vestigiais e aberrantes sejam eliminados por apoptose na maioria dos indivíduos normais<sup>66</sup>.

Em estudo semelhante, realizado avaliando-se o comprimento do telômero e a atividade da telomerase, em um grupo de amostras de colesteatomas humanos comparado com o carcinoma espinocelular, foram encontrados os seguintes resultados: o comprimento

dos telômeros foi semelhante nos dois grupos, porém a atividade da telomerase estava reduzida nos colesteatomas<sup>67</sup>. Esses achados, em conjunto, permitem supor que os colesteatomas, pela baixa atividade da telomerase, produziram telômeros disfuncionais, culminando em ativação de respostas de dano ao DNA e apoptose, limitando seu crescimento, enquanto que no carcinoma espinocelular, com a sua atividade aumentada, haveria crescimento celular contínuo e progressão tumoral<sup>67</sup>.

### **3.2 Indução experimental de colesteatomas**

Dentre os diversos animais, o rato tem sido um bom modelo para realização de estudos visando à indução de colesteatomas<sup>68</sup>.

Os ratos albinos têm todas as estruturas anatômicas encontradas na orelha média de humanos, contudo o nervo facial sai do osso temporal de forma mais superficial e os ossículos são menores, levando-se em consideração os padrões desses<sup>69</sup>. Nos ratos, os ossículos possuem aproximadamente um quarto do tamanho dos que existem em humanos, e ficam praticamente escondidos no epítimpano<sup>69</sup>. A artéria carótida interna passa entre as cruras do estribo (onde recebe a designação de artéria estapediana), dirigindo-se do pescoço ao cérebro, e a mastóide é representada por uma célula aérea aberta grande, localizada mais inferiormente, que se denomina “bula”<sup>69</sup>.

A membrana timpânica nos ratos, normalmente formada de uma parte tensa e uma parte flácida, é constituída de uma superfície lateral, composta por epitélio escamoso queratinizado, que se continua com a pele do CAE; uma camada central, formada por uma lâmina própria espessa, onde se encontram primariamente feixes de fibras colágenas; e, finalmente, de uma camada mucosa interna de epitélio achatado em continuidade com a mucosa da cavidade timpânica<sup>70</sup>.

Segundo Helsström e colaboradores, otoscopicamente, a membrana timpânica dos ratos não tem, normalmente, demarcação evidente com a pele do conduto auditivo externo e possui aspecto cinza-perolado e semitransparente, sendo composta de uma parte flácida que ocupa de 1/4 a 1/3 da sua área total, localizada entre a curta apófise do martelo e a incisura de Rivinus, e de uma parte tensa que ocupa o restante da mesma<sup>71</sup>. Esses autores referem ainda que as diferenças entre a anatomia do osso temporal de ratos e de humanos, embora sejam consideráveis, naqueles têm mínima importância quanto ao aspecto funcional<sup>71</sup>.

De fato, o rato apresenta vantagens sobre a cobaia que não tem uma parte flácida e na qual o epítímpano está completamente separado da orelha média por uma lâmina óssea, além de ter a bigorna e o martelo fundidos e uma trave óssea que atravessa as cruras do estribo<sup>71</sup>. Essa característica, apesar de tornar mais fácil a exposição ossicular, não tem o aspecto mais compatível com humanos, em vista de os ratos possuírem os três ossículos distintamente, à semelhança daqueles<sup>71</sup>. A orelha média da chinchila, por exemplo, tem várias traves ósseas<sup>71</sup>. Já a orelha média de gatos, apesar de também ser muito parecida com a de humanos, apresenta os ossículos, o nervo facial e os músculos tensores do tímpano e do estapédio profundamente insinuados no epítímpano, tornando o acesso a essas estruturas mais laborioso<sup>71</sup>.

Em relação à histologia, a mucosa da orelha média do rato é similar à de seres humanos, e é formada pelo epitélio e pela camada subepitelial, sendo esta composta de fibras colágenas, capilares sanguíneos, linfáticos e nervos<sup>72</sup>. O maior dos componentes celulares é o fibrócito, enquanto mastócitos, macrófagos, linfócitos e células plasmáticas aparecem ocasionalmente<sup>72</sup>. O epitélio mucoso no pró-tímpano e hipotímpano consiste de células colunares com alguns cílios, enquanto que no promontório e na mastóide se encontram células cubóides<sup>72</sup>.

Experimentalmente, há várias maneiras de induzir a formação de colesteatomas. Tradicionalmente, pode ser feita através da ligadura do CAE, pela obstrução da trompa de Eustáquio (tuba faringo-timpânica) e pela introdução de agentes irritativos na orelha média<sup>7, 13, 73, 74</sup>. Em gerbilos da Mongólia, inclusive, é possível aparecerem colesteatomas espontâneos a partir da membrana timpânica e do CAE<sup>73</sup>. Esses colesteatomas, em gerbilos da Mongólia, induzidos a partir da ligadura cirúrgica do CAE, são muito semelhantes na sua estrutura histopatológica aos produzidos em humanos levando inclusive à erosão óssea<sup>13</sup>.

Gerbilos da Mongólia foram submetidos à obstrução bilateral da tuba auditiva, por electrocauterização da sua extremidade nasofaríngea, e foi observada, nesses animais, a presença de otite média serosa, retração timpânica, atelectasia e colesteatoma<sup>74</sup>. Rüedi, em seu artigo clássico, induziu colesteatomas com uma mistura de talco e fibrina em cobaias, postulando que esses se formavam a partir da camada basal da epiderme da membrana timpânica, desta forma dando suporte à teoria da migração, que a seu ver explicaria todas as formas de colesteatoma<sup>7</sup>. No entanto, substâncias como o quinino e essas misturas de talco e fibrina têm valor limitado experimentalmente, pois produzem colesteatomas em relativamente poucos animais<sup>75</sup>.

O estudo de Wright e colaboradores foi pioneiro em mostrar a possibilidade de formação de inflamação, lesão tissular e colesteatoma na orelha média de chinchilas, na qual foi instilada suspensão de Cortisporin® otológico (medicamento comercializado nos EUA para tratamento de otite externa) contendo neomicina (5 mg/mL), polimixina B (10.000 unidades/mL), hidrocortisona (10 mg/mL) e um veículo contendo álcool e propilenoglicol<sup>76</sup>. O propilenoglicol é o 1,2 propanodiol, um álcool de cadeia curta que contém dois grupos hidroxila, usado como solvente em muitas preparações tópicas otológicas<sup>77</sup>.

Vassalli e colaboradores realizaram estudo introduzindo na bula timpânica de chinchilas uma suspensão de Cortisporin® otológico (PG a 10,5%) e, em outro grupo, este

mesmo medicamento na apresentação oftalmológica (PG a 2%), obtendo colesteatoma, respectivamente, em 57% dos animais do primeiro grupo e nenhum do segundo<sup>78</sup>. Desde então, o propilenoglicol foi considerado efetivo na indução de colesteatoma, e é o principal agente utilizado em cirurgia experimental atualmente<sup>21, 76, 79</sup>. A inflamação crônica induzida pela administração do PG resulta em alterações morfológicas da membrana timpânica, incluindo hiperplasia da epiderme, espessamento do tecido conjuntivo da lâmina própria e ruptura da camada fibrosa<sup>21</sup>.

A constatação realizada é que a hiperplasia epidérmica migraria através da membrana timpânica intacta, porém estruturalmente alterada, para chegar à orelha média, onde proliferaria e se queratinizaria, formando o colesteatoma<sup>76</sup>. Por esse mecanismo, foi proposto que as infecções crônicas da orelha média podem produzir colesteatoma através de uma membrana timpânica íntegra<sup>75</sup>.

A concentração do PG é muito importante na indução experimental do colesteatoma. Foi estabelecido que, se a concentração do PG for menor que 10%, sua baixa viscosidade irá fazer com que este saia da orelha média através da tuba faringo-timpânica, deixando as membranas timpânicas normais<sup>79</sup>. A concentração do PG indicada deve ser no mínimo de 50% quando este é usado com o propósito de induzir o colesteatoma<sup>78,79</sup>. Alterações precoces na produção de colesteatoma experimental foram demonstradas por vários autores<sup>77,78,80</sup>. Precocemente, dois dias após a aplicação do PG na orelha média de ratos, as camadas externa escamosa epitelial e a interna mucosa da membrana timpânica são completamente destruídas, e dentro de uma semana um epitélio hiperplásico cobre completamente a membrana timpânica<sup>80</sup>. Esses achados são compatíveis com os modelos animais iniciais de Rüedi e Fernandez<sup>7,81</sup>.

Hueb e colaboradores lograram produzir colesteatoma na bula timpânica de chinchilas através da colocação de uma membrana de gelatina quimicamente modificada entre o conduto

auditivo externo e a orelha média por uma perfuração timpânica que estimulou a migração epitelial em 53,5% dos animais<sup>82</sup>. Massuda e Oliveira produziram colesteatoma em 80% das orelhas médias de ratos com experimento semelhante, nos quais utilizaram uma biomembrana de látex embebida em PG posicionada entre o CAE e o promontório da orelha média<sup>68</sup>.

Alguns outros modelos, referidos a seguir, podem ser utilizados com o propósito de induzir a formação de colesteatoma.

Uma forma de desenvolver colesteatomas, e que chegou a ter 89,3% de sucesso na sua formação, é implantar um enxerto autólogo livre da pele do conduto auditivo externo na bula de cobaias<sup>83</sup>.

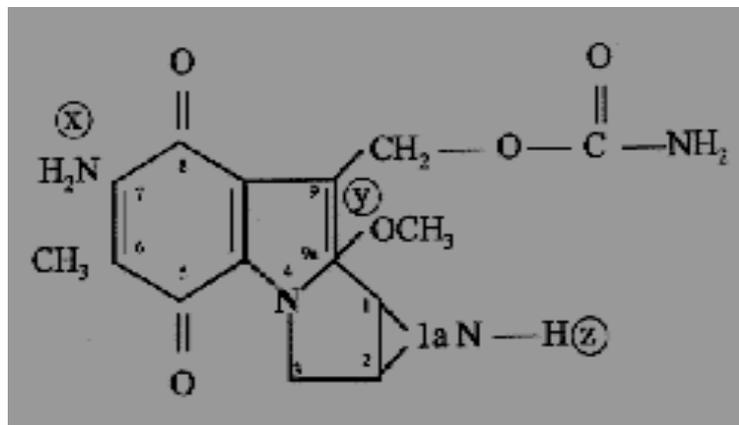
É possível, hoje, induzir colesteatomas *in vitro* por meio de modelos usando equivalentes de cultura de pele em três dimensões e nos quais podem ser encontrados elementos que apontam em direção à teoria migratória como explicação para o crescimento de epiderme a partir de uma falha nesta<sup>84</sup>.

Bretlau e colaboradores propuseram transplantar membranas colesteatomatosas humanas para a orelha média de camundongos, com o intuito de estudar os efeitos de reabsorção óssea e outros sinais de inflamação<sup>85</sup>.

### 3.3 Mitomicina C

A mitomicina C foi descrita por Wakaki e colaboradores, em 1958, a partir da bactéria *Streptomyces caespitosus*, como possuidora de potente efeito antitumoral sobre o carcinoma de Erlich em camundongos<sup>86</sup>. Apresenta-se como um cristal azul-violeta com peso molecular de 334 daltons, solúvel em água e em fluidos orgânicos, e sua molécula (Figura. 2) apresenta três agentes carcinostáticos conhecidos: um anel de aziridina, um grupo quinona e um grupo

octano<sup>87</sup>. É um agente antineoplásico que atua inibindo a síntese de DNA pelo seu mecanismo de ação: o DNA *cross-linking* (ligação cruzada do DNA) entre a adenina e a guanina<sup>88,89</sup>.



**Figura 2.** Molécula da mitomicina C (*Adaptado de Ribeiro et al<sup>87</sup>*).

Em altas concentrações, a síntese de ácido ribonucléico (RNA) e de proteínas também é suprimida<sup>90</sup>. Desde a década de 90, a MMC tem sido investigada como um agente para inibir a formação de cicatrizes<sup>22</sup>. Esse efeito seria mediado pela sua ação de bloqueio do DNA inibindo a proliferação fibroblástica, importante passo na cicatrização de feridas, e também inibindo a mitose e a síntese protéica, sendo ativa contra todas as células, não importando a fase do ciclo celular em que se encontrem<sup>22</sup>. Há relatos, a partir de estudos em terapia oncológica, de que a MMC não age apenas por esse mecanismo, mas pela inibição seletiva da expressão de genes induzíveis<sup>88</sup>. Foi demonstrado que a expressão do RNA mensageiro para algumas proteínas da matriz extracelular, como elastase, hialuronidase e procolágeno estava diminuída no dorso de ratos que foram expostos à ação da MMC topicamente<sup>88</sup>.

A MMC tem um amplo espectro de ação na inibição de proliferação celular em muitas linhagens celulares e observa-se que quanto maior a concentração e o tempo de exposição maior o seu efeito biológico<sup>88</sup>. A MMC mostrou ter um efeito antiproliferativo em cultura de fibroblastos humanos quando usada numa concentração de 0,04 mg/mL<sup>24</sup>. Na concentração de 1 mg/mL, a MMC foi citocida para fibroblastos em cultura e reduziu o número de células para

níveis abaixo da densidade celular inicial<sup>23</sup>. O efeito tópico de uma aplicação de cinco minutos tem efeito sobre a proliferação e a morfologia celular por até 36 horas<sup>24</sup>. Em cultura de fibroblastos de coelhos, a MMC é aproximadamente cem vezes mais potente do que o 5-fluoracil na inibição de mitose<sup>89</sup>. Em cultura de mucosa nasal humana, a exposição à MMC inibiu a proliferação de fibroblastos e aumentou sua apoptose<sup>24</sup>. Em outro estudo, a MMC retardou a cicatrização de feridas cirúrgicas até a quarta semana após a aplicação tópica no dorso de ratos, mas o grau de fibrose ao final de doze semanas foi semelhante ao do grupo de animais nos quais não foi usada<sup>87</sup>. Embora a MMC seja altamente tóxica nas doses usadas para tratar neoplasias malignas, a aplicação local de uma pequena quantidade não foi associada à toxicidade sistêmica<sup>23</sup>.

A MMC está sendo utilizada experimentalmente em vários ensaios em diversas áreas da Medicina, tanto por via tópica como sistêmica. Em Oftalmologia, a sua utilização data de 1983, para impedir o fechamento das trabeculotomias em pacientes com glaucoma, sendo também usada nas dacriocistorinostomias e na excisão de pterígio<sup>22,91-93</sup>. A MMC tem sido usada para prevenir a recorrência do carcinoma *in situ* conjuntival e da córnea, sendo utilizada topicamente quatro vezes ao dia em dosagens de 0,2 a 0,4 mg/mL com bons resultados, com toxicidade ocular mínima<sup>25,26</sup>. Esse efeito sobre neoplasias de linhagem epitelial permite supor que seria possível sua ação sobre o colesteatoma.

Em Otorrinolaringologia, a MMC já foi utilizada impedindo a estenose glótica em cães, após a indução da mesma com o laser de CO<sub>2</sub><sup>94</sup>; reduzindo a formação das sinéquias pós-operatórias em cirurgia endoscópica nasossinusal<sup>24</sup>; e aumentando o índice de atresias coanais patentes após sua correção cirúrgica<sup>95</sup>. No campo da Otologia, pode, eventualmente, mudar o tratamento da otite média serosa, do atual uso de tubos de ventilação para miringotomia e uso de MMC, como tem sido demonstrado pelo aumento do tempo de perfurações timpânicas patentes provocadas em diversos animais de experimentação e em

humanos<sup>89,90,96-101</sup>. Recentemente, foi utilizada no tratamento da doença de Ménière para manter patente a comunicação entre o saco endolinfático e a cavidade mastóidea<sup>102</sup>.

A MMC também pode ser usada em carcinomas de mama, de cabeça e pescoço, de pulmão, de estômago, de pâncreas e colo-retais por via intravenosa, ou em carcinomas de bexiga por via tópica<sup>103</sup>. É possível a sua associação com radioterapia para tratamento de tumores na área de cirurgia de cabeça e pescoço, nos quais tem apresentado bons resultados<sup>104</sup>. Eventualmente, pode ser usada no tratamento de carcinomatose peritoneal e de tumores malignos digestivos, como agente para induzir quimio-hipertermia, com resultados promissores<sup>105</sup>. Em caráter experimental, a MMC foi usada, em conjunto com o Anticorpo Neutralizante de Fator de Crescimento Endotelial Vascular, na terapia de antiangiogênese em metástases hepáticas produzidas a partir de xenotransplante do câncer gástrico humano em ratos, com bons resultados<sup>106</sup>.

Existem, no entanto, alguns efeitos colaterais relacionados à toxicidade da MMC. Ela pode causar aplasia medular, sua complicação mais grave, e necrose do tecido celular subcutâneo no local da sua injeção<sup>87</sup>. Nas cirurgias oftalmológicas, pode trazer algumas complicações, tais como: eritema conjuntival, quemose e ceratopatia epitelial, além de hipotonia ocular<sup>25,26</sup>.

Em estudo que avaliou a ototoxicidade da MMC usada topicamente na orelha média de ratos, observou-se que em concentrações baixas (< 0,25 mg/mL) foi segura, mas em níveis mais elevados causou elevação de limiares auditivos aferidos pela audiometria de tronco cerebral<sup>100</sup>. Há relato do uso tópico da MMC alterando negativamente o padrão vibratório de pregas vocais em cães, devido a dano causado aos componentes do tecido conjuntivo da lâmina própria dessas<sup>107</sup>. A MMC utilizada topicamente na orelha média de cobaias, em diferentes intervalos de tempo, não causou efeitos tóxicos na orelha interna a partir da observação com as microscopias de luz e eletrônica, porém quando aplicada por períodos

mais prolongados provocou perda da integridade estrutural do gânglio espiral, perda das características próprias das células ganglionares, presença de núcleos pequenos e picnóticos com diminuição de citoplasma, aumento das cisternas do retículo endoplasmático e alterações mitocondriais<sup>108</sup>.

Foi identificado um padrão de dose-resposta quando se aplicou a MMC para evitar o fechamento das miringotomias produzidas com laser em cobaias, na concentração de 0,05 a 0,4 mg/mL, porém após 2 mg/mL observou-se otorréia, sugerindo toxicidade na mucosa da orelha média<sup>101</sup>. Apesar de existirem relatos de que a MMC possa, através da inibição da proliferação de fibroblastos, ser capaz de minimizar a formação de tecido cicatricial, não houve sucesso ao se tentar evitá-la no conduto auditivo externo em humanos submetidos à cirurgia otológica<sup>99</sup>.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 População e local do estudo

Nesta investigação, foram utilizados 32 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) machos, sadios, da linhagem Wistar, pesando de 220 a 480 g (média de 313 g), com cerca de três meses de idade, adquiridos no Biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), dos quais seis foram excluídos por apresentarem alterações otoscópicas na membrana timpânica.

Do grupo de 32 ratos, dois animais com otomicroscopia normal foram selecionados e mortos para avaliação de parâmetros de normalidade da espessura da mucosa da orelha média e da membrana timpânica. A parte prática com os animais foi realizada no Núcleo de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da UFPE. A preparação das lâminas e a análise histopatológica foram feitas no Laboratório do Mestrado em Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da UFPE, e as microfotografias das lâminas, no Departamento de Anatomia (Setor de Morfologia Aplicada) do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, no período de dezembro de 2004 a março de 2005.

#### 4.2 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental controlado pareado.

#### 4.3 Seleção

Foram utilizados 24 ratos, distribuídos em dois grupos:

**Grupo controle:** consistiu nas 24 orelhas médias direitas desses animais.

**Grupo experimental:** consistiu nas 24 orelhas médias esquerdas desses animais.

#### 4.4 Procedimentos

##### 4.4.1 Ambiente

Os animais foram mantidos em biotério, com refrigeração constante, em gaiolas individuais, com piso de serragem e iluminação programada a cada 12 horas. Receberam, de alimentação, ração industrializada do tipo Labina<sup>®</sup> *ad libitum*.

##### 4.4.2 Anestesia

Os procedimentos que causaram sofrimento para os animais (a injeção intratimpânica das soluções e sua morte para coleta das bulas timpânicas) foram realizados sob anestesia geral, com hidrato de cloral a 10%, por via intraperitoneal, na dosagem de 0,4 mL por 100 g de peso corporal.

##### 4.4.3 Indução do processo inflamatório

Todos os ratos foram submetidos à otomicroscopia com microscópio cirúrgico (marca D.F. Vasconcelos<sup>®</sup> de coluna, modelo MC-M31), com luz fria, equipado com cinco prismas de magnificação de 6, 10, 16, 25 e 40 aumentos, lente ocular com aumento de 12,5x, lente objetiva com 250 mm de distância focal e examinados com aumento de 10x após serem colocados em bancada cirúrgica.

Foram incluídos no estudo 24 animais que apresentaram otomicroscopia com aspecto normal em ambas as orelhas. Na orelha média direita de cada animal foi injetada uma solução contendo 0,2 mL de propilenoglicol a 50%, 0,1 mL de sulfato de gentamicina (40 mg/mL) e

0,1 mL de solução fisiológica a 0,9%, com seringa Carpule e agulha gengival longa – 30G (tipo odontológica), por meio de uma injeção intratimpânica, sendo definido assim o grupo controle.

Na orelha média esquerda desses mesmos animais, a solução utilizada conteve 0,2 mL de propilenoglicol a 50%, 0,1 mL de sulfato de gentamicina (40 mg/mL) e 0,1 mL de mitomicina C (0,5 mg/mL), tendo sido injetada de maneira idêntica e formando, assim, o grupo experimental. O propilenoglicol, a gentamicina e o hidrato de cloral foram obtidos em farmácia de manipulação, e a mitomicina C (Mitocin<sup>®</sup>) e o soro fisiológico a 0,9% em preparações industrializadas.

O PG foi usado para induzir a formação de processo inflamatório e do colesteatoma, e a gentamicina com o objetivo de diminuir a possibilidade de infecção na orelha média dos animais. A mitomicina C foi utilizada com o escopo de inibir o desenvolvimento do colesteatoma. As injeções foram feitas cuidadosamente na parte tensa das membranas timpânicas das orelhas dos ratos, com auxílio de um microscópio cirúrgico com aumento de 10x. As soluções foram administradas num total de três vezes, em intervalos de sete dias. Após dez semanas da injeção final, sobreviveram 11 ratos, que foram submetidos à nova otomicroscopia seguida de microfotografia, realizada com câmera fotográfica digital, marca Sony<sup>®</sup>, modelo DS150, com resolução de 4,1 *megapixels*, acoplada à binocular do microscópio, seguida da anotação do seu aspecto em cada orelha.

#### **4.5 Coleta das bulas timpânicas**

Os animais foram mortos com dose letal de hidrato de cloral a 10% intraperitoneal e, em seguida, decapitados para retirada dos ossos temporais. Estes foram separados das outras estruturas cranianas e de tecidos moles, procurando-se manter apenas o osso e o conduto auditivo externo.

#### **4.6 Preparo histológico**

Nos ossos temporais foi realizada uma pequena abertura para prefixação com a solução de formol tamponado a 10%. Após 24 horas, os ossos temporais foram submetidos a processo de descalcificação por imersão em solução de ácido nítrico a 10%, por duas horas, em estufa a 58°C, sendo em seguida retirados e lavados em água por duas horas. No processo de pós-fixação, as bulas foram colocadas em estufa por 40 minutos em álcool, e 20 minutos em álcool-xilol e, posteriormente, colocadas em xilol fora da estufa, para então, desidratadas, serem emblocadas em parafina por 50 minutos.

Em seguida, as peças foram levadas para corte de 4 µm de espessura em micrótomo, em intervalos de cinco cortes com 10 µm de espessura, em plano transversal ao da membrana timpânica. As lâminas foram em seguida processadas e coradas com hematoxilina-eosina (HE), pela técnica de rotina e exame histopatológico.

##### **4.6.1 Análise histológica**

Todas as lâminas processadas foram submetidas à análise qualitativa por um patologista experimentado. Na análise, foram observadas a mucosa e a membrana timpânica das bulas, avaliando-se o tipo e a intensidade da reação inflamatória, a perfuração da membrana timpânica, presença ou ausência do exsudato, da fibrose e do colesteatoma. Em seguida, as lâminas foram posicionadas em um microscópio Olympus® BX50, com objetiva de 20x, seguida da captura das imagens realizada através do software ATI TV player 6.3, por meio de uma videocâmera Samsung® acoplada (Modelo SHC-410NAD). Foi obtido um total de 510 microfotografias.

A análise morfométrica foi realizada por meio do software de computação gráfica Scion Image for Windows® (Beta 4.0.2), após serem escolhidas 152 microfotografias. Em cada imagem foram realizadas três mensurações, em locais diferentes, da espessura da mucosa da bula e da membrana timpânica. Para efeito de utilização como parâmetros quantitativos foram calculadas as médias respectivas, em cada animal, das referidas espessuras. Com o intuito de avaliar o padrão de normalidade das espessuras da mucosa da bula e da membrana timpânica foram mortos dois ratos com otomicroscopia de aspecto normal e que não haviam sido submetidos a nenhuma manipulação cirúrgica, e se procedeu à mesma seqüência de etapas para obtenção de lâminas e microfotografias.

As médias da espessura da mucosa das bulas timpânicas e da membrana timpânica dos ratos nos quais não se realizaram experimentos foram, respectivamente, de 10,85  $\mu\text{m}$  e de 12,07  $\mu\text{m}$ . A partir da análise de sua espessura, a mucosa das bulas timpânicas dos grupos controle e experimental foi classificada arbitrariamente como normal ( $= 15 \mu\text{m}$ ), leve ( $> 15$  e  $= 50 \mu\text{m}$ ), moderada ( $> 50$  e  $= 100 \mu\text{m}$ ) ou intensa ( $> 100 \mu\text{m}$ ), utilizando-se para isso a amplitude de sua variação, observada do processo inflamatório obtido nos animais. Da mesma forma, foram classificadas as espessuras das membranas timpânicas em normal ( $= 15 \mu\text{m}$ ), leve ( $> 15 = 20 \mu\text{m}$ ) e moderada ( $> 20 \mu\text{m}$ ).

Foram comparados os achados das orelhas direita e esquerda, com a intenção de verificar o grau de influência da mitomicina C no desenvolvimento do processo inflamatório e na formação do colesteatoma nos ratos.

#### 4.7 Análise estatística

Os resultados foram resumidos em médias, desvio-padrão, medianas e percentagens. A análise estatística foi feita comparando os dois grupos de orelhas: grupo controle (no qual foi utilizado PG, gentamicina e solução fisiológica) e grupo experimental (recebendo PG, gentamicina e mitomicina C). O teste “t” de Student para amostras pareadas, o teste de homogeneidade marginal de Stuart-Maxwell e o teste exato de McNemar foram utilizados para analisar as diferenças entre os grupos controle e experimental através do programa de análise estatística Stata 9.2<sup>®</sup>. O nível de significância estatística utilizado para todos os testes foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4.8 Considerações éticas

Esta 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 nº 9.605 – art. 32, e Decreto nº 3.179 – art. 17, de 21/09/1999, que tratam da questão do uso de animais para fins científicos. Além disso, teve aprovação integral do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, inclusive concordando com o fato de que a morte dos animais utilizados neste estudo justifica-se por não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico (Anexo 1).

## **RESULTADOS**

Os resultados apresentados a seguir foram classificados em qualitativos e quantitativos. Na avaliação qualitativa, estão descritos os achados histopatológicos nos grupos controle e experimental, enquanto que na quantitativa, estão os resultados que puderam sofrer mensuração e conseqüente análise estatística. Podem ser observadas fotomicrografias (Figuras 3 e 4) dos ratos que não sofreram manipulação cirúrgica e que serviram como parâmetro de normalidade da mucosa da bula e da membrana timpânica, bem como dos animais dos grupos controle (Figuras 5, 8, 10, 12, 14 e 15) e experimental (Figuras 6, 7, 9, 11, 13, 16, 17, 18 e 19).

## **5.1 Resultados qualitativos**

Em relação à análise histológica realizada nos grupos controle e experimental, estão descritas a seguir as suas características:

### **5.1.1 Grupo controle**

Os achados microscópicos no grupo controle foram de processo inflamatório da mucosa da bula timpânica, com características de agudo e de crônico, porém com predomínio de intensidade entre o que se considerou normal e leve em oito animais. O processo inflamatório agudo se caracterizou por grande quantidade de neutrófilos, além de, em algumas lâminas, verificar-se a presença de histiócitos xantomatosos, que são células responsáveis pela atividade fagocitária. Contudo, o predomínio nos animais deste grupo foi de infiltrado mononuclear com linfócitos e plasmócitos.

O epitélio observado nos animais foi colunar ciliado. O colesteatoma, que neste estudo se define como a presença do epitélio escamoso estratificado queratinizado, esteve presente

em sete animais. Havia fibrose na lâmina própria da mucosa e também foi observada neoformação e congestão vascular em oito animais. Nos dois grupos estudados foram observadas, em quatro casos, erosões ósseas e a presença de calcificações distróficas na parede das bulas. Não foram detectadas fístulas ou erosões cocleares. O exsudato inflamatório esteve ausente em oito animais deste grupo, porém, quando se fez presente, foi caracteristicamente pio-hemorrágico, apresentando-se, também, em um dos animais, com células de linhagem mononuclear. A membrana timpânica dos animais deste grupo, ao final do experimento, apresentou as camadas externa epitelial, lâmina própria e interna mucosa bem delimitadas, e observou-se apenas uma perfuração.

#### **5.1.2 Grupo experimental**

No grupo experimental, o estudo da mucosa da bula timpânica revelou, em sete animais, intenso processo inflamatório, apresentando características de agudo e de crônico. Também estiveram presentes os histiócitos xantomatosos. A fibrose acentuada na lâmina própria da mucosa da bula timpânica e a intensa neoformação vascular estiveram presentes em nove animais. Ademais, o colesteatoma esteve presente em nove casos.

Observou-se a presença de exsudato em sete dos animais estudados, que foi caracteristicamente pio-hemorrágico e mais intenso do que no grupo controle. A membrana timpânica da maioria dos animais deste grupo apresentou as camadas externa epitelial, lâmina própria e interna mucosa bem delimitadas, porém se observaram perfurações em cinco delas. No entanto, em três animais as membranas timpânicas apresentaram processo inflamatório com espessamento de leve a moderado.

## 5.2 Resultados quantitativos

Os Gráficos 1 a 9 e as Tabelas 1 a 9 apresentados a seguir representam os dados relativos à análise estatística dos 11 animais que foram submetidos ao experimento dos grupos controle e experimental. É importante ressaltar que, dos 24 animais do grupo original, 13 foram perdidos, devido à morte dos mesmos durante o período de 10 semanas que antecedeu a coleta das bulas timpânicas.

Houve uma variação no número de pares de animais nos quais foram analisados os diversos aspectos estudados no experimento. Isso se deve ao fato de, em várias das bulas timpânicas, não ter sido possível observar a mucosa da bula e as membranas timpânicas com precisão, devido aos artefatos ocorridos na manipulação histológica das mesmas e, portanto, a mensuração, apesar de realizada, não seria confiável. Como consequência, esses resultados foram eliminados da análise estatística, para não ser introduzido um viés que pudesse influenciar as conclusões deste trabalho.

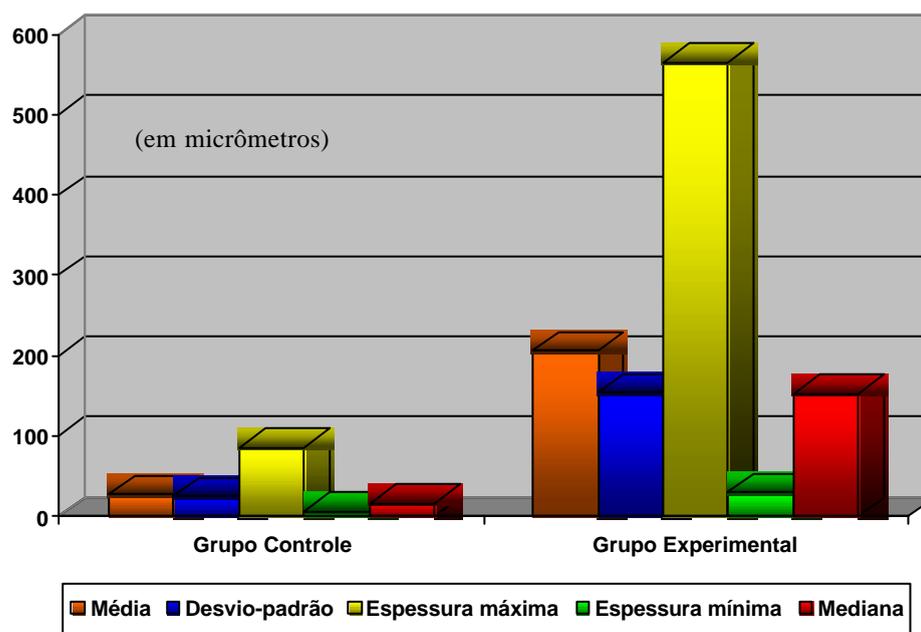
A presença do colesteatoma, do exsudato e da fibrose pôde ser observada nos 11 pares de orelhas dos ratos (Anexo 2). Contudo, em relação à observação do espessamento da mucosa, foi possível realizar uma observação acurada em nove pares de orelhas, e em relação à membrana timpânica, apenas em seis pares (Anexo 3).

**Tabela 1.** Principais parâmetros avaliados da espessura da mucosa das bulas timpânicas nos grupos controle e experimental.

| Espessura da mucosa da bula timpânica<br>(em micrômetros) |   |                |               |              |              |         |
|---|---|----------------|---------------|--------------|--------------|---------|
|   | n | Média          | Desvio-padrão | Valor mínimo | Valor máximo | Mediana |
| Grupo Experimental  | 9 | 205,60         | 153,30        | 29,50        | 564,90       | 152,30  |
| Grupo Controle  | 9 | 27,24          | 24,84         | 6,46         | 85,41        | 16,34   |
| <b>Diferença das médias</b>                               |   | <b>178,33*</b> |               |              |              |         |

Teste "t" de Student para amostras pareadas:  $p = 0,004$  (significância de 5%);

\* Intervalo de 95% de confiança para a diferença das médias: 76,83 a 279,82

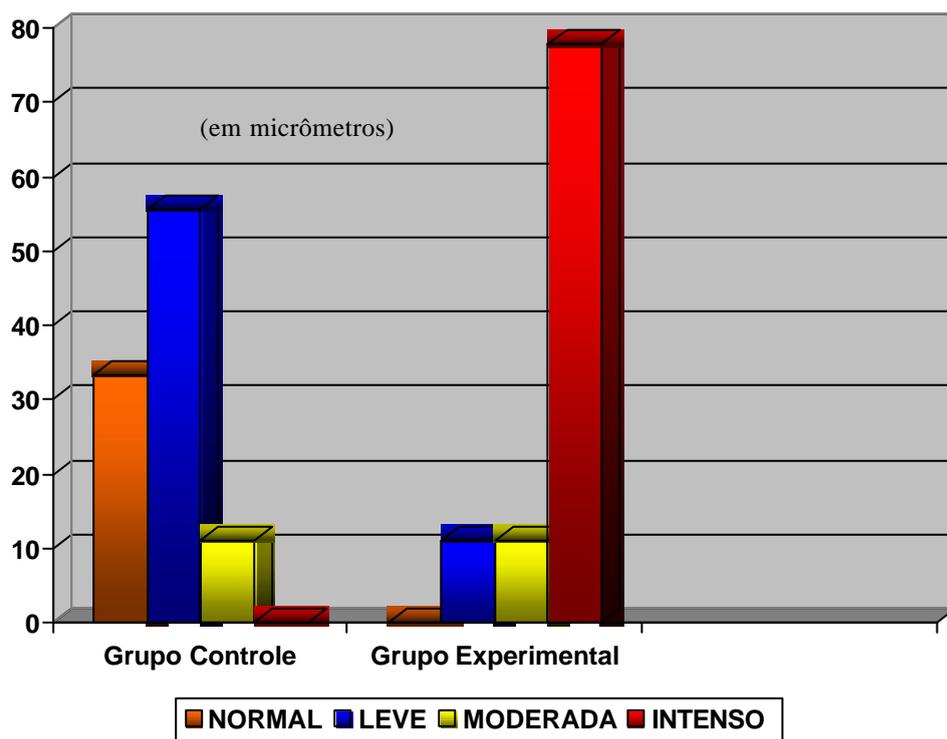


**Gráfico 1.** Principais parâmetros avaliados da espessura da mucosa das bulas timpânicas nos grupos controle e experimental.

**Tabela 2.** Distribuição da espessura da mucosa das bulas timpânicas nos grupos controle e experimental.

| Espessura da mucosa da bula timpânica<br>(em micrômetros) |                |                    |
|---|----------------|--------------------|
|   | Grupo Controle | Grupo Experimental |
|   | n              | n                  |
| Normal (= 15)   | 3              | 0                  |
| Leve (> 15 e = 50)  | 5              | 1                  |
| Moderado (> 50 e = 100)                                   | 1              | 1                  |
| Intenso (> 100)   | 0              | 7                  |
| <b>Total</b>  | <b>9</b>       | <b>9</b>           |

Teste de homogeneidade marginal de Stuart?Maxwell:  $p = 0,038$  (significância de 5%)



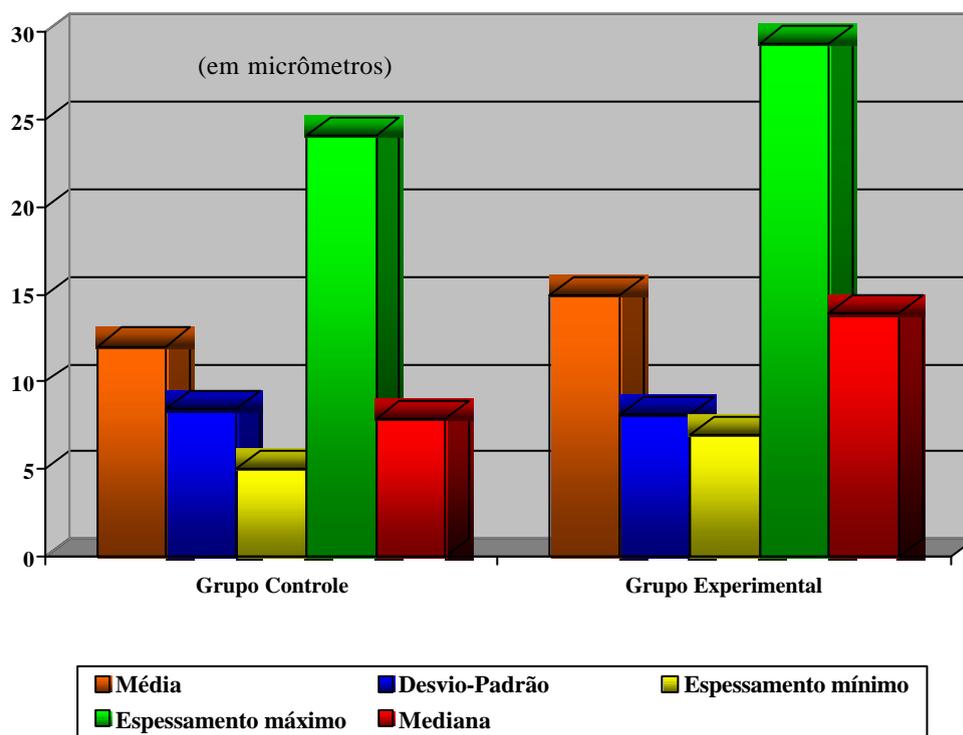
**Gráfico 2.** Distribuição do grau de espessura da mucosa das bulas timpânicas nos grupos controle e experimental.

**Tabela 3.** Principais parâmetros avaliados da espessura das membranas timpânicas nos grupos controle e experimental.

| Espessura da membrana timpânica |   |              |               |              |              |         |
|---------------------------------|---|--------------|---------------|--------------|--------------|---------|
| (em micrômetros)                |   |              |               |              |              |         |
|                                 | n | Média        | Desvio-padrão | Valor mínimo | Valor máximo | Mediana |
| Grupo Experimental              | 6 | 14,99        | 8,12          | 7,00         | 29,38        | 13,89   |
| Grupo Controle                  | 6 | 12,05        | 8,43          | 5,07         | 24,14        | 7,92    |
| <b>Diferença das médias</b>     |   | <b>2,95*</b> |               |              |              |         |

Teste "t" de Student para amostras pareadas:  $p = 0,371$  (não significante ao nível de 5%);

(\*Intervalo de 95% de confiança para a diferença das médias: -4,76 a 10,66)

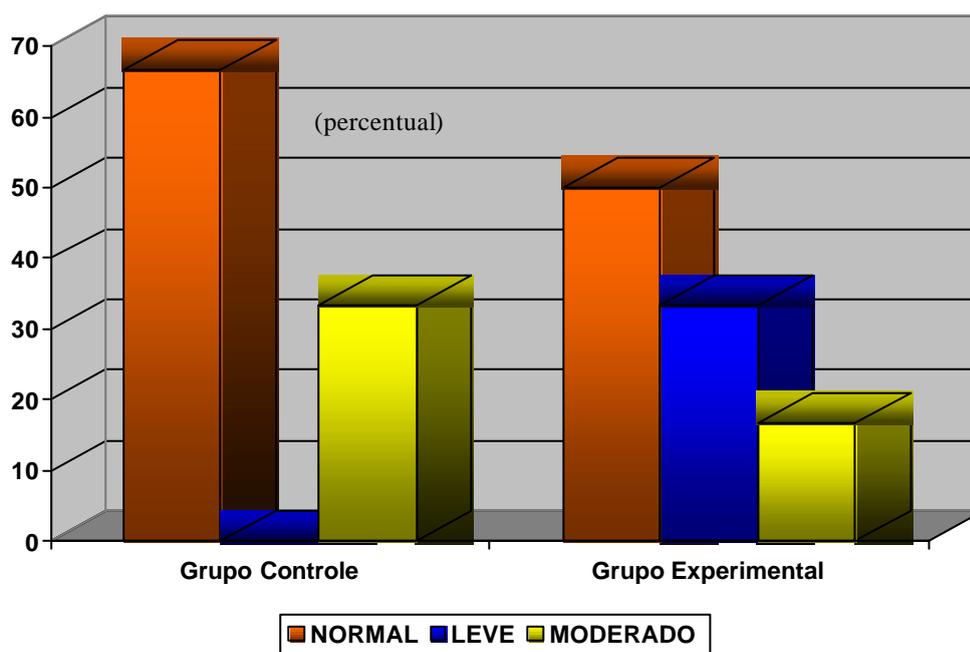


**Gráfico 3.** Principais parâmetros avaliados da espessura das membranas timpânicas nos grupos controle e experimental.

**Tabela 4.** Distribuição da espessura das membranas timpânicas nos grupos controle e experimental.

|                    | Espessura das membranas timpânicas<br>(em micrômetros) |                    |
|--------------------|--|--------------------|
|                    | Grupo Controle   | Grupo Experimental |
|                    | n  | n                  |
| Normal (= 15)      | 4  | 3                  |
| Leve (> 15 e = 20) | 0  | 2                  |
| Moderado (> 20)    | 2  | 1                  |
| <b>Total</b>       | <b>6</b>   | <b>6</b>           |

Teste de homogeneidade marginal de Stuart?Maxwell:  $p = 0,223$  (não significante ao nível de 5%)

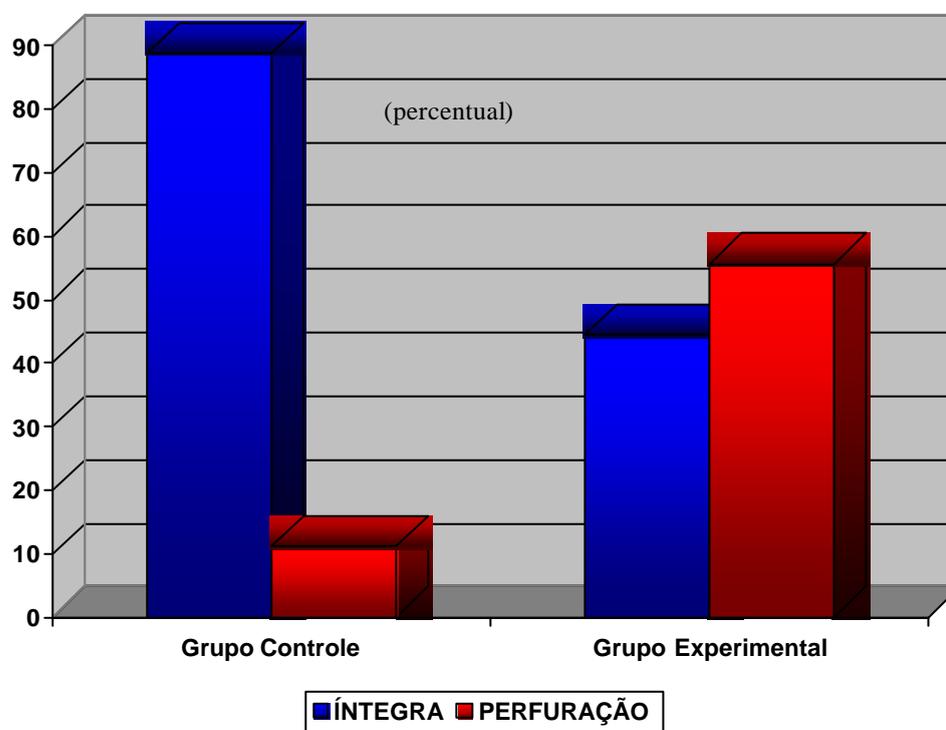


**Gráfico 4.** Distribuição da espessura da membrana timpânica nos grupos controle e experimental.

**Tabela 5.** Distribuição da integridade das membranas timpânicas analisada através da otomicroscopia nos grupos controle e experimental.

|                        | Integridade da membrana timpânica |                    |           |
|------------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------|
|                        | Grupo Controle                    | Grupo Experimental | Total     |
|                        | n                                 | n                  | n         |
| Íntegra                | 8                                 | 4                  | 12        |
| Presença de perfuração | 1                                 | 5                  | 6         |
| <b>Total</b>           | <b>9</b>                          | <b>9</b>           | <b>18</b> |

Teste exato de McNemar:  $p = 0,219$  (não significante ao nível de 5%)

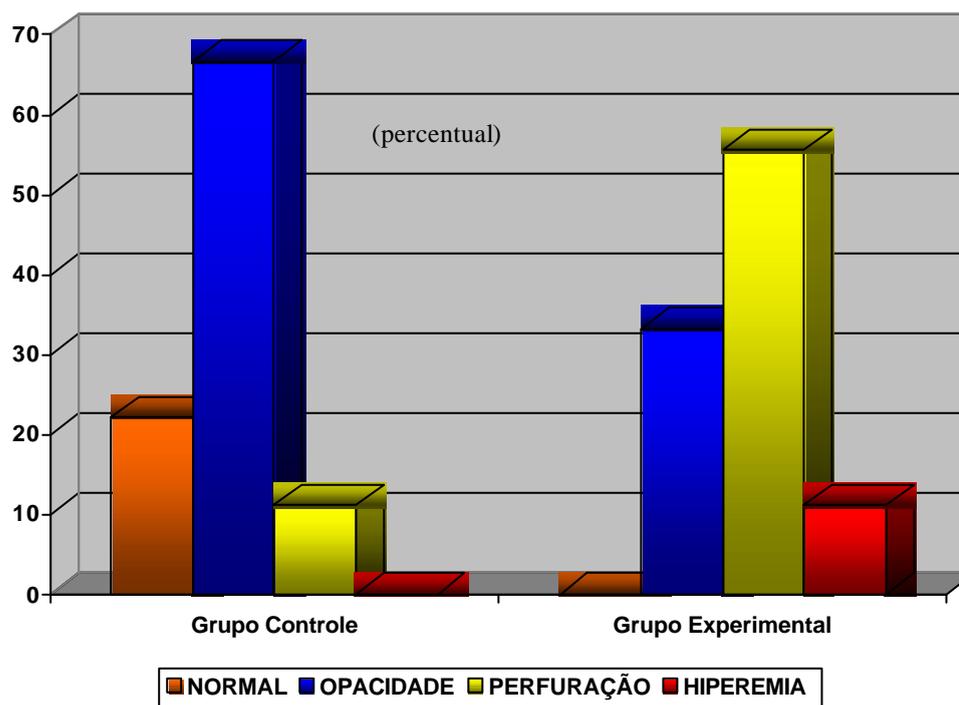


**Gráfico 5.** Distribuição da integridade das membranas timpânicas analisada através da otomicroscopia nos grupos controle e experimental.

**Tabela 6.** Distribuição das otomicroscopias nos grupos controle e experimental.

|              | Otomicroscopia |                    |           |
|--------------|----------------|--------------------|-----------|
|              | Grupo Controle | Grupo Experimental | Total     |
|              | n              | n                  | n         |
| Normal       | 2              | 0                  | 2         |
| Opacificação | 6              | 3                  | 9         |
| Perfuração   | 1              | 5                  | 6         |
| Hiperemia    | 0              | 1                  | 1         |
| <b>Total</b> | <b>9</b>       | <b>9</b>           | <b>18</b> |

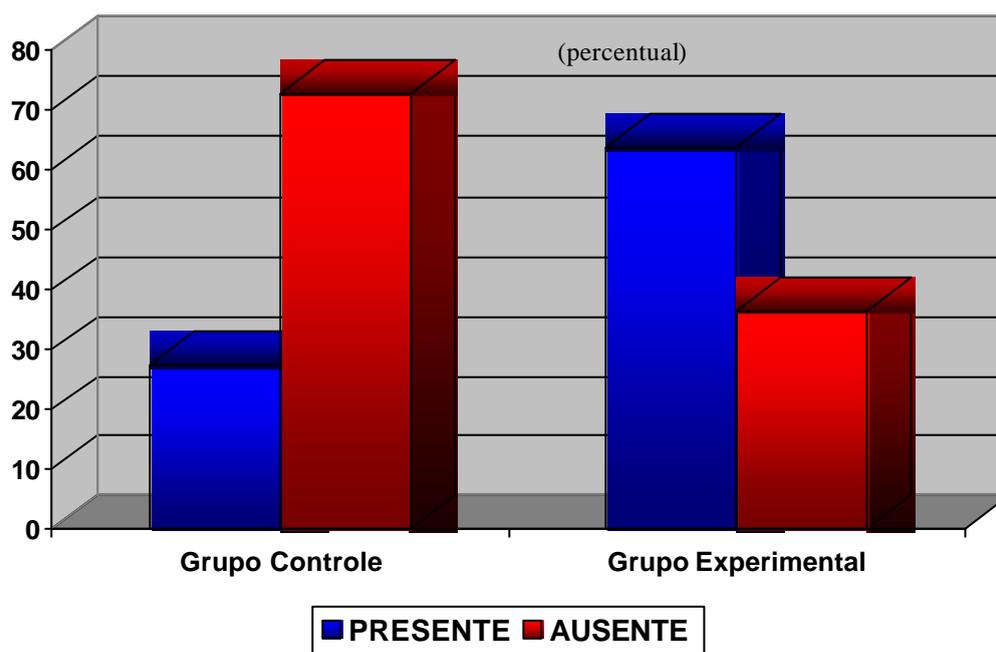
Teste de homogeneidade marginal de Stuart?Maxwell:  $p = 0,262$  (não significativa ao nível de 5%)

**Gráfico 6.** Distribuição das otomicroscopias nos grupos controle e experimental.

**Tabela 7.** Distribuição da presença de exsudato na bula timpânica nos grupos controle e experimental.

|              | Exsudato       |                    | Valor de p* |
|--------------|----------------|--------------------|-------------|
|              | Grupo Controle | Grupo Experimental |             |
|              | n              | n                  |             |
| Presente     | 3              | 7                  | 0,125       |
| Ausente      | 8              | 4                  |             |
| <b>Total</b> | <b>11</b>      | <b>11</b>          |             |

\*Teste exato de McNemar: p = 0,125 (não significante ao nível de 5%)

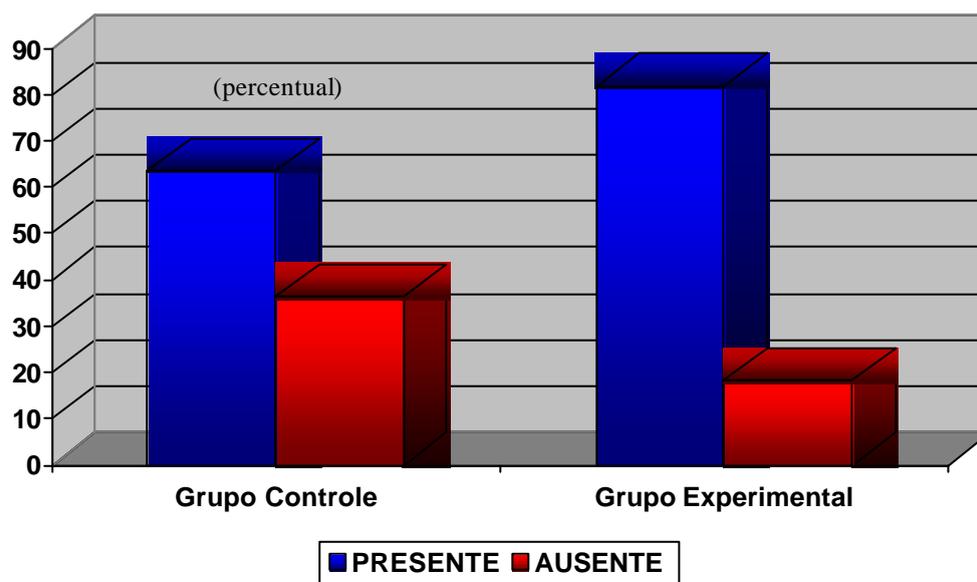


**Gráfico 7.** Distribuição da presença de exsudato na bula timpânica nos grupos controle e experimental.

**Tabela 8.** Distribuição da presença de colesteatoma na bula timpânica nos grupos controle e experimental.

|              | Colesteatoma   |                    | Valor de p* |
|--------------|----------------|--------------------|-------------|
|              | Grupo Controle | Grupo Experimental |             |
|              | n              | n                  |             |
| Presente     | 7              | 9                  | 0,687       |
| Ausente      | 4              | 2                  |             |
| <b>Total</b> | <b>11</b>      | <b>11</b>          |             |

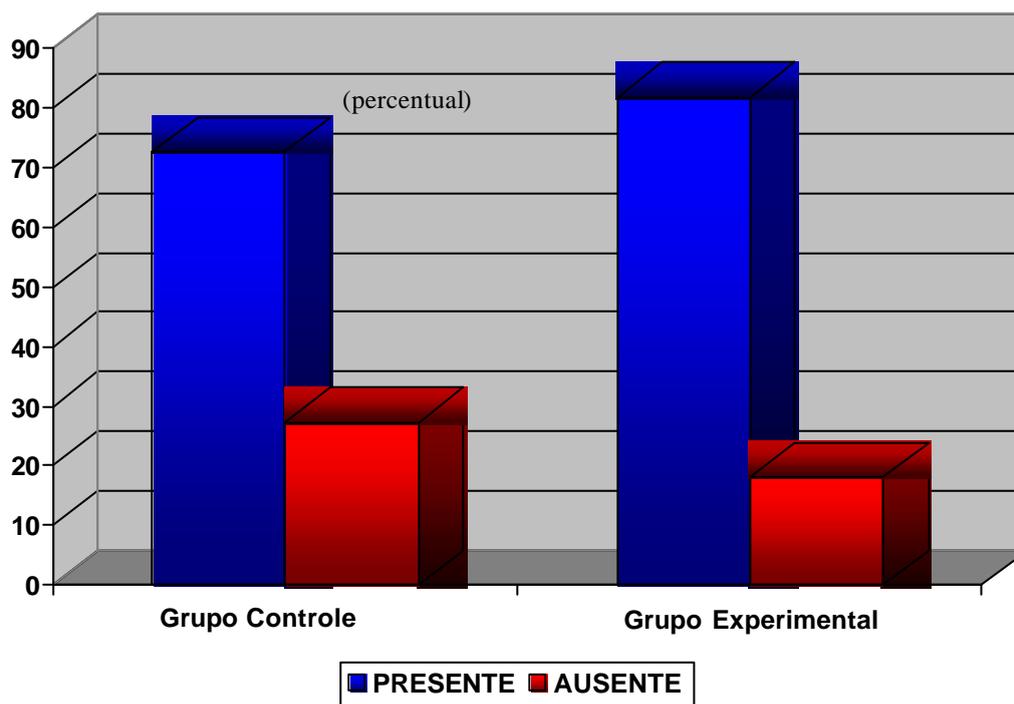
Teste exato de McNemar:  $p = 0,687$  (não significante ao nível de 5%)

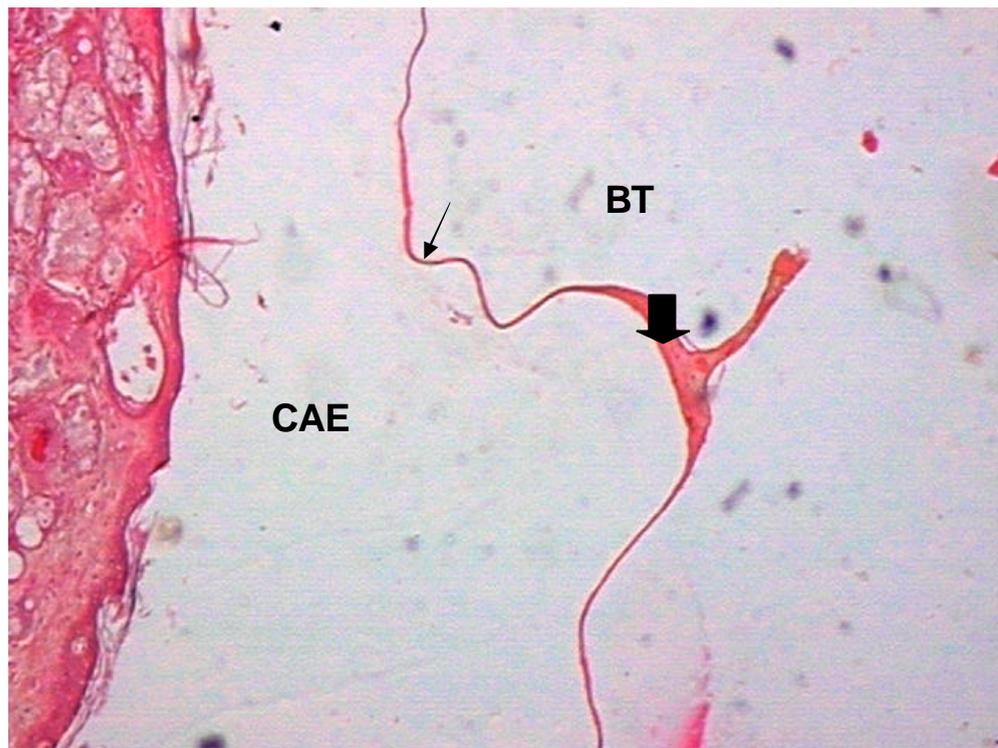
**Gráfico 8.** Distribuição da presença de colesteatoma na bula timpânica nos grupos controle e experimental.

**Tabela 9.** Distribuição da presença de fibrose na mucosa da bula timpânica nos grupos controle e experimental.

| Fibrose      |                |                    |                         |
|--------------|----------------|--------------------|-------------------------|
|              | Grupo Controle | Grupo Experimental | Valor de p <sup>*</sup> |
|              | n              | n                  |                         |
| Presente     | 8              | 9                  | 1,000                   |
| Ausente      | 3              | 2                  |                         |
| <b>Total</b> | <b>11</b>      | <b>11</b>          |                         |

\*Teste exato de McNemar: p = 1,00 (não significante ao nível de 5%)

**Gráfico 9.** Distribuição da presença de fibrose na mucosa da bula timpânica nos grupos controle e experimental.



**Figura 3.** Fotomicrografia da membrana timpânica de rato normal (BT = luz da bula timpânica; CAE = conduto auditivo externo; seta fina = membrana timpânica; e seta grossa = martelo). Hematoxilina-eosina (aumento 100x).



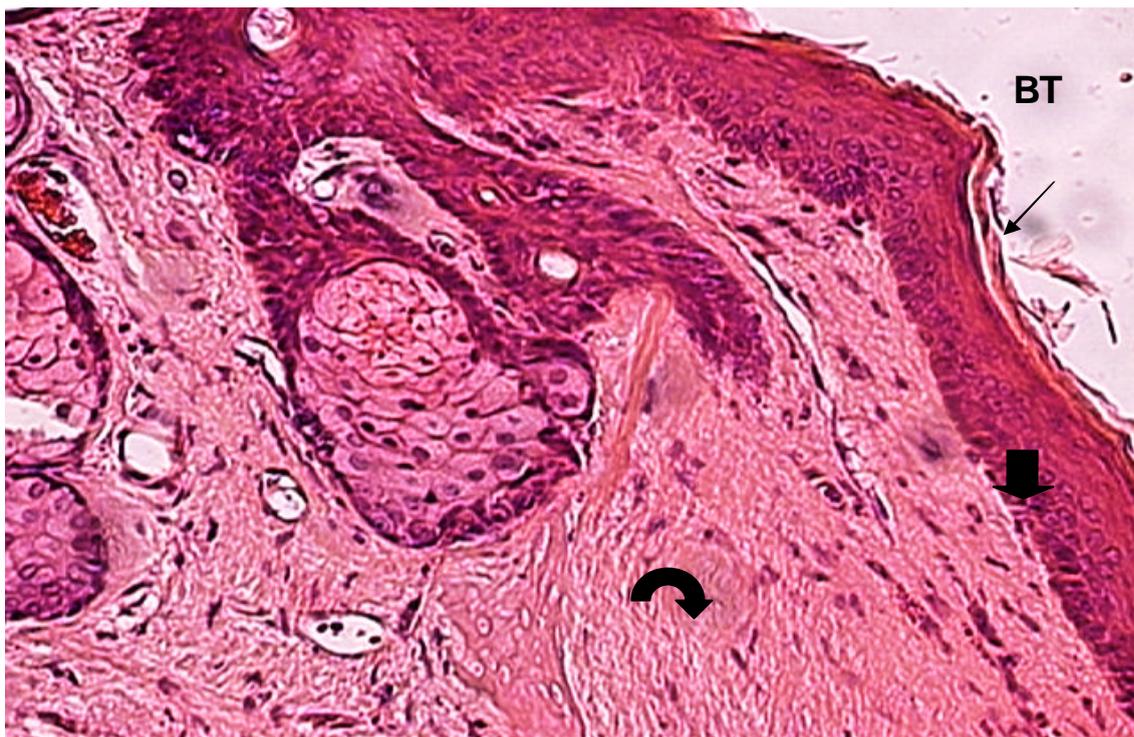
**Figura 4.** Fotomicrografia de mucosa da bula timpânica de rato normal (BT = luz da bula timpânica; seta fina = mucosa da bula timpânica; e seta grossa = parede óssea da bula timpânica). Hematoxilina-eosina (aumento 100x).



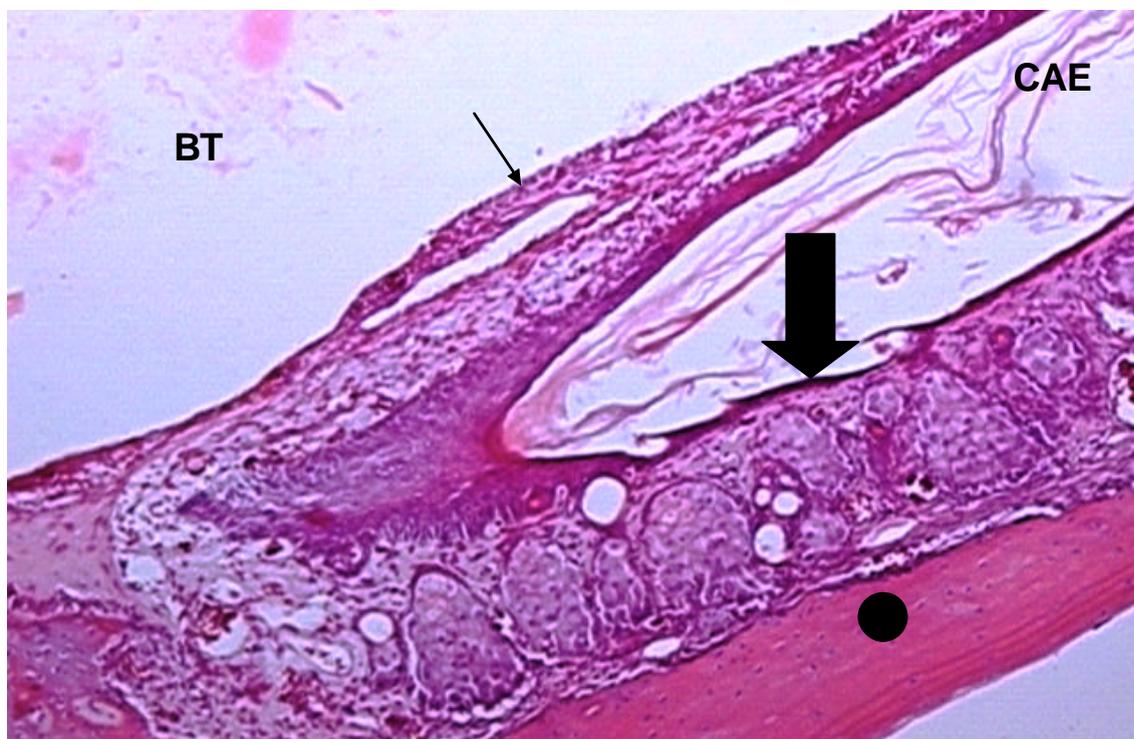
**Figura 5.** Fotomicrografia de mucosa da bula timpânica de rato do grupo controle (seta fina = epitélio colunar ciliado simples; seta grossa = lâmina própria infiltrada com células mononucleares; e BT = luz da bula timpânica). Hematoxilina-eosina (aumento 400x).



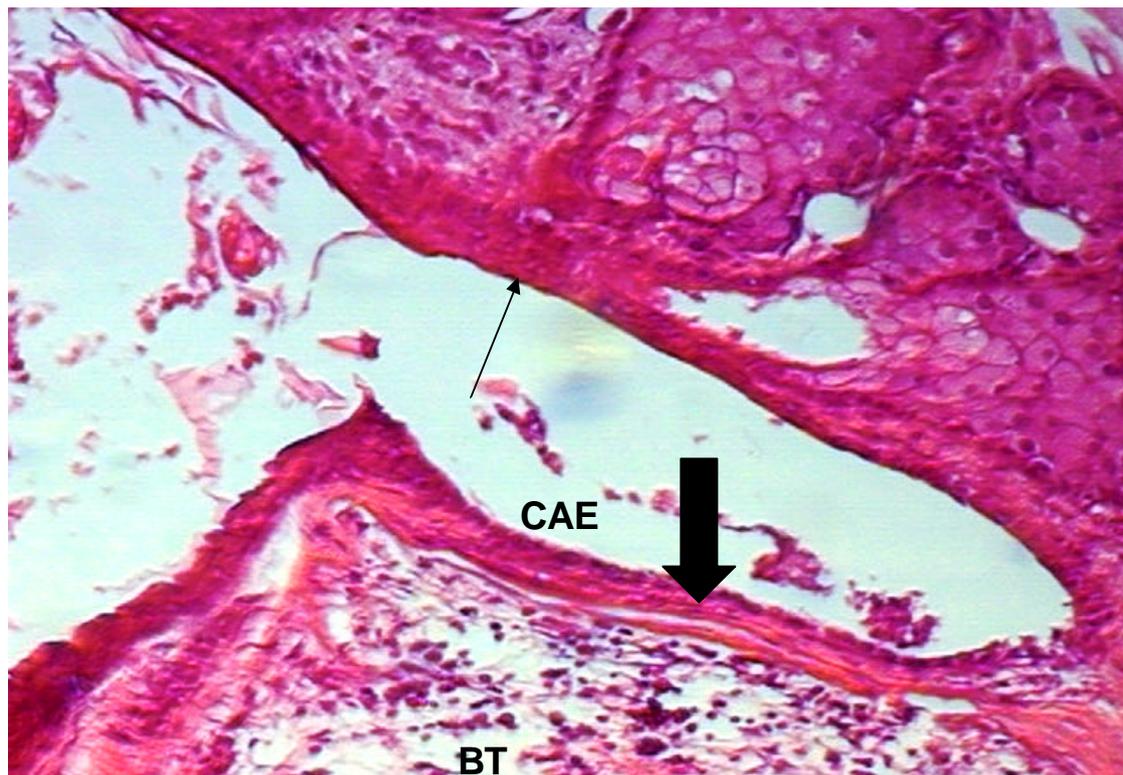
**Figura 6.** Fotomicrografia de mucosa da bula timpânica de rato do grupo experimental (BT = luz da bula timpânica; seta fina = queratina em descamação; seta grossa = epitélio pavimentoso estratificado queratinizado [colesteatoma]; seta curva = lâmina própria com espessamento intenso; e círculo = parede óssea da bula timpânica). Hematoxilina-eosina (aumento 100x).



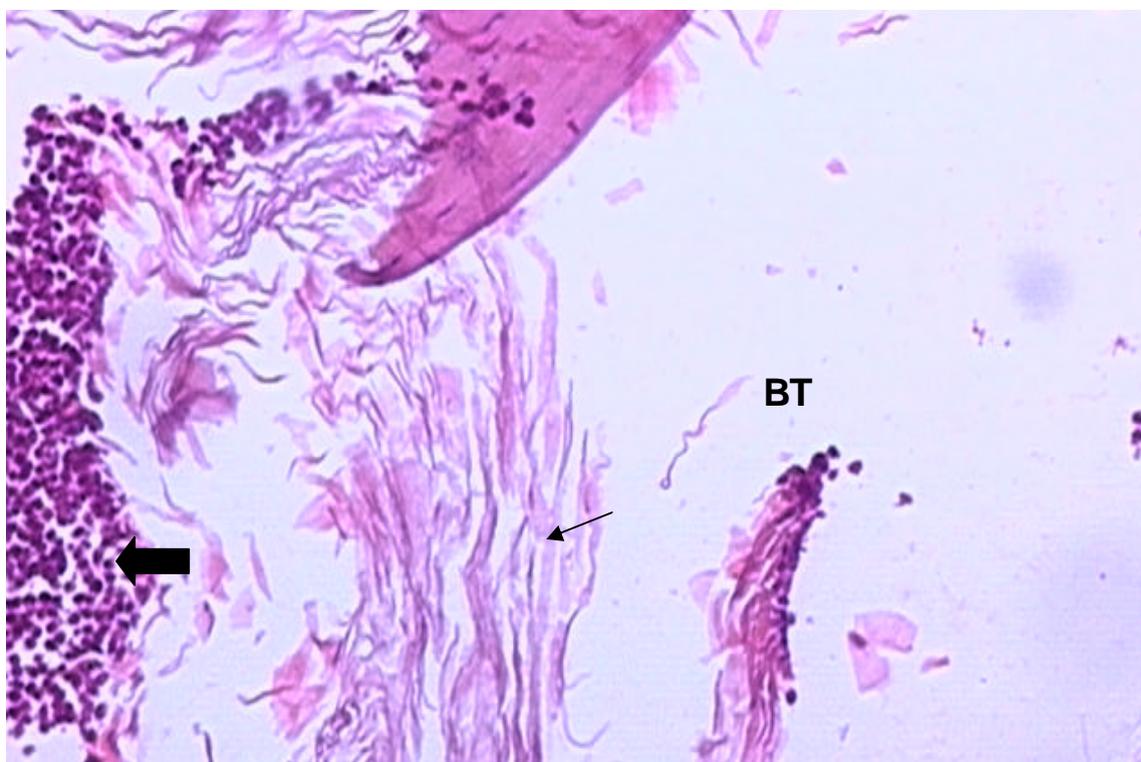
**Figura 7.** Fotomicrografia anterior em aumento 200x. Mucosa da bula timpânica de rato do grupo experimental (BT = luz da bula timpânica; seta fina = queratina em descamação; seta grossa = epitélio pavimentoso estratificado queratinizado; e seta curva = lâmina própria com espessamento e fibrose intensos). Hematoxilina-eosina.



**Figura 8.** Fotomicrografia da membrana timpânica de rato do grupo controle (BT = luz da bula timpânica; CAE = conduto auditivo externo; círculo = parede óssea da bula timpânica; seta fina = membrana timpânica espessada; e seta grossa = epitélio do conduto auditivo externo com glândulas sebáceas e queratina em descamação). Hematoxilina-eosina (aumento 200x).



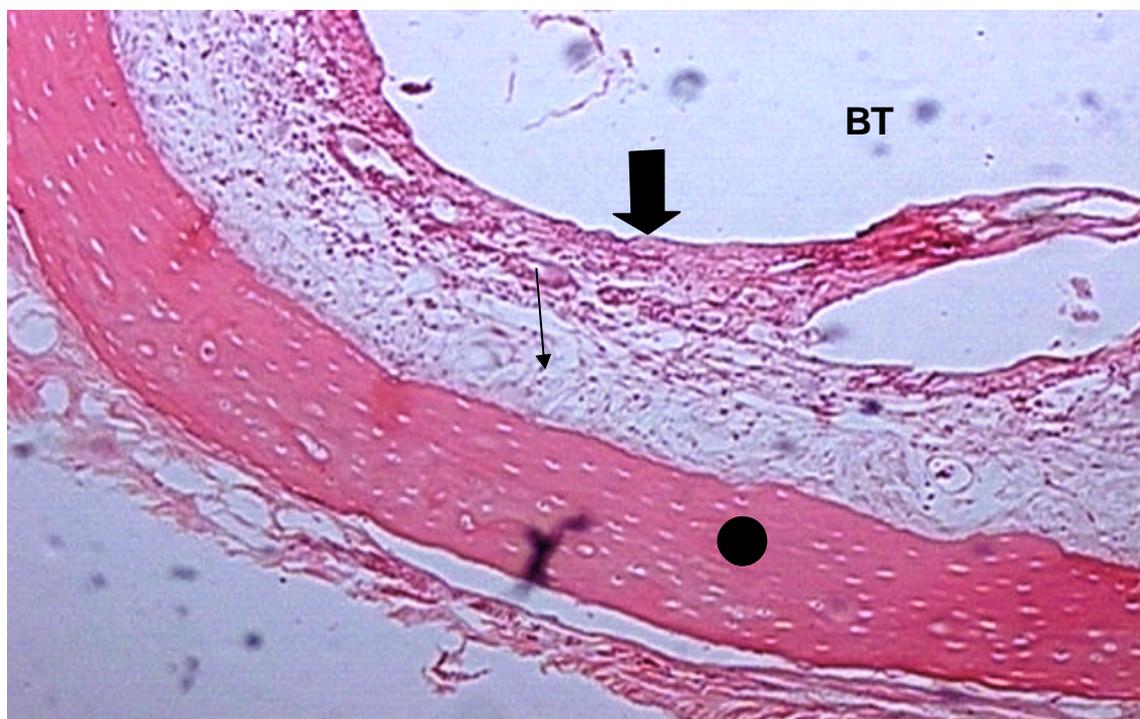
**Figura 9.** Fotomicrografia da membrana timpânica de rato do grupo experimental (BT = luz da bula timpânica com exsudato inflamatório; CAE = conduto auditivo externo; seta grossa = membrana timpânica espessada com descamação de queratina na sua camada mucosa interna; e seta fina = epitélio do conduto auditivo externo). Hematoxilina-eosina (aumento 200x).



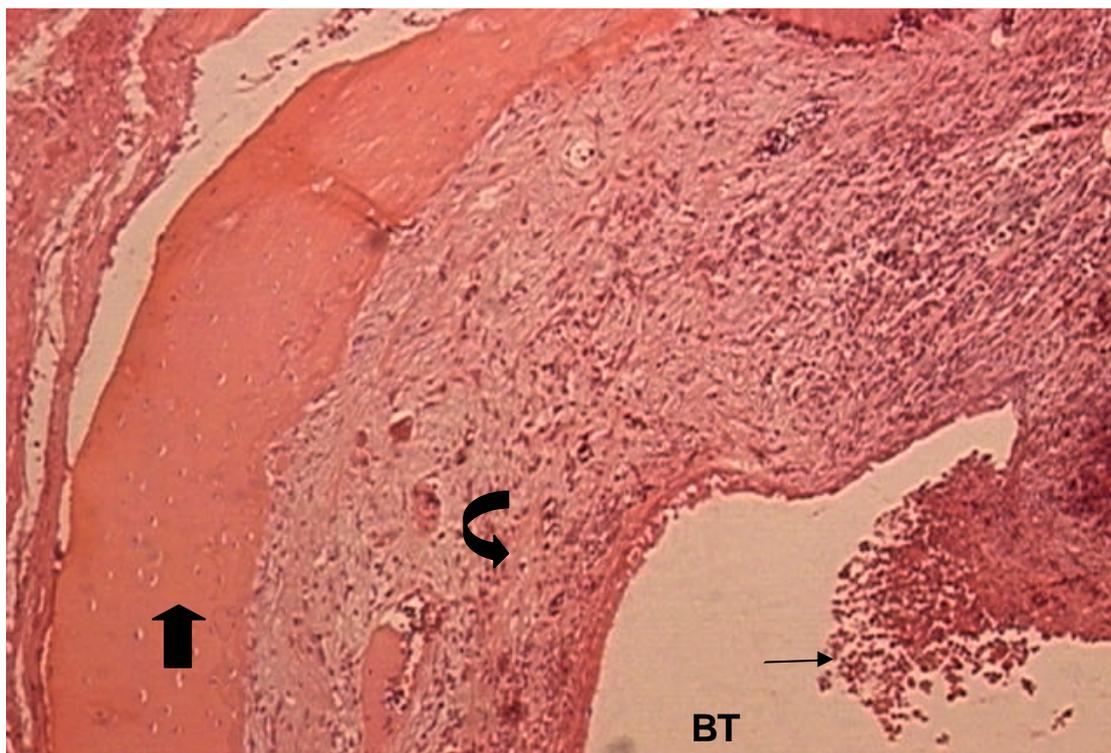
**Figura 10.** Fotomicrografia de bula timpânica de rato do grupo controle mostrando acúmulo intenso de queratina em descamação e exsudato inflamatório em seu interior (seta fina = queratina; seta grossa = exsudato inflamatório; e BT = luz da bula timpânica). Hematoxilina-eosina (aumento 100x).



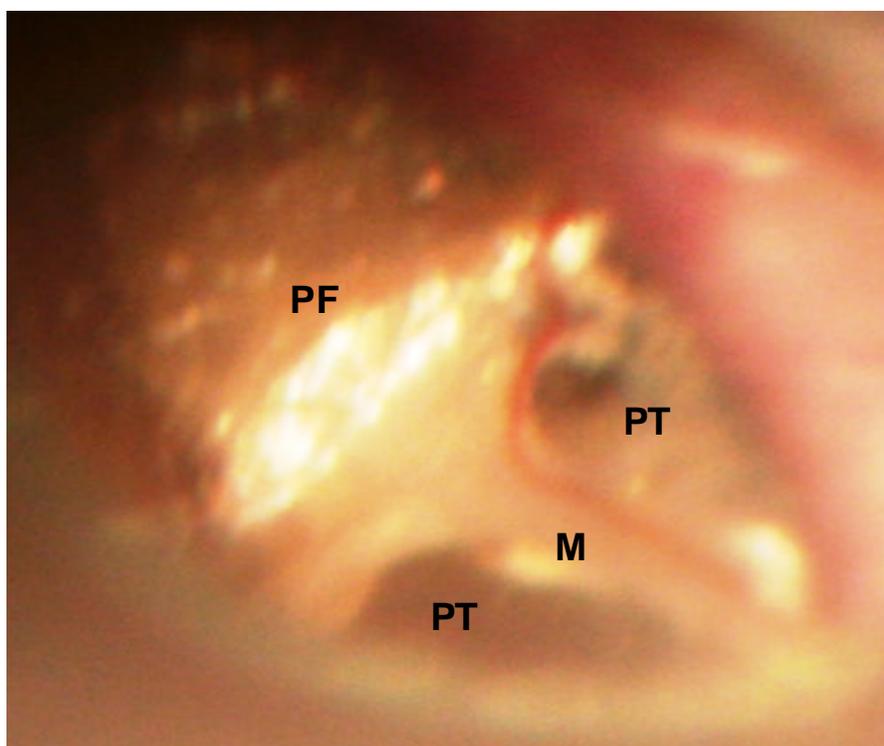
**Figura 11.** Fotomicrografia de membrana timpânica de rato do grupo experimental mostrando colesteatoma com descamação de queratina e presença de exsudato inflamatório (BT = luz da bula timpânica; seta grossa = queratina em descamação; seta fina = martelo; e seta curva = exsudato inflamatório). Hematoxilina-eosina (aumento 200x).



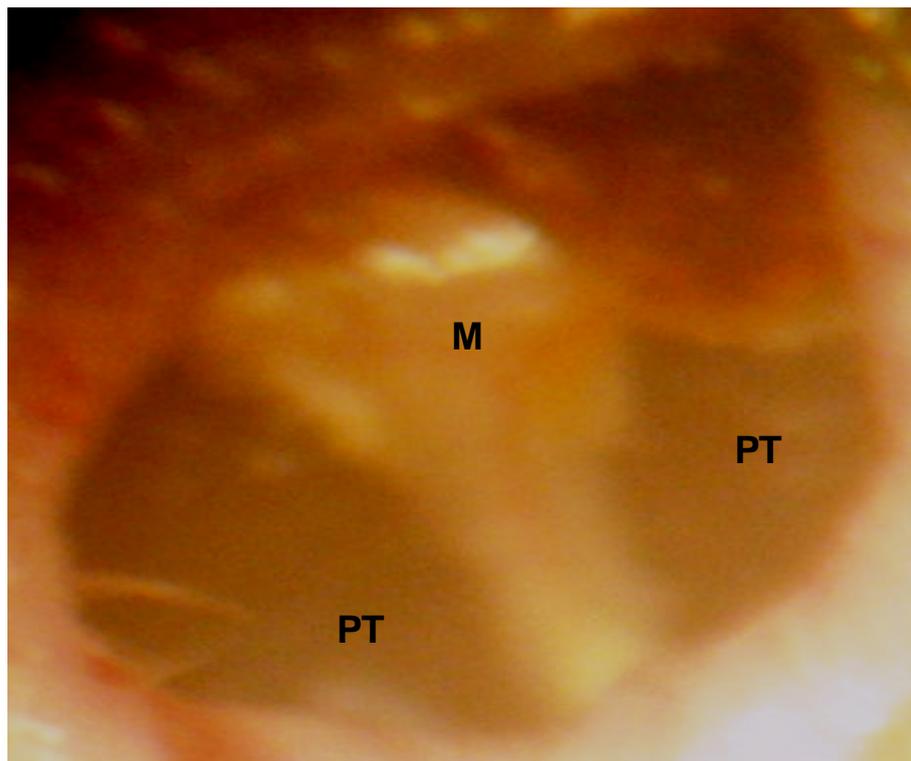
**Figura 12.** Fotomicrografia da mucosa da bula timpânica de rato do grupo controle (seta fina = lâmina própria espessada por edema com afluxo de células inflamatórias; seta grossa = epitélio da bula timpânica; BT = luz da bula timpânica; círculo = parede óssea da bula timpânica). Hematoxilina-eosina (aumento 100x).



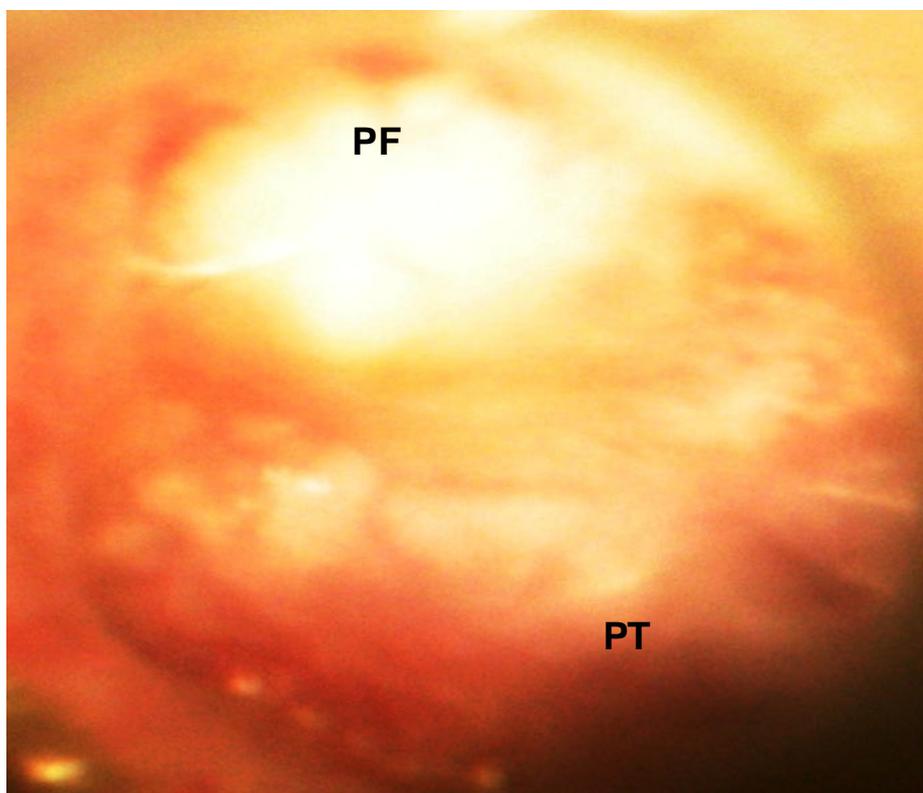
**Figura 13.** Fotomicrografia de mucosa de bula timpânica de rato do grupo experimental mostrando fibrose intensa e exsudato (seta curva = fibrose na mucosa; seta grossa = parede óssea da bula timpânica; seta fina = exsudato inflamatório; e BT = luz da bula timpânica). Hematoxilina-eosina (aumento 100x).



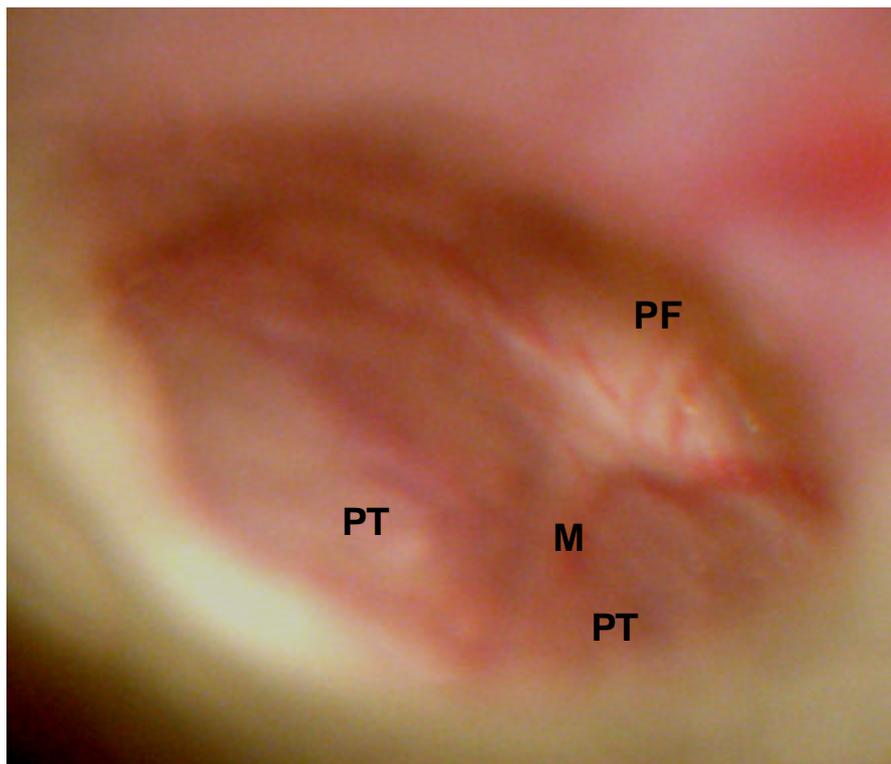
**Figura 14.** Otomicroscopia de rato do grupo controle (aumento 10x): membrana timpânica normal (PF = parte flácida; PT = parte tensa; e M = cabo do martelo).



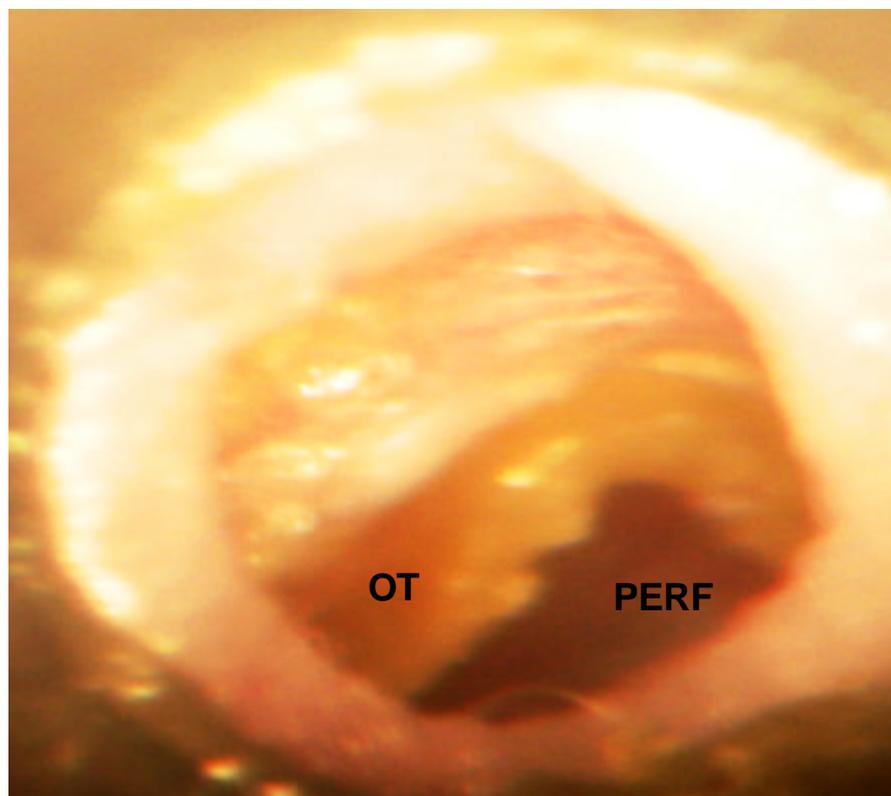
**Figura 15.** Otomicroscopia de rato do grupo controle (aumento 10x): membrana timpânica opaca (PT = parte tensa; e M = cabo do martelo).



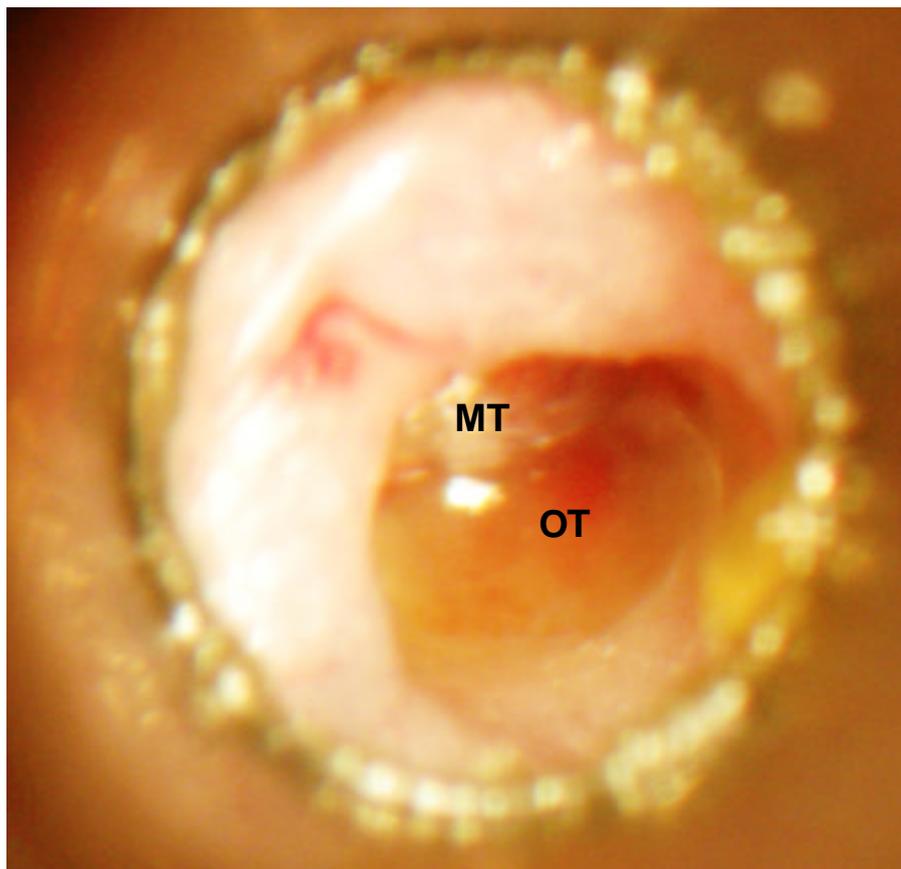
**Figura 16.** Otomicroscopia de rato do grupo experimental (aumento 10x): membrana timpânica opaca e abaulada pela presença de fluido na orelha média (PF = parte flácida; e PT = parte tensa).



**Figura 17.** Otomicroscopia de rato do grupo experimental (aumento 10x): membrana timpânica opaca e retração leve (PF = parte flácida; PT = parte tensa; e M = cabo do martelo).



**Figura 18.** Otomicroscopia de rato do grupo experimental (aumento 10x): membrana timpânica perfurada (PERF) e presença de otorréia (OT).



**Figura 19.** Otomicroscopia de rato do grupo experimental (aumento 10x): membrana timpânica (MT) perfurada e presença de otorréia (OT).

## **DISCUSSÃO**

Os resultados discutidos a seguir revelaram diferenças com significância estatística na atividade inflamatória entre os grupos controle e experimental, porém, como pode ser observado, os outros parâmetros estudados não sofreram modificações. A análise desses resultados e a elucidação das suas possíveis causas são os objetivos da discussão subsequente.

Conforme se observa na Tabela 1 e no Gráfico 1, houve intensa atividade inflamatória no grupo experimental, causada pelo uso da MMC em conjunto com o PG, a qual chegou a atingir 7,5 vezes os resultados obtidos no grupo controle, em relação à espessura da mucosa. A diferença observada da média da espessura da mucosa entre os dois grupos, igual a 178,33  $\mu\text{m}$ , apresentou significância estatística (teste “t” de Student para amostras pareadas:  $p = 0,004$ ), podendo-se inferir que, de fato, houve um forte estímulo à atividade inflamatória causada pela presença da MMC na orelha média dos ratos do grupo experimental. Isso ainda se torna mais evidente quando se compara a espessura da mucosa da bula timpânica (10,85  $\mu\text{m}$ ) (Figura 4), obtida através da medição deste parâmetro em orelhas de ratos, sem a manipulação das mesmas, com as médias observadas nos grupos controle (27,24  $\mu\text{m}$ ) (Figuras 5 e 12) e experimental (205,60  $\mu\text{m}$ ) (Figura 13), e que foram, respectivamente, 2,5 vezes maior para o primeiro, e 19 vezes para o segundo.

No grupo experimental, as alterações consistiram em intenso infiltrado inflamatório, no qual se observou a presença de células características tanto de inflamação aguda como de crônica. Os neutrófilos polimorfonucleares estiveram presentes em grande parte dos animais desse grupo, caracterizando um processo inflamatório agudo acompanhado de exsudato pio-hemorrágico. Porém, foi observada também a presença de células características de inflamação crônica, como os linfócitos, os plasmócitos e os histiócitos xantomatosos.

No grupo controle, os achados histopatológicos, apesar de também exibirem padrões de inflamação aguda, foram mais brandos, e predominaram as características próprias dos processos inflamatórios crônicos. Esses achados são comparáveis àqueles obtidos por

Massuda e Oliveira, que encontraram, em um grupo de ratos submetidos à indução de colesteatoma com biomembrana de látex, resultados semelhantes<sup>68</sup>. Sennaroglu e colaboradores encontraram, no seu grupo controle, inflamação intensa na mucosa da orelha média em 78% dos ratos submetidos a estímulo com o PG a 50%, porém neste estudo não foi observado esse grau de inflamação no grupo controle<sup>15</sup>. Essa discrepância pode dever-se à diferença em relação à forma de quantificar a inflamação, a qual não ficou clara no trabalho citado.

É importante ressaltar que, na maioria dos estudos analisados na literatura, não houve menção à quantificação da atividade inflamatória pela mensuração da espessura da mucosa da bula ou da membrana timpânica. Comumente, os estudos fazem uma análise apenas semiquantitativa, estabelecendo critérios visuais arbitrários para definir o grau da inflamação daquelas estruturas. Neste estudo, ao contrário, as mensurações tiveram lugar por meio do programa Scion Image® e puderam sofrer uma análise estatística mais apurada, o que fornece maior credibilidade às observações realizadas.

Em ratos submetidos à injeção transtimpânica de antígenos bacterianos do tipo polissacarídeos-peptideoglicanos e de lipopolissacarídeos, foi observada a ativação da cascata do complemento pelas vias clássica e alternativa, levando à ativação da toxicidade por macrófagos e à reabsorção de osso, constatando-se, ainda, a produção de radicais livres de oxigênio, óxido nítrico e eicosanóides, todos importantes mediadores de inflamação<sup>109</sup>. Uma ação comparável talvez tenha lugar neste estudo, uma vez que o PG pode ser responsável por provocar um processo inflamatório semelhante no grupo controle e que tenha sido potencializado pela ação da MMC no grupo experimental.

Quando se observa a Tabela 2 e o Gráfico 2, que apresentam a distribuição do grau de espessura (categorizado) da mucosa das bulas timpânicas nos dois grupos, e que reflete a atividade inflamatória, há a constatação da diferença importante entre eles, a qual apresentou

significância estatística (teste de homogeneidade marginal de Stuart? Maxwell:  $p = 0,038$ ). Enquanto no grupo controle há predominância da atividade inflamatória entre normal e leve (oito animais), no grupo experimental esta é, majoritariamente, intensa (sete animais).

Esse resultado, associado ao encontrado na Tabela 1, revela que o uso da MMC em conjunto com o PG provocou uma intensa atividade inflamatória, mesmo levando-se em consideração que os animais foram mortos apenas após dez semanas da última aplicação intratimpânica das soluções nas suas orelhas médias. Esse período foi definido porque haveria uma depuração natural dos processos inflamatórios agudos, com tendência a se observar aqueles com características de cronicidade próprios do intervalo de tempo em questão.

Alguns autores realizaram trabalhos semelhantes, porém optaram por períodos de intervalo para a morte dos animais e coleta das bulas timpânicas de no máximo seis semanas, por acreditarem ser este o tempo suficiente para observar a formação de colesteatomas<sup>16,17</sup>. O prazo de dez semanas, definido neste estudo, apesar de ter sido importante para observar reações histopatológicas tardias, teve a desvantagem da perda de vários animais, limitando a população final estudada.

Neste estudo foi escolhida a concentração de 0,5 mg/mL da MMC, com base em referências de pesquisas que relataram não haver lesões teciduais no nível de mucosa com essa concentração<sup>96,107</sup>. Reforçando essa opção, que é uma concentração bastante usada daquela droga, foram evitadas concentrações maiores, pois há relatos de que causaram otorrêia na orelha média de cobaias, anteriormente, em outros experimentos, sugerindo toxicidade<sup>101</sup>.

Seria importante, contudo, esclarecer se houve apenas a associação dos efeitos da MMC com o PG, como causadores do processo inflamatório, ou se, por outro lado, houve um verdadeiro efeito sinérgico entre as drogas. Não foi encontrada na literatura nenhuma informação que apontasse nessa direção, mas também não houve evidências demonstrando o

contrário. É possível, porém, que o desenho do estudo, que consistiu em três injeções intratimpânicas seguidas, tenha sido muito agressivo e, portanto, causador dos resultados obtidos.

Outra hipótese viável é que a mucosa da tuba auditiva no grupo experimental também estivesse mais edemaciada do que no grupo controle. Dessa forma, seria propiciado um processo inflamatório mais intenso na mucosa da bula timpânica, ocasionado por uma menor tensão parcial de oxigênio, que culminaria na geração de um microambiente com tendência a baixo pH e suscetibilidade à infecção, levando a uma retroalimentação positiva do mesmo.

Isso também levaria a um acúmulo de PG por mais tempo, elevando assim sua possibilidade de causar toxicidade local, proporcionalmente, em relação ao grupo controle. Esses efeitos sobre a mucosa devem ser levados em consideração, uma vez que há estudos que mostram que vários antibióticos podem, eventualmente, provocar inflamação grave se postos em contato com a orelha média e também levar à ototoxicidade no nível da orelha interna<sup>76</sup>.

Há, também, relato da alteração dos potenciais auditivos do tronco cerebral com a utilização da MMC em concentrações acima de 0,25 mg/mL, quando utilizada topicamente na orelha média de ratos, o que, provavelmente, evidencia lesão no nível da orelha interna<sup>100</sup>. Uma preparação comercial de gotas tópicas de antibióticos, por exemplo, contendo neomicina, polimixina B e hidrocortisona provocou ototoxicidade coclear em chinchilas, confirmada pela realização de eletrococleografia<sup>110</sup>.

É importante ressaltar que a ototoxicidade provocada por antibióticos na orelha média de humanos é menos provável de ocorrer do que em roedores. Em humanos: 1. as estruturas em volta da membrana da janela redonda são mais complexas e esta é mais espessa; e 2. a doença da orelha média que inclui a presença de tecido granulomatoso, espessamento e fibrose da sua mucosa tendem a impedir que as gotas tópicas penetrem na orelha interna<sup>110</sup>.

No entanto, essa preocupação deve sempre estar presente ao se utilizar drogas na orelha média, principalmente quando os estudos passam a ser realizados *in anima nobili*.

Uma das maneiras de evitar o efeito tópico das drogas sobre a mucosa seria induzir o colesteatoma por meio de outro modelo experimental em que não fosse utilizado o PG. Um dos vários modelos possíveis seria induzir o colesteatoma com biomembranas de látex, o que, aprioristicamente, deixaria a orelha média livre de outras drogas, permitindo que os efeitos se concentrassem exclusivamente na ação da MMC. Ainda como possibilidade, colesteatomas poderiam ser induzidos pela obliteração da tuba auditiva e aplicação da MMC na orelha média dos animais.

Na Tabela 3 e no Gráfico 3, nos quais são apresentados os resultados da avaliação da espessura da membrana timpânica, não foram observadas diferenças com significância estatística entre os dois grupos (teste “t” de Student para amostras pareadas:  $p=0,371$ ). Contudo, há que se referir ter havido um discreto aumento, de 24,4%, da espessura da membrana timpânica entre os dois grupos, a favor do grupo experimental.

Comparando-se a média da espessura da membrana timpânica de ratos (12,07  $\mu\text{m}$ ) com as médias obtidas nos grupos controle (12,05  $\mu\text{m}$ ) e experimental (14,99  $\mu\text{m}$ ), verificou-se que, em relação àquele, foi praticamente igual, porém foi 24,2% menor em relação a este.

Os valores máximos da espessura da membrana timpânica foram de 24,14  $\mu\text{m}$  e de 29,38  $\mu\text{m}$ , para os grupos controle e experimental, respectivamente, o que corresponde a uma variação aproximada de 100 a 143% da espessura daquela nos ratos em que não houve manipulação experimental. Achado semelhante foi observado por Larsson e colaboradores, os quais observaram que houve aumento da espessura da membrana timpânica, principalmente da camada fibrosa, praticamente dobrada por um aumento de fibras colágenas, em gerbilos da Mongólia submetidos à indução de colesteatoma pela ligadura do conduto auditivo externo<sup>111</sup>.

Podem ser observados os diversos aspectos histológicos das membranas timpânicas dos ratos, sejam de um espécime normal (Figura 3), sejam daqueles oriundos do grupo controle (Figura 8) e do grupo experimental (Figura 9). É nítida a diferença que existe entre uma membrana timpânica normal, que se apresenta delgada e sem inflamação, e uma dos outros grupos referidos, em que se nota espessamento importante.

Na Tabela 4 e no Gráfico 4 podem ser observadas a distribuição da espessura (categorizada) das membranas timpânicas nos grupos controle e experimental, indicando não ter havido diferença com significância estatística entre eles (teste de homogeneidade marginal de Stuart? Maxwell:  $p = 0,223$ ). Esses dados sugerem, mais uma vez, que o período utilizado para a morte, coleta das bulas timpânicas e seu estudo seja realmente tardio, pois ao se analisar os dois grupos, em conjunto, observa-se que em nove animais as membranas timpânicas estão normais ou com espessamento leve, e em apenas três deles existe espessamento moderado.

Estudo realizado por Masaki e colaboradores mostrou que as membranas timpânicas de chinchilas, após a introdução, na orelha média destas, de gotas tópicas contendo sulfato de neomicina, polimixina B, hidrocortisona e PG, sofreram, a partir de dois dias, intensas alterações, com a completa destruição das camadas epidérmica e mucosa, seguida de rápida reepitelização e hiperplasia de todas as três camadas após três semanas<sup>112</sup>. Outro aspecto a tratar concerne às alterações que sofreram as membranas timpânicas no estudo citado, nas quais houve ruptura das fibras colágenas na camada fibrosa e invasão de epiderme hiperplásica com o desenvolvimento de perfurações<sup>112</sup>.

Através dessas perfurações pode ocorrer, em humanos, como já demonstrado, o crescimento da camada epitelial externa da membrana timpânica para dentro da orelha média, e o conseqüente desenvolvimento do colesteatoma, como referido por Palva e Johnson<sup>113</sup>. Também foi observado, em membranas timpânicas de chinchilas, que essas ficam intactas,

mas estruturalmente alteradas, após o uso do PG a 50% na sua orelha média, e seria por essa via que se formariam os colesteatomas nos animais submetidos a esse modelo experimental<sup>80</sup>. Essa observação também foi feita por Wright e colaboradores, ao estudarem a microestrutura das membranas timpânicas de chinchilas submetidas à aplicação de PG a 50% a partir da orelha média<sup>75</sup>. Nelas, ficavam nítidas essas falhas, com a subsequente migração de células epidérmicas por meio da camada fibrosa<sup>75</sup>. Huang e colaboradores observaram em seu estudo, inclusive, a presença de um microcolesteatoma na membrana timpânica de um dos animais<sup>79</sup>.

Na Tabela 5 e no Gráfico 5 é apresentada a distribuição da integridade das membranas timpânicas nos grupos controle e experimental, avaliadas através da otomicroscopia. Foi observado que, no grupo controle, ao final do estudo, as membranas timpânicas se apresentaram íntegras (oito animais), ao contrário das do grupo experimental (quatro animais). Contudo o resultado indica que a diferença entre as proporções das membranas timpânicas íntegras e daquelas com perfuração não foi estatisticamente significativa (teste exato de McNemar:  $p=0,219$ ). Esse achado sinaliza que há uma tendência à cicatrização espontânea das membranas timpânicas após o intervalo de tempo já referido, mesmo no grupo em que se utilizou a MMC, droga que em vários estudos é utilizada, precipuamente, para manter perfurações timpânicas produzidas propositalmente patentes<sup>90, 93, 96, 97, 101</sup>.

Na Tabela 6 e no Gráfico 6 pode ser observada a distribuição das otomicroscopias de forma mais detalhada, realizadas nos grupos controle e experimental, e o resultado do teste de homogeneidade marginal de Stuart? Maxwell ( $p=0,262$ ) indicou não haver diferença com significância estatística entre eles.

Os resultados das otomicroscopias foram categorizados em: 1. membrana timpânica de aspecto normal; 2. apresentando opacificação; 3. com perfuração (com ou sem otorréia associada); e 4. apresentando hiperemia. Nas Figuras 14 a 19 podem ser observados os diversos aspectos das otomicroscopias referidos.

No grupo controle, duas orelhas estavam com aspecto normal, enquanto que a maioria apresentou alterações, como opacificação (seis animais) e perfurações timpânicas (um animal). No grupo experimental, por sua vez, todas as membranas timpânicas estavam alteradas, exibindo um dos aspectos seguintes: opacificação (três animais), hiperemia (um animal) ou perfuração (cinco animais).

Já foi observado, por Santos e colaboradores, em estudo em ratos nos quais foi induzida a miringoesclerose, que a relação entre a otomicroscopia e os achados histológicos foi confiável<sup>14</sup>. Na pesquisa aqui empreendida, uma vez que as alterações otomicroscópicas poderiam ser um reflexo do processo inflamatório ao nível da mucosa, e dado que no grupo experimental essas foram mais pronunciadas do que no grupo controle, existe a suspeita de uma tendência, que não teve confirmação estatística, porém para a qual há plausibilidade teórica. Caso o número de animais estudado fosse maior poderia ser, eventualmente, observada diferença com significância estatística entre os dois grupos, uma vez que um processo inflamatório mais prolongado e intenso levaria com maior probabilidade a alterações também no nível das membranas timpânicas.

Em relação às alterações otomicroscópicas, essas poderiam ter sido classificadas, mais detalhadamente, em relação aos aspectos observados, como por exemplo: opacificação leve e intensa, perfurações timpânicas pequenas e amplas e ainda com ou sem otorrêia. Porém, devido ao pequeno número de casos, provavelmente não agregariam informações adicionais a este estudo, e por isso foi utilizada uma classificação mais sintética.

Se os dois grupos forem analisados em conjunto, das 18 orelhas estudadas, apenas duas se mantiveram normais. Em estudo realizado por Antunes, no qual utilizou o PG a 100% na orelha média de cobaias, as alterações otoscópicas estiveram presentes na grande maioria das orelhas estudadas, estando ausentes em apenas 7,5% delas, o que coincide com os achados deste estudo<sup>16</sup>. Esse autor encontrou ainda como alteração otoscópica preponderante a

opacificação e a formação de cerume, principalmente no seu grupo experimental, as quais atribuiu ao uso do ácido trans-retinóico<sup>16</sup>. Já neste trabalho, a opacificação e a presença da perfuração da membrana timpânica foram os achados predominantes, respectivamente em nove e seis dos animais estudados. Em relação à perfuração timpânica, Antunes observou, ainda, em seus grupos controle e experimental, respectivamente as cifras de 12,9% e 10,3%<sup>16</sup>. No presente estudo, houve coincidência no valor do grupo controle, que foi de 11,1%, porém foi encontrada diferença no grupo experimental, que foi de 55,6%. É possível que o uso da MMC seja responsável por essa diferença mantendo as perfurações timpânicas patentes.

A Tabela 7 e o Gráfico 7 tratam da presença do exsudato na mucosa das bulas timpânicas, indicando não ter havido diferença com significância estatística entre os grupos controle e experimental (teste exato de McNemar:  $p = 0,125$ ). Esse resultado revela um comportamento extremamente semelhante entre os grupos, apesar da diferença que houve no grau de inflamação da mucosa. A presença de exsudato foi observada em três animais no grupo controle (Figura 10), e em sete no grupo experimental (Figura 11), nas orelhas estudadas. Contudo, observou-se que a intensidade e a exuberância dos exsudatos presentes neste foram maiores do que dos daquele. Este achado possivelmente reflete a maior atividade inflamatória presente no grupo experimental, já mencionada anteriormente. Estudos postulam que a infecção parece ser um fator favorecedor da formação dos colesteatomas. Hessling e colaboradores, por exemplo, mostraram que a presença de endotoxinas de lipopolissacarídeos, potentes indutores de inflamação e moduladores de resposta imune, estimula fortemente a proliferação de culturas de epitélio da orelha média de humanos, bem como dos queratinócitos, afetando, inclusive, a morfologia destes<sup>115</sup>. Grote e colaboradores, ao estudarem o efeito da adição de endotoxina em uma co-cultura formada pela mucosa da orelha média e da epiderme meatal de ratos, observaram que houve retardo da proliferação daquela sobre esta, em relação ao seu grupo controle, sugerindo que ela pode modificar o

processo de cicatrização natural na orelha média<sup>116</sup>. Vennix e colaboradores demonstraram que implantes de pele na orelha média de ratos foram bem tolerados, podendo se tornar parte da mucosa ou cistos epiteliais, porém quando sobreveio infecção observou-se a indução de um crescimento expansivo daqueles, podendo sugerir comportamento semelhante ao da matriz colesteatomatosa<sup>117</sup>.

Muitos autores preferem usar como modelo experimental, para a formação dos colesteatomas, a injeção de drogas através da bula timpânica, com o objetivo de não danificar a membrana timpânica, com a conseqüente possibilidade da sua indução a partir do conduto auditivo externo<sup>7,16,20,21,75</sup>. O modelo utilizado, neste estudo, foi a indução dos colesteatomas através da injeção intratimpânica de PG, tendo como principal objetivo o de verificar a influência da MMC sobre estes, para a qual havia uma expectativa de modulação negativa, pela inibição da atividade dos fibroblastos. Assim, não se considerou fundamental que essa indução, obrigatoriamente, fosse realizada através da bula timpânica. Conforme sugerem os resultados observados a seguir, em relação à formação de colesteatoma, não houve prejuízo com essa escolha e, inclusive, é um modelo que pode ser adotado, uma vez que a maioria das membranas timpânicas estava íntegra ao final do experimento.

Quanto à presença do colesteatoma verificada em sete animais (Figuras 6, 7, 9, 10 e 11), no grupo controle, demonstrados na Tabela 8 e no Gráfico 8, estão em níveis semelhantes a vários outros publicados na literatura mundial. Sennaroglu e colaboradores encontraram, com o uso do PG a 50% em orelha média de ratos, a presença de 33% em seu grupo controle<sup>15</sup>; Massuda e Oliveira encontraram, respectivamente, 80% e 90% de positividade para a formação do colesteatoma, usando ponte de biomembrana de látex com PG e apenas ponte de biomembrana de látex, colocadas entre o conduto auditivo externo e a orelha média, pela criação de uma perfuração na membrana timpânica de ratos<sup>68</sup>; Huang e colaboradores, utilizando o PG em concentrações de 50 e 100% em ratos, encontraram, respectivamente,

46% e 83% de positividade para o colesteatoma<sup>79</sup>; Antunes referiu que observou colesteatoma em 75% das orelhas médias das cobaias em que usou PG a 100%<sup>16</sup>.

Neste estudo, a presença do colesteatoma nos grupos controle (sete animais) e experimental (nove animais) revelou que o uso da MMC não produziu diferença com significância estatística entre os mesmos (teste exato de McNemar:  $p = 0,687$ ). Não houve diminuição na formação do colesteatoma; pelo contrário, foi observado, inclusive, um discreto aumento na sua incidência no grupo experimental.

Diversas publicações revelam que não houve êxito na diminuição da formação do colesteatoma, coincidindo com o que se evidenciou nesta pesquisa, e que são relatados a seguir.

Pownell e colaboradores, por exemplo, tentaram reduzir a incidência da formação de colesteatomas em chinchilas pela aplicação, por via sistêmica, de ciclofosfamida, agente alquilante comumente usado como quimioterápico<sup>21</sup>. Porém os colesteatomas estiveram presentes em 50% das orelhas estudadas, restando que a droga foi ineficaz para aquele fim<sup>21</sup>.

Jove e colaboradores, em estudo com chinchilas, em que induziram o colesteatoma na orelha média com o PG a 90%, não obtiveram êxito ao tentar reduzir a sua incidência pela administração oral da isotretinoína (ácido 13-cis-retinóico), tendo em seus grupos controle e experimental, respectivamente, 33% e 75% de formação de colesteatomas<sup>118</sup>.

Da mesma forma, o ácido hialurônico a 1,5% foi utilizado, topicamente, para impedir a formação dos colesteatomas em chinchilas submetidas à introdução de PG a 60% na orelha média, porém não teve efeito sobre sua formação, tendo sido obtida uma incidência de 70% no grupo experimental, semelhante ao do seu grupo controle, que foi de 71%<sup>17</sup>.

Houve pesquisas nas quais foi alcançado êxito na inibição da formação do colesteatoma como as mencionadas em seguida.

A prednisolona, agente antiinflamatório local, foi utilizada com este fim na orelha média de ratos tratados com PG, e foi obtido sucesso, diminuindo a incidência de 33%, no grupo controle, para ausência de formação do colesteatoma no seu grupo experimental<sup>15</sup>. Essa droga também esteve associada à diminuição da inflamação local<sup>15</sup>. Esses resultados foram atribuídos à ação dos corticosteróides, que inibiriam a migração dos neutrófilos e dos monócitos para o local da inflamação, impedindo a formação do tecido de granulação inflamatório<sup>119</sup>.

A utilização do ácido trans-retinóico instilado no CAE de cobaias proporcionou redução na incidência dos colesteatomas formados na orelha média, induzidos pelo PG, de 70% no grupo controle para 30% no grupo experimental, resultado estatisticamente significativo<sup>16</sup>.

Nageris e colaboradores obtiveram redução, com significância estatística, na formação do colesteatoma realizada pela ligadura do CAE por nove meses em gerbilos da Mongólia, utilizando a vitamina A (grupo 1 – 65%), e com o Cortisporin® (hidrocortisona, 10 mg; sulfato de neomicina, 3,5 mg; e sulfato de polimixina B, 10.000 unidades/mL) (grupo 2 – 60%), na forma de gotas tópicas, quando comparados com aqueles nos quais não foi utilizada nenhuma medicação (grupo 3 – 100%)<sup>18</sup>.

Minotti e colaboradores realizaram uma pesquisa *in vitro* na qual mostraram que espécimes de colesteatomas obtidos de humanos sofriam inibição na sua migração após serem expostos a concentrações crescentes do ácido all-trans-retinóico, metabólito endógeno da vitamina A encontrado no plasma, e que sofriam reversão quando esse era retirado<sup>19</sup>. Esses autores basearam seu estudo nas propriedades da vitamina A de alterar o crescimento e a diferenciação da pele, e de reverter mudanças tissulares associadas à hiperqueratose<sup>19</sup>.

Em estudo no qual foi realizada a indução de colesteatomas em bulas timpânicas de chinchilas usando o PG a 60%, e, depois, utilizado o 5-fluoracil, inibidor da síntese de DNA,

usado frequentemente como droga quimioterápica, em solução tópica a 5% no CAE desses animais, foi observada diminuição de sua incidência<sup>20</sup>. Provavelmente esse efeito ocorreu pela diminuição da proliferação e da hiperplasia dos tecidos da membrana timpânica, porém não evitou completamente a formação dos colesteatomas<sup>20</sup>.

No presente estudo, foi observada, na realidade, ausência da influência da MMC na indução do colesteatoma, que pode ser analisada pelo prisma da sua ação bem estabelecida sobre a proliferação do tecido conjuntivo. O colesteatoma é formado por epitélio (matriz) e tecido conjuntivo (perimatriz) e sua patogenia está primordialmente relacionada às alterações epiteliais (seja pela teoria da migração epitelial, da retração ou da metaplasia). Sendo assim, a ação sobre o tecido conjuntivo poderia ser considerada de caráter secundário, e a explicação para a falta de efeito da MMC na inibição da indução do colesteatoma pode ter sido, justamente, essa. Assim, acabaram por prevalecer, neste estudo, os efeitos irritativos da MMC, que causaram reação inflamatória mais intensa sem, contudo, interferir na formação dos colesteatomas.

Foi observada, em alguns dos animais deste estudo, a reabsorção óssea no nível da bula timpânica, conforme relatado em outras pesquisas<sup>120</sup>. Há relatos de reabsorção óssea localizada, causada por atividade inflamatória em que se observou uma densidade aumentada de osteoclastos<sup>121</sup>. Uma possível explicação é que a inflamação, relacionada ao colesteatoma, induz uma reabsorção óssea pela liberação da osteoprotegerina ligada a partir de células “T” ativadas e que deflagra a osteoclastogênese<sup>122</sup>. Outra explicação proposta para esse fenômeno sugere que haveria uma regulação diminuída de osteoblastos a partir da ausência de proteínas não-colágenas no osso da mastóide afetado por colesteatoma<sup>123</sup>. Por outro lado, a inibição do óxido nítrico, radical livre que tem efeitos inibitórios e estimuladores na reabsorção de osso e que pode ser induzido por citocinas inflamatórias, não teve ação na resposta dos osteoclastos em um modelo *in vivo* de colesteatoma, no qual haveria indução de reabsorção óssea,

sugerindo que o mecanismo da osteoclastogênese inflamatória é mediado por outras vias<sup>124</sup>. Em experimento no qual foi induzida otite média aguda, pela inoculação de *Streptococcus pneumoniae*, foi observado intenso processo de osteoneogênese pela presença de osteoblastos e osteoclastos estimulados pela presença de metabólitos do ácido araquidônico, obtidos pelas vias da lipo-oxigenase e ciclo-oxigenase: leucotrienos e prostaglandinas; cascata de citocinas, o sistema calicreína-quinina e a cascata de coagulação, que chega a durar seis meses<sup>125</sup>.

Na Tabela 9 e Gráfico 9, que tratam da fibrose presente na mucosa da bula timpânica, houve incidência semelhante nos grupos controle e experimental, respectivamente, oito e nove animais. Contudo, apesar de não haver diferença com significância estatística entre eles (teste exato de McNemar:  $p = 1,000$ ), observou-se fibrose com mais intensidade no grupo experimental (Figura 13). Esse achado foi, de certa forma, inesperado, pois a MMC, teoricamente, teria ação de diminuir a proliferação de fibroblastos e a subsequente fibrose, porém isso não ocorreu. Uma possível explicação é que a atividade inflamatória, muito intensa nesse grupo, suplantou os efeitos da MMC sobre os fibroblastos, e a fibrose seguiu seu curso sem ser afetada.

Em muitas das lâminas estudadas foi observada a angiogênese com proliferação vascular na lâmina própria da mucosa da orelha média, principalmente no grupo experimental, no qual a atividade inflamatória foi mais acentuada. Fenômeno semelhante referindo a presença da neoformação vascular, principalmente na perimatriz, próxima às regiões de reação inflamatória aguda e crônica, já foi relatado na literatura<sup>68</sup>.

Uma possível explicação, aventada por Sudhoff e colaboradores, consiste na identificação de que a expressão e a distribuição dos fatores do crescimento angiogênico, em humanos, na mucosa da orelha média pode estar alterada, tais como: Fator de Crescimento Vascular Endotelial, Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos e Fator de Crescimento de Transformação Alfa<sup>126</sup>. Estes permitiriam e sustentariam a migração dos queratinócitos para a

cavidade da orelha média, desta forma tendo papel importante no padrão destrutivo do colesteatoma<sup>126</sup>.

Finalmente, cabe uma discussão sobre a natureza dos colesteatomas encontrados e a sua origem, neste estudo. A análise das lâminas mostrou um padrão de distribuição do tecido colesteatomatoso próximo à membrana timpânica podendo ser inferida a invasão da mucosa da bula timpânica a partir daquela. Em dois casos do grupo experimental, os colesteatomas estavam bem próximos à membrana timpânica, indicando a possível migração do epitélio do CAE como sendo a gênese dos colesteatomas encontrados. Esse achado coincide com os encontrados na literatura e sugere a teoria da proliferação de células basais como a responsável pela presença do colesteatoma induzido na orelha média dos ratos, neste estudo<sup>68, 79</sup>. Há, porém, um aspecto que precisa ser mencionado e que foi levantado por Kuijpers e colaboradores<sup>127</sup>. Eles encontraram, por meio de estudos de imuno-histoquímica, a presença de metaplasia celular escamosa na orelha média de ratos e de humanos<sup>127</sup>. Esta se caracterizava pela perda das citoqueratinas relacionadas ao epitélio simples, associada ao aparecimento de citoqueratinas relacionadas ao epitélio estratificado queratinizado, indicando uma verdadeira diferenciação do epitélio da orelha média<sup>127</sup>. No entanto, embora já se tenha descrito, em crianças com otite média, a presença de ilhas de queratinização epitelial na mucosa da orelha média através de biópsia, não há evidências clínicas de que a teoria da metaplasia possa ser responsável de maneira importante pela formação dos colesteatomas em humanos<sup>37,39</sup>

Em estudo em humanos, realizado por Palva e Johnson, foram descritas projeções papilíferas da epiderme, estendendo-se profundamente na lâmina própria espessada das partes tensa e flácida da membrana timpânica na otite média crônica<sup>113</sup>. Esses achados sugerem que a patogênese do colesteatoma papilífero pode ocorrer na ausência de bolsas de retração ou perfurações da membrana timpânica<sup>113</sup>. Assim sendo, pelas características dos colesteatomas

estudados neste experimento, é mais provável que estes tenham se originado por migração da pele através das membranas timpânicas estruturalmente íntegras, ou através de perfurações nas mesmas, do que pelo processo de metaplasia.

**CONCLUSÕES**

Baseado nos experimentos e resultados obtidos através da metodologia utilizada neste estudo, com nível de significância estatística de 5%, é possível concluir que a mitomicina C intratimpânica não foi eficaz para impedir o desenvolvimento do colesteatoma e da otite média em ratos.

## **REFERÊNCIAS**

1. Schucknecht HF, editor. Infections. Pathology of the ear. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Harvard University Press; 1993. p 200-34.
2. Proctor B. Otitis media crónica y mastoiditis. In: Paparella MM, Shumrick DA, editors. Otorrinolaringología. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana SA; 1988. p. 1434-68.
3. Miniti A. Otite média crônica colesteatomatosa. In: Lopes Filho O, Campos CAH, editores. Tratado de Otorrinolaringologia. São Paulo: Roca; 1994. p.747-51.
4. Caldas NCR. Otite média crônica colesteatomatosa. In: Caldas NCR, Caldas Neto SS, Sih T, editores. Otologia e Audiologia em Pediatria. Rio de Janeiro: Revinter; 1999. p. 99-105.
5. Hungria H. Otites médias crônicas supurativas. Timpanoplastias. In: Otorrinolaringologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988. p. 307-325.
6. Lopes Filho O. Colesteatoma na criança – Considerações clínico-cirúrgicas. In: Lopes Filho O, Campos CAH, editores. Tratado de Otorrinolaringologia. São Paulo: Roca; 1994. p. 752-62.
7. Rüedi L. Cholesteatoma formation in the middle ear in animal experiments. Acta Otolaryngol. 1959 May-Aug; 50(3-4):233-40.
8. Bujía J, Sudhoff H, Holly A, Hildmann H, Kastenbauer E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in middle ear cholesteatoma. Eur Arch Otorrinolaryngol. 1996 Jan-Fev; 253(1-2):21-4.
9. Albino AP, Kimmelman CP, Parisier SC. Cholesteatoma: a molecular and cellular puzzle. Am J Otol. 1998 Jan; 19(1):7-19.
10. Sudhoff H, Linthicum FHJ. Cholesteatoma behind an intact tympanic membrane: histopathologic evidence for a tympanic membrane origin. Otol Neurotol. 2001 Jul; 22(4):444-6.
11. Tos M. A new pathogenesis of mesotympanic (congenital) cholesteatoma. Laryngoscope. 2000 Nov; 110(11):1890-7.

12. Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of attic cholesteatoma: clinical and immunohistochemical support for combination of retraction theory and proliferative theory. *Am J Otol.* 2000 Nov; 21(6):786-92.
13. McGinn MD, Chole RA, Henry KR. Cholesteatoma. Experimental induction in the Mongolian Gerbil, *Meriones Unguiculus*. *Acta Otolaryngol.* 1982 Jan-Feb; 93(1-2):61-7.
14. Adunka O, Gstoettner W, Knecht R, Kierner A. Expression of hypoxia inducible Factor 1 [alfa] and Von Hippel Lindau protein in human middle ear cholesteatoma. *Laryngoscope.* 2003 Jul;113(7):1210-5.
15. Sennaroglu L, Ozkul A, Gedikoglu G, Turan E. Effect of intratympanic steroid application on the development of experimental cholesteatoma. *Laryngoscope.* 1998 Apr;108(4 Pt 1):543-7.
16. Antunes ML. Efeito do ácido trans-retinóico na inibição da formação de colesteatoma em cobaias [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2003.
17. White SJ, Wright CG, Robinson KS, Meyerhoff WL. Effect of topical hyaluronic acid on experimental cholesteatoma. *Am J Otolaryngol.* 1995 Sep-Oct;16(5):312-8.
18. Nageris BI, Grushko I, Feinmesser R. Cholesteatoma prevention by local treatment with vitamin A. *Otol Neurotol.* 2001 Sep; 22(5):576-8.
19. Minotti AM, Stiernberg CM, Cabral F. Inhibition of cholesteatoma migration in vitro with all-trans retinoic acid. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996 Jun;114(6):768-76.
20. Wright CG, Bird LL, Meyerhoff WL. Effect of 5-fluorouracil in cholesteatoma development in an animal model. *Am J Otolaryngol.* 1991 May-Jun;12(3):133-8.
21. Pownell PH, Wright CG, Robinson KS, Meyerhoff WL. The effect of cyclophosphamide on development of experimental cholesteatoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994 Oct; 120(10):1114-6.

22. Costa VP, Spaeth GL, Eiferman RA, Orengo-Nania S. Wound healing modulation in glaucoma filtration surgery. *Ophthalmic Surg.* 1993 Mar; 24(3):152-70.
23. Ingrams DR, Volk MS, Biesman BS, Pankratov MM, Shapshay SM. Sinus surgery: does mitocyn C reduce stenosis? *Laryngoscope.* 1998 Jun;108(6):883-6
24. Chung JH, Cosenza MJ, Rahbar R, Metson RB. Mitomycin C for the prevention of adhesion formation after endoscopic sinus surgery: a randomized controlled study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002 May; 126(5):468-74.
25. Shields CL, Naseripour M, Shields JA. Topical mitomycin C for extensive, recurrent conjunctival-corneal squamous cell carcinoma. *Am J Ophthalmol.* 2002 May;133(5):601-6.
26. Daniell M, Maini R, Tole D. Use of mitomycin C in the treatment of corneal conjunctival intraepithelial neoplasia. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2002 Apr;30(2):94-8.
27. Mudry A. Guichard Joseph Duverney (1648-1730), first French otologist in the 17th century. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 2000 Sep;117(4):203-9.
28. Soldati D, Mudry A. Knowledge about cholesteatoma from the first description to the modern histopathology. *Otol Neurotol.* 2001 Nov; 22(6):723-30.
29. Schucknecht HF, editor. *Congenital Cholesteatoma. Pathology of the ear.* 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Harvard University Press; 1993. p. 161-5.
30. Ribeiro FAQ, Pereira CSB. Otite média colesteatomatosa. In: Campos CAH, Costa HOO, editores. *Tratado de Otorrinolaringologia.* São Paulo: Roca; 2002. p. 93-102.
31. Kemppainen HO, Puhakka HJ, Laippala PJ, Sipilä MM, Manninen MP, Karma PH. Epidemiology and aetiology of middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 1999 May;119(5):568-72.

32. Harker LA. Cholesteatoma: an incidence study. In: McCabe B, Sadé J, Abramson M, editors. Cholesteatoma: First International Conference. Birmingham: Aesculapius Publishing Company; 1977. p. 308-9.
33. Cody DTR. The definition of cholesteatoma. In: McCabe B, Sadé J, Abramson M, editors. Cholesteatoma: First International Conference. Birmingham: Aesculapius Publishing Company; 1977. p. 6-9.
34. Jahrsdoerfer RA, Rafie JJ. Tratamento cirúrgico do colesteatoma. In: Lopes Filho O, Campos CAH, editores. Tratado de Otorrinolaringologia. São Paulo: Roca; 1994. p 763-75.
35. Bernal-Sprekelsen M, Sudhoff H, Hildmann H. Evidence against neonatal aspiration of keratinizing epithelium as a cause of congenital cholesteatoma. Laryngoscope. 2003 Mar;113(3):449-51.
36. Abu-Bakra MAJ. CME Bulletin Otorhinolaryngology Head & Neck Surgery. 2002 Jan; 6(1):36-37.
37. Young N, Chole R. Retraction pocket cholesteatoma. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2002 May; 10(5):355-9.
38. Åberg B, Edstöm S, Johannesson A, Larkö O. Evaluation of epidermal hyperproliferation in patients with cholesteatoma. Am J Otol. 1991 Mar; 12(2):93-6.
39. Lim DJ, Birck HG, Saunders WH. Aural cholesteatoma and epidermization: a fine morphological study. In: McCabe B, Sadé J, Abramson M, editors. Cholesteatoma: First International Conference. Birmingham: Aesculapius Publishing; 1977. p. 233-52.
40. Poe DS, Abou-Halawa A, Abdel-Razek O. Analysis of the dysfunctional eustachian tube by video endoscopy. Otol Neurotol. 2001 Sep; 22(5):590-5.
41. Sadé J. Hyperectasis: the hyperinflated tympanic membrane: the middle ear as an actively controlled system. Otol Neurotol. 2001 Mar; 22(2):133-9.

42. Sadé J. The buffering effect of the middle ear negative pressure by retraction of the pars tensa. *Am J Otol*. 2000 Jan; 21(1):20-3.
43. Chole RA, Faddis BT. Evidence of microbial biofilms in cholesteatomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002 Oct; 128(10):1129-33.
44. Sudhoff H, Bujia J, Borkowski G, Koc C, Holly A, Hildmann H, et al. Basement membrane in middle ear cholesteatoma: immunohistochemical and ultrastructural observations. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1996 Oct; 105(10):804-10.
45. Pereira CSB, Almeida CIR, Vianna MR. Imunoexpressão da citoqueratina 16 e do antígeno nuclear Ki-67 no colesteatoma adquirido da orelha média. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2002 Jul-Ago; 68(4):453-460.
46. Marenda SA, Aufdemorte TB. Localization of cytokines in cholesteatoma tissue. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995 Mar; 112(3):359-68.
47. Bujía J, Kim C, Boyle D, Hammer C, Firestein G, Kastenbauer E. Quantitative analysis of interleukin-1alpha gene expression in middle ear cholesteatoma. *Laryngoscope*. 1996 Feb; 106(2Pt1):217-20.
48. Sastry KVSSR, Sharma SC, Mann SBS, Ganguly NK, Panda NK. Aural cholesteatoma: role of tumor necrosis factor-alpha in bone destruction. *Am J Otol*. 1999 Mar; 20(2):158-61.
49. Yetiser S, Satar B, Aydin N. Expression of epidermal growth factor, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1alpha in chronic otitis media with or without cholesteatoma. *Otol Neurotol*. 2002 Sep; 23(5):647-52.
50. Ottaviani F, Neglia CB, Berti E. Cytokines and adhesion molecules in middle ear cholesteatoma. A role in epithelial growth? *Acta Otolaryngol*. 1999 Jun; 119(4):462-7.

51. Omura F, Makino K, Amatsu M, Itoh H. The role of middle ear effusions and epidermal growth factor in cholesteatoma formation in the gerbil temporal bone. *Eur Arch Otorrhinolaryngol.* 1995 Jul; 252(7):428-32.
52. Park K, Chun YM, Lee DH. Expression of phospholipase C gamma 1 in experimental cholesteatomas using mongolian gerbils. *Acta Otolaryngol.* 2001 Jun;121(4):477-80.
53. Bujia J, Holly A, Antoli-Candela F, Tapia MG, Kastenbauer E. Immunobiological peculiarities of cholesteatoma in children: quantification of epithelial proliferation by MIB 1. *Laryngoscope.* 1996 Jul;106(7):865-8.
54. Banerjee AR, Jones JL, Birchall JP, Powe DG. Localization of matrix metalloproteinase 1 in cholesteatoma and deep meatal skin. *Otol Neurotol.* 2001 Sep;22(5):579-81.
55. Bernal-Sprekelsen M, Ebmayer J, Anonopoulos A, Borkowski G, Sudhoff H. Alterations of the basal membrane in middle ear cholesteatoma. *Acta Otorrhinolaryngol Esp.* 2001 May; 52(4):330-5.
56. Hwang SJ, Kang HJ, Song JJ, Kang JS, Woo JS, Chae SW, et al. Up-regulation of peroxidase proliferator-activated receptor (gamma) in cholesteatoma. *Laryngoscope.* 2006 Jan; 116(1):58-61.
57. Kim CS, Chung JW. Morphologic and biologic changes of experimentally induced cholesteatoma in Mongolian gerbils with anticytoke and lectin study. *Am J Otol.* 1999 Jan; 20(1):13-8.
58. Mallet Y, Nouwen J, Lecomte-Houcke M, Desautly A. Aggressiveness and quantification of epithelial proliferation of middle ear cholesteatoma by MIB 1. *Laryngoscope.* 2003 Feb;113(2):328-31.
59. Miyao M, Shinoda H, Takahashi S. Caspase-3, caspase-8, and Nuclear Factor-[kappa]B expression in human cholesteatoma. *Otol Neurotol.* 2006 Jan;27(1):8-13.

60. Won SC, Jonn JS, Kyu HS, Hyun HJ, Ho HL, Jae SH. Expression patterns of p27<sup>Kip1</sup> and Ki-67 in cholesteatoma epithelium. *Laryngoscope*. 2000 Nov; 110(11):1898-901.
61. Albino AP, Reed JA, Bogdany JK, Sassoon J, Desloge RB, Parisier SC. Expression of p53 protein in human middle ear cholesteatomas. Pathogenetic implications. *Am J Otol*. 1998 Jan;19(1):30-6.
62. Sakamoto T, Kondo K, Yamasoba T, Suzuki M, Sugasawa M, Kaga K. Overexpression of ErbB-2 protein in human middle ear cholesteatomas. *Laryngoscope*. 2004 Nov;114(11):1988-91.
63. Ozturk K, Yildirim Ms, Acar H, Cenik Z, Keles B. Evaluation of c-MYC status in primary acquired cholesteatoma by using fluorescence in situ hybridization technique. *Otol Neurotol*. 2006 Aug;27(5):588-91.
64. Tokuriki M, Noda I, Saito T, Narita N, Sunaga H, Tsuzuki H, et al. Gene expression analysis of human middle ear cholesteatoma using complementary DNA arrays. *Laryngoscope*. 2003 May;113(5):808-14.
65. Schmidt M, Schler G, Gruensfelder P, Hoppe F. Expression of bone morphogenetic protein-2 messenger ribonucleic acid in cholesteatoma fibroblasts. *Otol Neurotol*. 2002 May; 23(3):267-70.
66. Kojima H, Miyazaki H, Shiwa M, Tanaka Y, Moryama H. Molecular biological diagnosis of congenital and acquired cholesteatoma on the basis of differences in telomere length. *Laryngoscope*. 2001 May;111(5):867-73.
67. Watabe-Rudolph M, Rudolph KL, Averbek T, Buhr T, Lenarz T, Stöver T. Telomerase activity, telomere length, and apoptosis: a comparison between acquired cholesteatoma and squamous cell carcinoma. *Otol Neurotol*. 2002 Sep;23(5):793-8.
68. Massuda ET, Oliveira JA. A new experimental model of acquired cholesteatoma. *Laryngoscope*. 2005 Mar;115(3):481-5.

69. Judkins RF, Li H. Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997 Sep; 117(3 Pt 1):263-7.
70. Rahman A, Hultcrantz M, Dirckx J, Margolin G, von Unge M. Fresh tympanic membrane perforations heal without significant loss of strength. *Otol Neurotol.* 2005 Nov; 26(6):1100-6.
71. Hellström S, Salén B, Stenfors LE. Anatomy of the rat middle ear. A study under the dissection microscope. *Acta Anat.* 1982 Apr; 112(4):346-52.
72. Mann W. Experimental tympanosclerosis following infection with *Streptococcus pyogenes* and vitamin D3 intoxication. *Arch Otorhinolaryngol.* 1986 Nov; 243(5):296-303.
73. Kim HJ, Chole RA. Experimental models of aural cholesteatomas in mongolian gerbils. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1998 Feb; 107(2):129-34.
74. Wolfman DE, Chole RA. Experimental retraction pocket cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1986 Nov-Dec; 95(6 Pt 1):639-44.
75. Wright CG, Bird LL, Meyerhoff WL. Tympanic membrane microstructure in experimental cholesteatoma. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1991; 111:101-11.
76. Wright CG, Meyerhoff WL, Burns DK. Middle ear cholesteatoma: an animal model. *Am J Otolaryngol.* 1985 Sep-Oct; 6(5):327-41.
77. Vassalli L, Harris DM, Gradini R, Applebaum EL. Propylene glycol induced cholesteatoma in chinchilla middle ears. *Am J Otolaryngol.* 1988 Jul-Aug; 9(4):180-8.
78. Vassalli L, Harris DM, Gradini R, Applebaum EL. Inflammatory effects of topical antibiotic suspensions containing propylene glycol in chinchilla middle ears. *Am J Otolaryngol.* 1988 Jan-Feb; 9(1):1-5.
79. Huang CC, Shi GS, Yi ZZ. Experimental induction of middle ear cholesteatoma in rats. *Am J Otolaryngol.* 1988 Jul-Aug; 9(4):165-72.

80. Masaki M, Wright CG, Lee DH, Meyerhoff WL. Experimental cholesteatoma: epidermal ingrowth through tympanic membrane following middle ear application of propylene glycol. *Acta Otolaryngol.* 1989 Jul-Aug; 108(1-2):113-21.
81. Fernandez C, Lindsay JR. Aural cholesteatoma: experimental observations. *Laryngoscope.* 1960 Aug; 70:119-41.
82. Hueb MM, Goycoolea MY, Muchow D, Duvall AJ, Paparella MM, Sheridan C. In search of missing links in otology. III. Development of a new animal model for cholesteatoma. *Laryngoscope.* 1993 Jul; 103(7):774-784.
83. Hinohira Y, Gyo K, Yanagihara N. Experimental cholesteatomas arising from autologous free skin grafting in the middle ear cavity. *Acta Otolaryngol.* 1994 Sep; 114(5):533-8.
84. Tanaka Y, Yuichiro Y, Wada K, Kojima H. Creation of a cholesteatoma model using three-dimensional cultured skin equivalents. *Laryngoscope.* 2005 Aug; 115(8):1421-7.
85. Bretlau P, Sørensen CH, Jørgensen MB, Dabelsteen E, Holmstrup P. Experimental studies of cholesteatomas. *In vivo* studies on epithelial-mesenchymal interaction and bone resorption in the immunodeficient “nude” mouse. *Acta Otolaryngol.* 1981 May-Jun; 91(5-6):575-84.
86. Wakaki S, Marumo H, Tomioka K, Shimizu G, Kato E, Kamada H, et al. Isolation of new fractions of antitumor mitomycins. *Antibiot Chemoter.* 1958 May; 8(5):228-40.
87. Ribeiro FAQ, Borges JP, Zacchi FFS, Guaraldo L. O comportamento clínico e histológico da pele do rato submetido ao uso tópico e injetável da Mitomicina C. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003 Feb; 69(2):151-158.
88. Gray SD, Tritle N, Wenhua MS. The effect of mitomycin on extracellular matrix proteins in a rat wound model. *Laryngoscope.* 2003 Feb; 113(2):237-42.
89. D'Eredittá R. Contact diode laser myringotomy and mitomycin C in children. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004 Jun; 130(6):742-6.

90. O'Reilly RC, Goldman SA, Widner SA, Cass SP. Creating a stable tympanic membrane perforation using mitomycin C. *Otolaryngol Head Neck Surgery*. 2001 Jan;124(1):40-5.
91. Mégevand GS, Salmon JF, Scholtz RP, Murray AND. The effect of reducing the exposure time of mitomycin C in glaucoma filtering surgery. *Ophthalmology*. 1995 Jan;102(1):84-9.
92. Kupin TH, Juzych MS, Dong HS, Khatana AK, Olivier MMG. Adjunctive mitomycin C in primary trabeculotomy in phakic eyes. *Am J Ophthalmol*. 1995 Jan;119(1):30-9.
93. Estrem SA, VanLeeuwen RN. Use of mitomycin C for maintaining myringotomy patency. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000 Jan;122(1):8-10.
94. Spector JE, Werkhaven JA, Spector NC, Huang S, Sanders D, Reinich L. Prevention of anterior glottic restenosis in a canine model with mitomycin C. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001 Nov; 110(11):1007-10.
95. Prasad M, Ward RF, April MM, Bent JP, Froelich P. Topical mitomycin as an adjunct to choanal atresia repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002 Apr; 128(4):398-400.
96. Jassir D, Buchman CA, Gomez-Marin O. Safety and efficacy of topical mitomycin C in myringotomy patency. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001 Apr; 124(4):368-73.
97. Yucel OT. Topical use of mitomycin C in laser myringotomy: an experimental study in rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2000 Aug; 54(2-3):93-6.
98. Estrem SA, Baker TJ. Preapplication of mitomycin C for enhanced patency of myringotomy. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000 Mar; 122(3):346-8.
99. Banthia V, Selesnick SH. Mitomycin C in the postsurgical ear canal. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003 Jun;128(6):882-6.
100. Babu SC, Kartush JM, Patni A. Otologic effects of topical mitomycin C: phase I evaluation of ototoxicity. *Otol Neurotol*. 2005 Mar; 26(2):140-4.

101. Jassir D, Odabasi O, Gomez-Marin O, Buchman C. Dose-response relationship of topically applied mitomycin C for the prevention of laser myringotomy closure. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 Nov; 129(5):471-4.
102. Huang TS. Topical mitomycin C and cephalosporin in endolymphatic sac surgery. *Laryngoscope.* 2002 Feb; 112(2):243-7.
103. Bradner WT. Mitomycin C: a clinical update. *Cancer Treat Rev.* 2001 Feb; 27(1):35-50.
104. Dobrowsky W, Naude J. Continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy with\without mitomycin C in head and neck cancers. *Radiother Oncol.* 2000 Nov; 57(2):119-24.
105. Beaujard AC, Glehen O, Caillot JL, François Y, Bienvenu J, Panteix G, et al. Intraperitoneal chemohyperthermia with mitomycin C for digestive tract cancer patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer.* 2000 Jun; 88(11):2512-9.
106. Matsumoto K, Konno H, Tanaka T, Baba M, Kanai T, Kamiya K, et al. Combined therapy with vascular endothelial growth factor neutralizing antibody and mitomycin C on human gastric cancer xenograft. *Jpn J Cancer Res.* 2000 Jul;91(7):748-5.
107. Garrett Cg, Soto J, Riddick J, Billante CK, Reinisch L. Effect of mitomycin C on vocal fold healing in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2001 Jan;110(1):25-30.
108. Çankaya H, Egeli E, Kuntsal L, Ozbek H, İçli M. Effects of topical mitomycin on inner ear: a light and electron microscopic study. *Tohoku J Exp Med.* 2002 Jun;197(2):81-6.
109. Jewett BS, Prazma JP, Hunter SE, Rose AS, Clark JM, Sartor BR, et al. Systemic reactivation of otitis media with effusion in a rat model. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999 Jul; 121(1):7-12.
110. Ikeda K, Morizono T, Juhn SK. Cochleotoxicity of otic drops in the chinchilla: comparative study of bestron e cortisporin. *Am J Otol.* 1991 Nov;12(6):429-34.

111. Larsson C, Von Unge M, Bagger-Sjöbäck D. Tympanic membrane changes in experimental cholesteatoma in the gerbil. *Am J Otol.* 1999 May; 20(3):309-16.
112. Masaki M, Wright CG, Lee DH, Meyerhoff WL. Effects of otic drops on chinchilla tympanic membrane. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1988 Sep;114(9):1007-11.
113. Palva T, Johnson LG. Findings in a pair of temporal bones from a patient with secretory otitis media and chronic middle ear infection. *Acta Otolaryngol.* 1984 Sep-Oct; 98(3-4):208-20.
114. Santos PF, Leal MC, Peixoto C, Caldas Neto S, Rosas STP. Otomicroscopic and histologic findings of induced myringosclerosis in rats: a critical study of an experimental model. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005 Sep-Oct; 71(5):668-74.
115. Hessling SC, Van Blitterswijk CA, Lim DJ, DeMaria TF, Bakaletz LO, Grote J. Effect of endotoxin on cultured rat middle ear epithelium, rat meatal epidermis and human keratinocytes. *Am J Otol.* 1994 Nov; 15(6):762-8.
116. Grote JJ, Hessling SC, Koopman JP. Effect of endotoxin on the advancing front between cultured middle ear mucosa and epidermis. A preliminary study. *Acta Otolaryngol.* 1995 Mar;115(2):286-90.
117. Vennix PP, Kuijpers W, Peters TA, Tonnaer EL, Ramaekers FC. Growth and differentiation of meatal skin grafts in the middle ear of the rat. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994 Oct; 120(10):1102-11.
118. Jove MA, Vassalli L, Raslan W, Applebaum EL. The effect of isotretinoin on propylene glycol-induced cholesteatoma in chinchilla middle ears. *Am J Otolaryngol.* 1990 Jan-Feb; 11(1):5-9.
119. Williams TC, Sneller MC. Complications of corticosteroid therapy. *Eur Arch Otolaryngol.* 1994; 251:131-6.

120. Jeong JH, Park CW, Tac K, Lee SH, Shin DH, Kim KR, et al. Expression of RANKL and OPG in middle ear cholesteatoma tissue. *Laryngoscope*. 2006 Jul; 116(7):1180-4.
121. Sudhoff H, Liebehenz Y, Aschenbrenner J, Jung J, Hildmann H, Dazert S. A murine model of cholesteatoma-induced bone resorption using autologous dermal implantation. *Laryngoscope*. 2003 Jun;113(6):1022-6.
122. Hamzei M, Ventriglia G, Hagnia M, Antonopoulos A, Bernal-Sprekelsen M, Dazert S, et al. Osteoclast stimulating and differentiating factors in human cholesteatoma. *Laryngoscope*. 2003 Mar; 113(3):436-42.
123. Cinamon U, Kronenberg J, Benayahu D. Structural changes and protein expression in the mastoid bone adjacent to cholesteatoma. *Laryngoscope*. 2000 Jul; 110(7):1198-203.
124. Jung J, Pashia ME, Nishimoto SY, Faddis BT, Chole RA. A possible role for nitric oxide in osteoclastogenesis associated with cholesteatoma. *Otol Neurotol*. 2004 Sep; 25(5):661-8.
125. Cayé-Thomasen P, Hermansson A, Tos M, Prellner K. Bone modeling dynamics in acute otitis media. *Laryngoscope*. 1999 May;109(5):723-9.
126. Sudhoff H, Dazert S, Gonzales AM, Borkowski G, Park SY, Baird A, et al. Angiogenesis and angiogenic growth factors in middle ear cholesteatoma. *Am J Otol*. 2000 Nov; 21(6):793-8.
127. Kuijpers W, Vennix PP, Peters TA, Ramaekers FC. Squamous metaplasia of the middle ear epithelium. *Acta Otolaryngol*. 1996 Mar;116(2):293-8.

**ANEXOS**

## Anexo 1

**Comitê de Ética em Pesquisa**

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



Ofício nº 59/06

Recife, 16 de outubro de 2006

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE  
Para: **Dr. Antonio Antunes Melo**  
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia – UFPE  
Processo nº 018055/2006-91

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 “EFEITO DA APLICAÇÃO DE MITOMICINA CINTRATIMPÂNICA NO DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL DE COLESTEATOMA”.

Concluímos 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. Silene Carneiro do Nascimento  
 Presidente CEEA

Anexo 2

## Resultados quantitativos dos grupos controle e experimental (exsudato, colesteatoma e fibrose)

| Rato | Exsudato | Colesteatoma | Fibrose  |
|------|----------|--------------|----------|
| 6D   | Presente | Presente     | Presente |
| 6E   | Presente | Presente     | Presente |
| 7D   | Ausente  | Ausente      | Ausente  |
| 7E   | Ausente  | Presente     | Presente |
| 9D   | Presente | Ausente      | Presente |
| 9E   | Presente | Presente     | Presente |
| 11D  | Ausente  | Presente     | Presente |
| 11E  | Presente | Presente     | Presente |
| 14D  | Ausente  | Ausente      | Ausente  |
| 14E  | Ausente  | Presente     | Presente |
| 15D  | Ausente  | Presente     | Presente |
| 15E  | Ausente  | Ausente      | Ausente  |
| 16D  | Ausente  | Ausente      | Presente |
| 16E  | Presente | Presente     | Presente |
| 18D  | Ausente  | Presente     | Ausente  |
| 18E  | Presente | Presente     | Presente |
| 20D  | Presente | Presente     | Presente |
| 20E  | Presente | Presente     | Presente |
| 21D  | Ausente  | Presente     | Presente |
| 21E  | Presente | Presente     | Presente |
| 24D  | Ausente  | Presente     | Presente |
| 24E  | Ausente  | Ausente      | Ausente  |

D=grupo controle

E=grupo experimental

| Grupo                          | Exsudato | Colesteatoma | Fibrose |
|--------------------------------|----------|--------------|---------|
| Controle (Orelha direita)      | 3        | 7            | 8       |
| Experimental (Orelha esquerda) | 7        | 9            | 9       |

Anexo 3 **Resultados quantitativos dos grupos controle e experimental (espessura da mucosa da bula timpânica e da membrana timpânica)**

Espessura da mucosa da bula timpânica (em micrômetros).

| <b>Rato</b> | <b>Orelha Direita</b> | <b>Orelha Esquerda</b> |
|-------------|-----------------------|------------------------|
| 6           | 6,46                  | 218,06                 |
| 7           | 16,34                 | 134,43                 |
| 9           | -                     | 408,21                 |
| 11          | 21,74                 | 261,41                 |
| 14          | -                     | 139,84                 |
| 15          | 11,80                 | 29,45                  |
| 16          | 47,92                 | 245,49                 |
| 18          | 25,72                 | 146,11                 |
| 20          | 85,41                 | 564,94                 |
| 21          | 14,37                 | 152,30                 |
| 24          | 14,58                 | 97,97                  |

Espessura da membrana timpânica (em micrômetros).

| <b>Rato</b> | <b>Orelha Direita</b> | <b>Orelha Esquerda</b> |
|-------------|-----------------------|------------------------|
| 6           | 21,40                 | 11,80                  |
| 7           | 7,98                  | 8,48                   |
| 9           | -                     | 15,14                  |
| 11          | 5,07                  | 7,00                   |
| 14          | -                     | -                      |
| 15          | 9,20                  | -                      |
| 16          | 24,14                 | 29,38                  |
| 18          | 7,87                  | 15,98                  |
| 20          | 5,82                  | 17,33                  |
| 21          | 9,28                  | -                      |
| 24          | 11,82                 | -                      |

Anexo 4

## Normatização

Esta tese está de acordo com:

*International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

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

**International Committee of Medical Journal Editors  
Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to  
Biomedical Journals: Sample References**

*Updated February 2006*

**Last reviewed:** 22 May 2007

**Last updated:** 25 April 2007

**First published:** 09 July 2003

**Metadata | Permanence level:** Permanent: Dynamic Content

Copyright, Privacy, Accessibility

U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894

National Institutes of Health, Health & Human Services

[www.icmje.org/](http://www.icmje.org/)

[www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)