

ÂNGELA DE FÁTIMA VILLAS ALCOFORADO

**EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÁCIDO LINOLEICO NO FECHAMENTO DE  
PERFURAÇÃO TIMPÂNICA TRAUMÁTICA: estudo experimental em ratos**

Recife

2006

ÂNGELA DE FÁTIMA VILLAS ALCOFORADO

**EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÁCIDO LINOLEICO NO FECHAMENTO DE  
PERFURAÇÃO TIMPÂNICA TRAUMÁTICA: estudo experimental em ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em cirurgia.

**Área de concentração:** Cirurgia

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

Recife

2006

Ficha catalográfica elaborada pela  
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4 1790

A354e Alcoforado, Ângela de Fátima Villas  
Efeito da aplicação tópica de ácido linoleico no fechamento de perfuração timpânica traumática: estudo experimental em ratos/ Ângela de Fátima Villas Alcoforado. – 2006.  
44 f.: il.; tab.

Orientador: Sílvio da Silva Caldas Neto.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2006.  
Inclui referências e anexos.

1. Perfuração da Membrana Timpânica. 2. Ácido Linoleico. 3. Cicatrização. 4. Ratos Wistar. I. Caldas Neto, Sílvio da Silva (Orientador). II. Título.

617.91

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2019-100)

ÂNGELA DE FÁTIMA VILLAS ALCOFORADO

**EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÁCIDO LINOLEICO NO FECHAMENTO DE  
PERFURAÇÃO TIMPÂNICA TRAUMÁTICA: estudo experimental em ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em cirurgia.

Aprovada em: 29/12/2006.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana de Carvalho Leal (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Frederico Teixeira Brandt (Examinador Interno)  
Universidade de Pernambuco

---

Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima (Examinador Interno)  
Universidade de Pernambuco

Ao meu pai **João** (*in memoriam*), a quem devo todas as minhas conquistas.

A minha mãe **Lourdes**, o que tenho de mais precioso, por todo amor que sempre me dedicou.

Ao meu bem querer **Zoca**, que sempre me apóia, incentiva e ampara em todos os momentos.

A minha prima e irmã **Lila**, que sempre me dá a mão incondicionalmente.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar saúde e força e por ter conseguido realizar mais este sonho.

Ao meu querido orientador, **Prof. Dr. Silvio Caldas**, por todo apoio e dedicação, amizade e carinho. Sem ele, este trabalho não teria o mesmo valor.

Ao mestre **Prof. Dr. Nelson Caldas**, exemplo maior da otorrinolaringologia.

A minha querida amiga **Dr<sup>a</sup>. Mariana Leal Gouveia**, por sua valiosa colaboração, sempre disponível e carinhosa.

Ao meu amigo **Dr. Geraldo Rommel**, que nesses dois anos e meio esteve lado a lado na realização do trabalho.

A **Dr<sup>a</sup>. Ângela Pinto Duarte**, que me incentivou durante todo o tempo para a realização da pós-graduação.

A **Dr<sup>a</sup>. Fabiana Sperandio**, pelo estímulo, conselhos e torça.

Ao **Dr. Enoque Godoy**, meu primeiro professor na graduação, hoje meu amigo, por sempre ter acreditado em mim.

Ao **Prof. Sílvio Marques**, por sua valiosa contribuição na realização desse trabalho.

Aos que fazem o núcleo de cirurgia experimental da UFPE. Ao coordenador **Dr. Antônio Roberto de Barros Coelho**, aos veterinários **José Joaquim Alves da Silva** e em especial **Adriana Cruz**, e todos os funcionários que com muita dedicação possibilitaram as condições necessárias à realização deste trabalho, atenuando sempre que possível o sofrimento dos animais de experimentação.

A **Silvania Paz**, pela contribuição e dedicação na realização da análise histopatológica.

A **Carlos Luna**, pela ajuda na análise estatística.

A **Jorge Luiz**, pelo cuidadoso e excelente trabalho na realização das fotografias e por sua disponibilidade.

A **Niege de Paiva Melo**, pela disposição que sempre teve para me ajudar, sempre que solicitada.

Agradeço a minha família, em especial **Manu, Lindinho, Léo, Joãozinho, tio Lula (tia Lúgia, Lula), Teca, Bel (Iléna, Paulo, Carol), Andréa e Breno**.

## RESUMO

A perfuração da membrana é uma situação muito freqüentemente encontrada na prática clínica diária do otorrinolaringologista. Em alguns casos, principalmente naqueles causados por agressões térmicas ou infecções, os mecanismos de fechamento da perfuração podem falhar, dando origem a perfurações crônicas estáveis e isso tem justificado alguns estudos feitos com a intenção de demonstrar o efeito benéfico da aplicação tópica de substâncias sobre o processo de cicatrização de perfurações timpânicas. Inúmeros mediadores pró-inflamatórios são sintetizados e liberados no local de uma lesão tecidual, atuando para o restabelecimento da integridade morfofuncional do tecido. Entre essas substâncias estão as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, que são derivados do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo poliinsaturado derivado, por sua vez do ácido linoleico (AL). Trabalhos mostraram que a administração de certos tipos de ácidos graxos, particularmente o AL podem incrementar as reações teciduais envolvidas nos processos de cicatrização de feridas em animais e humanos. Como a perfuração da MT é de fato uma ferida, é de se esperar que as respostas teciduais ocorram sob influência dos mesmos mediadores envolvidos em uma ferida comum. Dessa forma, este trabalho foi desenvolvido com a intenção de demonstrar o efeito da aplicação tópica de um ácido graxo, o AL, no índice e na velocidade de fechamento de perfurações traumáticas realizadas em ratos. O presente trabalho foi realizado no Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE. Trata-se de um estudo experimental, analítico e prospectivo. Vinte ratos Wistar foram submetidos a perfurações traumáticas da MT nas orelhas direitas (OD) e orelhas esquerdas (OE), sendo aplicado AL a 100% nas perfurações da OD e a OE foi utilizada como controle. Os animais foram avaliados otomicroscopicamente do 7º ao 16º dias e analisados estatisticamente quanto ao desfecho da lesão. Três animais foram a óbito durante o período de observação, restando 17 para análise final. Os percentuais de fechamento da lesão, embora tenham aumentado significativamente até o 16º dia, não diferiram entre os grupos tratamento e controle em nenhum dos dias observados (7º, 9º, 12º, 14º e 16º). Desta forma, não houve evidência estatisticamente significativa de que o ácido linoleico interfira no índice e na velocidade de cicatrização da perfuração timpânica.

Palavras-chave: Perfuração da Membrana Timpânica. Ácido Linoleico. Cicatrização.  
Ratos Wistar.

## ABSTRACT

Perforation of the tympanic membrane (TM) is a situation frequently encountered in daily otorhinolaryngology practice. In some cases, especially those caused by thermal aggression or infections, the mechanisms of closure of the perforation may fail, with the consequent occurrence of stable chronic perforations. This has led to studies carried out in order to demonstrate the beneficial effect of topical application of substances to the healing process of tympanic perforations. Large numbers of pro-inflammatory mediators are synthesized and released at the site of a tissue lesion, where they act in order to reestablish the morphofunctional integrity of the tissue. Among these substances are the prostaglandins, leukotrienes and thromboxanes, which are derivatives of arachidonic acid, a polyunsaturated fatty acid which in turn derives from linoleic acid (LA). Several studies have shown that the administration of certain types of fatty acids, LA in particular, can increase the tissue reactions involved in the wound healing process in animals and humans. Since TM perforation is actually a wound, tissue responses are expected to occur under the influence of the same mediators involved in the healing of a common wound. On this basis, the objective of the present study was to demonstrate the effect of topical application of a fatty acid, LA, on the extent and rate of closure of traumatic perforations induced in rats. This was an experimental analytical and prospective study carried out at the Nucleus of Experimental surgery of UFPE. Twenty Wistar rats were submitted to traumatic perforation of the TM in the right (RE) and in the left (LE) ear and 100% LA was applied to the RE, with the LE being used as control. The animals were evaluated by otomicroscopy from the 7th to the 16th day and data regarding lesion outcome were analyzed statistically. Three animals died during the observation period, with 17 rats being left for final analysis. The percentage of lesion closure, although increasing significantly up to the 16th day, did not differ between the treated and control groups on any of the days observed (7th, 9th, 12th, 14th, and 16th). Thus, there was no statistically significant evidence that LA affects the extent and rate of healing of tympanic perforations.

Keywords: Tympanic Membrane. Linoleic Acid. Wound Healing. Rats Wistar.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Ratos wistar .....	30
Figura 2 –	Instrumentos para miringotomia: espéculo de ouvido, microgancho, ponta de aspirador, microestiliete com ponta reta .....	30
Gráfico 1 –	Percentual de fechamento das perfurações do 7 <sup>o</sup> ao 16 <sup>o</sup> dia de coleta no grupo tratamento (OD) e grupo controle (OE) .....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição dos animais do 7° ao 16° dia de coleta quanto ao desfecho da lesão (fechamento ou não fechamento)	
	.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AGE	Ácidos graxos essenciais
AGPI	Ácidos graxos polinsaturados
AL	Ácido linoleico
CAE	Conduto auditivo externo
<i>et alii.</i>	e outros
FCDP	Fator de crescimento derivado das plaquetas
FCE	Fator de crescimento epidérmico
FCF	Fator de crescimento de fibroblastos
MT	Membrana timpânica
OM	Orelha média
ORL	Otorrinolaringológica
PGE1	Prostaglandina E1
PGE2	Prostaglandina E2
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta

## LISTA DE SÍMBOLOS

=	igual
°c	graus Celsius
µm	micrometro
g	grama
h	hora
mm	milímetro
ml	mililitros
s	segundo
%	por cento

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Local de Estudo .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Desenho de Estudo .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>Período de Referência .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>População de Estudo .....</b>	<b>28</b>
<b>4.5</b>	<b>Método .....</b>	<b>28</b>
<b>4.6</b>	<b>Análise Estatística .....</b>	<b>29</b>
<b>4.7</b>	<b>Considerações Éticas .....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFPE .....</b>	<b>42</b>
	<b>ANEXO B – AVALIAÇÃO OTOMICROSCÓPICA .....</b>	<b>43</b>
	<b>ANEXO C – NORMAS ADOTADAS PARA DISSERTAÇÃO .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A membrana timpânica (MT) é uma estrutura extremamente delicada, situada no fundo do conduto auditivo externo (CAE), que tem por funções isolar e proteger a orelha média (OM) e transmitir, à cadeia ossicular e à orelha interna, a energia sonora. Três camadas formam, tanto no humano como em diversos animais, a estrutura histológica da MT: uma camada externa, de epitélio escamoso queratinizado, uma interna de epitélio mucoso pavimentar e, entre as duas, uma camada intermediária de tecido conectivo contendo fibrócitos e fibras colágenas radiais e circulares. Para manter as propriedades biomecânicas da MT, as células da camada externa, à medida que vão-se reproduzindo e amadurecendo, realizam um movimento migratório centrífugo a partir do manúbrio e, particularmente, do umbo do martelo em direção à periferia da membrana e, em seguida, em direção ao meato acústico externo, por onde são eliminadas por descamação.

Uma situação muito freqüentemente encontrada na prática clínica diária do otorrinolaringologista é a perfuração desta membrana, com interrupção da continuidade das três camadas, que pode ser causada por trauma direto por objetos introduzidos no conduto auditivo externo (CAE), barotrauma ou por infecção. Tendo a MT uma enorme capacidade de se regenerar, essas perfurações costumam fechar espontaneamente ao cabo de alguns dias na grande maioria dos casos.<sup>1</sup> Entretanto, em alguns poucos casos, principalmente, naqueles causados por agressões térmicas ou infecções, os mecanismos de fechamento da perfuração pode falhar, dando origem a perfurações crônicas estáveis<sup>13</sup> e isso tem justificado alguns estudos feitos com a intenção de demonstrar o efeito benéfico da aplicação tópica de algumas substâncias sobre o processo de cicatrização de perfurações timpânicas.<sup>2-4</sup>

A seqüência de eventos patológicos envolvidos no processo de cicatrização das feridas tem sido extensamente estudada desde a primeira metade do século XX. Esse processo se desenvolve em estágios bem definidos, porém, em parte, superpostos, incluindo inflamação, migração celular, angiogênese, síntese de matriz extracelular, contração e re-epitelização,<sup>5,6</sup> eventos estes que acontecem em três fases fundamentais: inflamatória, proliferativa e de remodelamento.<sup>7</sup>

Inúmeros mediadores pró-inflamatórios são sintetizados e liberados no local de uma lesão tecidual,<sup>5-16</sup> atuando seja na proliferação seja na migração de determinados tipos celulares, que concorrem para a fagocitose de elementos

estranhos e limpeza da ferida, bem como para o restabelecimento da integridade morfofuncional do tecido. Entre essas substâncias, estão as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, que são derivados do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo poliinsaturado derivado, por sua vez do ácido linoleico (AL).

Ácidos graxos são compostos orgânicos presentes nas membranas celulares, constituintes dos fosfolípidios,<sup>17</sup> e são precursores de alguns desses mediadores,<sup>5,6,9-12,15-18</sup> tendo sido conduzidos alguns trabalhos que mostraram que a administração de certos tipos de ácidos graxos, particularmente, o AL, podem incrementar as reações teciduais envolvidas nos processos de cicatrização de feridas em animais e em humanos.<sup>5,14,19-21</sup>

Como a MT é de fato uma ferida, envolvendo dois tipos de epitélio - mucoso e escamoso - e tecido conectivo (da camada intermediária) é de se esperar que as respostas teciduais ocorram sob influência dos mesmos mediadores envolvidos em uma ferida comum. Dessa forma, este trabalho foi desenvolvido com a intenção de demonstrar o efeito da aplicação tópica de um ácido graxo, o AL, no índice e na velocidade de fechamento de perfurações traumáticas realizadas em ratos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar o efeito da aplicação tópica de ácido linoleico a 100% sobre o processo de cicatrização de perfuração timpânica traumática em ratos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Comparar o índice e a velocidade de fechamento de perfurações timpânicas traumáticas em ratos tratadas com aplicação tópica de ácido linoleico a 100%, com os de perfurações não tratadas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

A história da atuação médica sobre o processo cicatricial de feridas cutâneas evoluiu em quatro fases. Na primeira fase, que se estendeu pelos primeiros séculos da Era Cristã, era de expectativa e interferência mínima; a segunda fase, evidente na Idade Média, caracterizou-se por atitudes agressivas, como aplicação de óleo fervente ou metais incandescentes, e pela crença de que a secreção purulenta era benéfica para a cicatrização; na terceira fase, iniciada na segunda metade do século XIV, valorizava-se a limpeza da ferida e a aproximação dos bordos, nascendo os conceitos de assepsia e anti-sepsia; e, finalmente, na quarta época, a partir do início de século XX, com o avanço dos conhecimentos sobre metabologia cirúrgica, bioquímica e nutrição, passou-se a tentar intervir na biologia molecular e na síntese de proteínas envolvidas nos processos inflamatórios e cicatriciais.<sup>5,6</sup>

Definiu-se, nesta fase, que a cicatrização é um evento biológico complexo que envolve inflamação, quimiotaxia e migração, proliferação e diferenciação celular, síntese de matriz extracelular, angiogênese, contração, remodelação tecidual e re-epitelização<sup>6</sup>, desenrolando-se em três fases: inflamatória, onde há invasão da área lesada por células de resposta imunológica; proliferativa, em que ocorre síntese e deposição de componentes da matriz extracelular; e fase de remodelação, quando ocorre reestruturação da matriz e restabelecimento da função tissular.<sup>7</sup>

No início do processo, a derme é pouco envolvida e o tecido subdérmico reage mais forte e precocemente. A lesão do tecido ativa uma cascata de resposta imune, desencadeando uma reação inflamatória que requer interações complexas ente uma grande variedade de células. A área danificada é preenchida por um coágulo contendo plaquetas (liberam importantes fatores para a regulação e manutenção de vários eventos fundamentais ao processo inflamatório/cicatricial), plasma, fatores sub-endoteliais, neutrófilos, e monócitos (esses dois últimos, atraídos pela quimiotaxia exercida por fatores liberados pelas células teciduais lesadas). Nesse material, proliferam fibroblastos, principais responsáveis pela deposição da matriz, e células endoteliais, envolvidas na angiogênese. Os miofibroblastos surgem nas etapas finais do processo, sendo os responsáveis pela contração da ferida, que contribui para a aproximação dos bordos.<sup>5,6,22</sup>

A re-epitelização ocorre com o avanço do epitélio sobre o tecido de granulação criado por essas reações subdérmicas, que serve de suporte para a proliferação das

células mais superficiais.<sup>22</sup>

Vários fatores, exógenos ou endógenos, podem influenciar negativamente na eficiência do processo cicatricial, tais como mau estado nutricional e imunológico, doenças como diabetes e insuficiências orgânicas, níveis séricos e teciduais baixos de zinco, vitaminas A, C, E e de complexo B, utilização de drogas como anti-inflamatórios (hormonais ou não hormonais), imunossupressores ou quimioterápicos, infecção local, corpos estranhos, presença de tecidos desvitalizados, entre outros.<sup>23</sup>

Por outro lado, inúmeras substâncias são sintetizadas e liberadas por diversos tipos de células no local da lesão, os mediadores da inflamação, que são responsáveis pela modulação e regulação dos fenômenos biológicos que ocorrem durante o processo de inflamação e cicatrização, como migração, transmigração e proliferação celular. Entre esses fatores, estão o fator de crescimento epidérmico (FCE), fator de transformação do crescimento-beta (TGF-B), fator de crescimento derivado das plaquetas (FCDP), fator de crescimento de fibroblastos (FCF), prostaglandinas, tromboxanos, entre outros.<sup>6-9</sup>

Os ácidos graxos são ácidos orgânicos com dois a 24 átomos de carbono, um grupo carboxila único e uma cauda hidrocarbonada não polar que lhes confere, assim como a todos os lipídios, a sua natureza oleosa e gordurosa, insolúvel em água.<sup>17</sup> Nos tecidos dos mamíferos, existem quatro famílias de ácidos graxos: são as famílias dos ácidos palmítico, esteárico, linolênico e linoleico. Desses ácidos derivam outros compostos por meio de dessaturação que são classificados como ácidos graxos poliinsaturados (AGPI). As duas primeiras famílias podem ser sintetizadas endogenamente, enquanto que as duas últimas (ácidos linolênico e linoleico) necessitam ser obtidas na dieta, sendo esses ácidos conhecidos como ácidos graxos essenciais (AGE).<sup>17,24</sup> Essas duas famílias são também conhecidas como n-3 e n-6 respectivamente, sendo essa diferenciação determinada pela distância entre o radical metila terminal e a primeira dupla ligação da molécula. Os principais representantes da família n-3 são o próprio ácido linolênico e seu derivados ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenoico, enquanto que a família n-6 é principalmente representada pelo AL e pelo produto da sua conversão, o ácido araquidônico (AA). Essa conversão é feita via ácido linolênico e ácido dihomo-linolênico.<sup>24</sup>

Os AGPI são os maiores componentes dos lipídios estruturais das membranas celulares e, embora sejam também usados em geral pelo organismo como fontes

energéticas, exercem ali um papel fundamental na estabilidade, fluidez e integridade dessas membranas.<sup>5,17-24</sup>

A dieta do homem ocidental moderno é rica em ácidos graxos da família n-6, portanto, em AL, e pobre em n-3.<sup>15</sup> O AL está presente em grande quantidade na maioria dos óleos vegetais, sendo o óleo da semente girassol um dos mais ricos nesse tipo de AGE.<sup>17</sup>

O AA é um importante precursor, por ação da enzima ciclooxigenase, de eicosanóides, que incluem diversos compostos de 20 átomos de carbono, entre os quais as prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e outros ácidos graxos hidroxilados.<sup>6,15-18</sup>

Segundo Van Dorp<sup>18</sup>, o interesse pela ação dos AGE na integridade morfofuncional dos tecidos, bem como sobre o processo inflamatório surgiu na primeira metade do século XX, quando foram relatadas várias alterações em ratos alimentados com dieta sem gorduras, como retardo de crescimento, descamação acentuada da pele dos pés e da cauda, aumento importante da permeabilidade da pele à água e esterilidade, sendo esses efeitos totalmente eliminados quando se adicionavam certos ácidos graxos na dieta.

Apesar de os primeiros trabalhos sobre o assunto demonstrarem controvérsia e incerteza a respeito da ação das gorduras sobre a integridade morfofuncional dos tecidos,<sup>25</sup> inúmeros trabalhos foram depois conduzidos confirmando essas e outras ações dos AGE ou de seus derivados.

Um trabalho feito com 184 ratos alimentados com dieta livre de gorduras mostrou que a privação de gordura na dieta causou as alterações anteriormente comentadas. No estudo em questão, a adição de AA na dieta foi mais eficaz do que o AL na normalização da taxa de crescimento e na cura da descamação epidérmica.<sup>26</sup>

Autores induziram hiperpermeabilidade cutânea em ratos por meio de dieta desprovida de AGE. Depois, corrigiram rapidamente essa alteração na função de barreira por meio da aplicação tópica de óleo de semente de girassol.<sup>27</sup>

No mesmo ano, esse mesmo grupo de pesquisadores comparou, no mesmo modelo experimental, a ação de diversos ácidos graxos, mostrando que apenas os ácidos linolênico e linoleico (ambos da família n-6) foram eficazes na redução da perda de água pela pele dos animais e que isso ocorria já após quatro dias de aplicação tópica.<sup>28</sup>

No ano seguinte, demonstrou que o AL atua na permeabilidade cutânea, mas não na descamação epidérmica (ambos, sintomas da privação de gordura na dieta). O efeito sobre a propriedade de barreira esteve presente mesmo quando a síntese de prostaglandinas era inibida pela administração de prostaglandinas, demonstrando um efeito direto do AL sobre a integridade da pele.<sup>19</sup>

Outros dados interessantes podem ser tirados desse último estudo. Foi demonstrado que o AL, quando aplicado topicamente, não tem nenhum efeito sobre os níveis de AA na lecitina da pele. E, quando aplicado por via intraperitoneal, também repara a função de barreira, mas, assim como no tratamento tópico, não produz nenhum efeito na descamação. Já o AA, administrado intraperitonealmente, rapidamente corrigiu a descamação, mas não reduziu a permeabilidade cutânea. Foi também feita aplicação tópica diária de prostaglandinas E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> (PGE<sub>1</sub> e PGE<sub>2</sub>) na pele dos ratos deficientes em AGE, sem que nenhum efeito sobre a permeabilidade cutânea fosse observado. Desse importante trabalho, depreende-se que, apesar de serem intimamente relacionados, o AL e o AA têm funções distintas, o AL tem papel na integridade da barreira cutânea e o AA, na homeostase da pele e que parece haver um pré-requisito natural para o AL na pele do rato pelo qual a função de barreira é mantida ou restaurada, ficando, assim, evidente que a função de barreira promovida pelo AL não envolve a sua conversão a AA ou prostaglandinas. Finalmente, uma vez que o AL não elevou os níveis de AA na pele, postula-se que o AL tópico só é convertido em AA após ser absorvido pela corrente sanguínea e que, só depois disso, este voltaria, em pequenas concentrações, para a pele e que isso poderia explicar porque a aplicação tópica de AL não apresenta os mesmos efeitos obtidos com o AA na descamação epidérmica.<sup>19</sup>

Ainda com relação à ação da PGE<sub>2</sub> no comportamento biológico da pele, em um trabalho anterior, Ziboh e Hsia<sup>29</sup> aplicaram topicamente esta prostaglandina na pele de ratos deficientes em AGE e, após duas semanas, lograram curar a descamação epidérmica, mas não houve alteração da composição dos ácidos graxos na pele dos animais. Já a injeção intraperitoneal dessa substância não causou nenhum efeito apreciável nas lesões descamativas.

A ação da peroxidação dos AGPI sobre componentes do sistema imune e sobre a fluidez da membrana celular foi demonstrada em dois experimentos com tecidos cultivados.<sup>13</sup>

Foi demonstrado que dois metabólitos do AL, os ácidos 9-hidroxi-octadecadienóico e 13-hidroxi-octadecadienóico são produzidos sob a ação do FCE e estão envolvidos na indução da síntese de DNA em fibroblastos de camundongo e, concluem, portanto, o AL deve ser considerado como um fator importante para a mitogênese nos fibroblastos, desde que estimulado pelo FCE.<sup>12</sup> Um outro estudo anterior já havia evidenciado que o FCE estimula células do camundongo a liberar e converter o AA a metabólitos (prostaglandinas) que atuam como importantes mediadores intracelulares da mitogênese e que, além disso, esses metabólitos potencializam a síntese de DNA induzida pelo FCE.<sup>9</sup>

Não evidenciou uma grande resposta inflamatória, com forte acúmulo de polimorfonucleares e macrófagos, no subcutâneo de ratos, induzida pela injeção de ácido 9-hidroxi-octadecadienóico, mas o mesmo efeito não foi obtido com a injeção de AL, inferindo os autores que parece não haver conversão de AL exógeno a este metabólito.<sup>11</sup>

Definidas essas propriedades dos AGE, outras pesquisas foram conduzidas estudando o valor desses compostos ou de seus metabólitos no processo de cicatrização das feridas. Autores como Hartop e Prottey<sup>28</sup>, sugeriam que o AL melhorava a quimiotaxia dos polimorfonucleares após uma lesão tecidual e outros trabalhos<sup>8</sup> demonstraram uma associação entre a produção de PGE2 e a modulação da proliferação de queratinócitos em cultura. Mas foi a partir da década de 1990 que tais estudos passaram a proliferar. Em trabalho de revisão, comentam que as plaquetas liberam, no local de uma lesão tecidual, fatores que atuam na transformação do AL em AA, precursor, como já foi referido, das prostaglandinas e tromboxanos, importantes mediadores da resposta inflamatória.<sup>6</sup>

Em um trabalho realizado em 1999, produziram-se feridas em tecido epitelial intestinal de ratos cultivado e perceberam uma maior migração celular quando se adicionava vários ácidos graxos das famílias n-3 (eicosapentaenóico e linolênico) e n-6 (linoleico, linolênico e araquidônico) no meio de cultura, mostrando que os AGPI dessas famílias são capazes de estimular *in vitro* o crescimento de células epiteliais.<sup>14</sup>

Além do crescimento celular, outros eventos durante a cicatrização de feridas, como angiogênese e síntese de matriz celular, sofreram a influência da aplicação tópica de PGE2, melhorando o fechamento de feridas em tecido cultivado de vias aéreas, efeito este inibido pela introdução de indometacina (inibidor da ciclooxigenase) no meio de cultura.<sup>16</sup>

Autores compararam o comportamento evolutivo da ferida de pele de 96 camundongos divididos em quatro grupos tratados, cada um, com aplicação tópica de: AL, ácido oléico, ácido linolênico e veículo (grupo controle). Os animais tratados com AL e ácido oléico apresentaram uma cicatrização significativamente mais rápida do que os outros grupos. Os autores comentam que a liberação de mediadores do AA representa um passo crucial no início do processo cicatricial e no reparo do tecido e que o prolongamento da fase inflamatória pode resultar em atraso no tempo de reparo final do tecido.<sup>5</sup>

No mesmo ano, realizaram feridas no dorso de 18 carneiros. Em cada animal fez duas feridas, sendo uma tratada com gaze embebida em óleo de semente de girassol contendo AL a 65 % e outra tratada com gaze vaselinada. As feridas tratadas com AL cicatrizaram mais rapidamente do que as feridas que serviram como controle. Houve também maior formação de tecido de granulação, matriz extracelular e proliferação de miofibroblastos.<sup>21</sup>

Mais recentemente, Zimmer et al.<sup>30</sup> utilizaram extrato de certo tipo de grilo, com alto teor de AL, em feridas de ratos e também notaram uma cicatrização mais rápida.

Em humanos, um estudo multicêntrico duplo-cego com 100 pacientes portadores de úlceras cutâneas crônicas revelou que, até a quarta semana, daqueles tratados topicamente com AL, 90,4 % cicatrizaram, enquanto que, entre os tratados com placebo, apenas 1,5 % tiveram a mesma evolução.<sup>20</sup>

A membrana timpânica (MT), localizada no fundo do conduto auditivo externo (CAE), separa este último da orelha média (OM). Ela tem uma estrutura histológica extremamente delicada, composta por três camadas: a camada mais lateral é constituída por um epitélio escamoso queratinizado que é contínuo com a pele do CAE; a camada mais interna pertence à OM, da qual constitui a parede lateral, e é formada por um delicado epitélio mucoso com uma só fileira de células, que se continua com a mucosa de revestimento da caixa do tímpano, ossículos e células da mastóide; finalmente, entre essas duas, existe uma camada intermediária de tecido conjuntivo, com fibrócitos e fibras colágenas radiais e circulares. Esta arquitetura confere à MT propriedades físicas de grande importância para a sua função de transmissão e amplificação da energia sonora. Aderido à MT está o cabo do martelo, cuja extremidade inferior (o umbo) situa-se no centro da membrana, e que recebe as vibrações desta e as transmite por intermédio dos outros componentes da cadeia ossicular, à orelha interna.<sup>31</sup>

A pele é um órgão dinâmico, que se mantém em permanente estado de renovação, com células basais que se reproduzem formando estratos superpostos cujas células mais superficiais morrem e são eliminadas por descamação.<sup>32</sup> No caso da MT, o epitélio da camada externa, à medida que se vai proliferando, exibe um movimento migratório centrífugo a partir do umbo (centro germinativo) em direção à periferia e, daí, no sentido do meato acústico externo e só então se estratifica e descarna. Dessa forma, diferente de outras regiões da pele, o revestimento cutâneo da MT e da porção mais interna do CAE nunca chega a formar estratos e isso assegura a delicadeza estrutural da membrana e as suas características biomecânicas, além de impedir a formação de tampões de material descamado no interior do conduto.<sup>33,34</sup> Essa migração superficial pode ser apreciada no homem, mas também em animais de experimentação<sup>33,35-37</sup> diferindo-se pelo sentido da migração e pela localização do centro germinativo.

A perfuração da MT é uma ocorrência comum na prática clínica diária do otorrinolaringologista, podendo ser causada por trauma ou por infecção.<sup>1,38</sup> Independentemente da causa da perfuração, quando esta é aguda, normalmente ocorre fechamento espontâneo da mesma em poucos dias, podendo, entretanto, em poucos casos, haver falha na cicatrização, com evolução para uma lesão crônica e estável.<sup>1-3,38</sup> Segundo Kristensen<sup>1</sup>, que, em 1992, realizou um extenso trabalho de revisão sobre perfuração timpânica em humanos, teoricamente, dois fatores podem levar a uma falha no fechamento espontâneo de uma perfuração: necrose das margens e infecção. Entre os diversos estudos por ele revisados, percebeu que as perfurações causadas por agressão térmica ou química são as que apresentam menor índice de fechamento espontâneo, apesar de, mesmo nesses casos, esses índices serem altos. Bogar et al.<sup>38</sup> acrescentam o tamanho excessivo da perfuração aos fatores que reduzem a taxa de cicatrização.

Em trabalhos experimentais, houve quem percebesse uma relação entre o tamanho da perfuração e os resultados quanto ao seu fechamento, como Leite, que trabalhou com 10 gatos<sup>39</sup>, mas há também quem não encontre nenhuma influência desse fator no processo cicatricial da MT, como Wang et al.<sup>37</sup> trabalhando com 50 ratos nos quais fizeram vários tipos de perfurações. Outro fator importante encontrado por um autor foi a ressecção ou não do ânulo timpânico no momento da realização da perfuração, tendo sido observada uma dificuldade maior quando aquela estrutura era removida de forma segmentar (em perfurações parciais) ou total (em perfurações

completas).<sup>39</sup>

Apesar de raras descrições em contrário<sup>40</sup> é consenso que a cicatrização da perfuração timpânica se dá primeiramente pelo fechamento da camada externa, que é seguido por um avanço do tecido conjuntivo e da mucosa<sup>3,4,36,41</sup> e que existe íntima relação de processo com a migração do epitélio externo da MT.<sup>33,35,36</sup>

Autores propuseram fechar perfurações traumáticas realizadas em 24 ratos com enxerto de veia e notaram que, apesar de os enxertos não terem "pegado", todas as perfurações fecharam, concluindo-se que a veia apenas fornecera uma ponte para a migração espontânea do epitélio.<sup>42</sup> Essa ponte parece funcionar como um esqueleto vetorial que, unindo as margens externas da perfuração, orienta a regeneração do epitélio escamoso para o lado oposto e previne o seu movimento em direção ao lado interno mucoso da MT, conceito este defendido por diversos autores.<sup>2-4,42</sup>

Um trabalho realizado com 16 cobaias em que se procedeu a perfurações timpânicas traumáticas mostrou que a lesão da MT aumentava a já intensa atividade mitótica no centro germinativo, aumentando a velocidade de migração e o número de células migrantes. Foi percebido, ainda, que o fechamento da perfuração se dava de baixo para cima, mesmo sentido da migração epitelial na cobaia, e que esse fechamento era deflagrado quando as células com grande atividade, migradas a partir do centro germinativo localizado na região justa-timpânica inferior do CAE, atingiam a margem inferior da perfuração.<sup>35</sup> No caso da MT de ratos, um trabalho recente mostrou dois centros germinativos, na região do cabo do martelo e próximo ao ânulo timpânico.<sup>37</sup> Reeve<sup>33</sup> em 1977, analisou histologicamente 204 cobaias em que realizou uma grande perfuração timpânica, das quais 71% fecharam espontaneamente. Ele observou diferentes padrões de evolução histológica, sendo que o comportamento mais típico foi o da proliferação inicial do epitélio escamoso estratificado migrando sobre coleções de cera, coágulo, células inflamatórias e restos celulares em direção à margem oposta da perfuração, sem nenhum suporte de tecido de granulação. Nos animais em que houve cronificação da perfuração, notou-se um avanço do epitélio escamoso não no sentido acima descrito, mas em torno do bordo da perfuração, sobre o tecido conectivo interrompido, acabando por fundir-se com as células do epitélio mucoso, formando uma zona de inibição por contato, o que foi também constatado por outro autor.<sup>3,33</sup>

Por microscópio óptica e eletrônica foi observado por Stenfors et al.<sup>41</sup> que as perfurações causadas em ratos e em gatos cicatrizavam em três estágios: primeiro, o

epitélio escamoso das margens exibiam intensa produção de queratina, que avançava no sentido de formar uma ponte sobre o defeito da MT; depois, a perfuração era de fato fechada por proliferação do epitélio escamoso segundo o caminho da ponte de queratina; só então a estrutura trilaminar da membrana era restabelecida. Esse avanço do epitélio sem nenhum tecido celular de suporte, em uma estrutura que possui ar em ambas as superfícies (externa e interna), segundo esses e outros autores, faz do fechamento da perfuração timpânica um fenômeno único em cicatrização de feridas.<sup>1,3,41</sup>

O papel da queratina como ponte para a migração celular também foi mostrado por Güneri et al.<sup>3</sup> em ratos, num estudo em que perfuraram as membranas de 30 animais. Ficou evidenciado que, após o trauma agudo, uma reação exsudativa composta por fluido intersticial, linfa e coágulos ocorre nas margens da perfuração, após o que se forma uma crosta que protege o tecido subjacente, prevenindo a sua desidratação e fornecendo um meio ideal para a migração celular e para o processo de cicatrização. Ao cabo de poucos dias, uma óbvia proliferação ocorre na camada externa da MT com um excesso de produção de queratina, que é considerada a chave para o direcionamento da cicatrização para o centro da perfuração, primeiro pelo tecido epitelial e, em seguida, pelo conjuntivo.

Também trabalhando com animais, Johnson et al.<sup>36</sup> perfuraram a MT de 30 cobaias e obtiveram resultados semelhantes: no princípio houve uma projeção de estrato córneo seguido por um pacote de células epidérmicas nucleadas, sem (mais uma vez) nenhum tecido de suporte, mas que apresentava um infiltrado polimorfonuclear no seu aspecto mediai e era seguido de perto pelo tecido conjuntivo com vasos neoformados. O trabalho também evidenciou que o avanço epidérmico se dava no sentido ínfero-superior, como descrito anteriormente.

Para avaliar a qualidade das MT cicatrizadas após uma perfuração, em 2005, Rahman et al.<sup>43</sup> avaliaram, por meio de interferometria óptica, a tensão de membranas recém cicatrizadas de 10 ratos e de 10 camundongos e não perceberam nenhuma diferença em relação às membranas não perfuradas até uma faixa de variação de pressão de -350 a +350 da PA. No exame histológico das membranas cicatrizadas, encontraram um espessamento importante da MT às custas de fibroblastos e de matriz extra-celular até a 4ª semana.

Com base nos conhecimentos adquiridos sobre os mediadores pró-inflamatórios que atuam sobre os diversos fenômenos envolvidos na cicatrização

das feridas, alguns trabalhos têm sido realizados tentando identificar compostos que, aplicados topicamente, possam influenciar na velocidade de cicatrização das perfurações timpânicas.

Em 1989, por exemplo, Stenfors<sup>2</sup> aplicou, com intervalos de dois a três dias, ácido hialurônico (AH), um fator que sabidamente atua estimulando a proliferação de fibroblastos, em perfurações crônicas pequenas (menores do que um quadrante) de 15 pacientes adultos, tendo conseguido fechar 14 delas. O autor postula que o AH possa ter servido, por sua viscosidade, como lubrificante das margens, e, por sua ação metabólica, como acelerador da cicatrização.

Dois anos depois, 50 ratos tiveram suas membranas timpânicas perfuradas e foram divididos em quatro grupos: um recebeu aplicação tópica diária de fibronectina (um estimulante da proliferação epitelial), outro recebeu AH a 1%, um terceiro recebeu solução salina tamponada e o quarto não recebeu qualquer tipo de tratamento. 50 % dos ratos tratados com AH fecharam antes que os demais e, no computo geral, a velocidade de cicatrização nesse foi grosseiramente estimada em 60% maior que a dos demais. Nenhum dos outros grupos tratados mostrou diferença no tempo de fechamento em relação ao grupo controle. Os achados histológicos no grupo do AH mostraram um processo cicatricial que, em consonância com os demais estudos, começou com a cobertura da perfuração por uma lâmina de AH e queratina, dentro da qual o epitélio escamoso avançava (formando uma ponte entre os bordos), sempre seguido pelo tecido conectivo. Nos animais tratados com solução salina ou com fibronectina, houve uma proliferação epitelial mais exuberante, sobre um leito com muito tecido de granulação, e dirigindo-se para o lado da OM, ao contrário do grupo tratado com AH, que exibiu um padrão de migração mais rápido e mais orientado no sentido do bordo oposto da perfuração.<sup>4</sup>

Já Amadasun<sup>44</sup>, em 2002, tratou 30 pacientes com perfurações traumáticas de diversas causas, sendo seis deles por meio da colocação de papel celofane sobre a perfuração, 15 por meio de colocação de pomada de gentamicina sobre a perfuração e nove nos quais foi colocada pomada de gentamicina apenas no terço distal do CAE, sem tocar a MT. O índice de fechamento dessas perfurações foi de 50 %, 86,7 % e 77,8 %, respectivamente, sem diferença estatística importante entre os dois últimos, concluindo o autor que o melhor tratamento é a limpeza e a prevenção da infecção.

No estudo com 30 ratos, que sofreram perfuração timpânica e foram feitas aplicações locais diárias de AH, FCE e mitomicina-C (um agente inibidor de mitoses e

que inibe principalmente a proliferação de fibroblastos) e houve uma redução do tempo de fechamento tanto para o grupo do AH quanto para o do FCE, bem como um prolongamento para o grupo da mitomicina-C, em relação a um grupo controle.<sup>3</sup>

Mais recentemente autores realizaram perfurações em membranas de 20 ratos, que foram divididos em dois grupos: em 10 ratos foi introduzido na perfuração um fragmento de matriz de alginato e, nos outros 10, o mesmo material, embebido em FCE foi usado. Todas as membranas dos dois grupos fecharam. Porém as do grupo com FCE fecharam mais rapidamente. E em 2006, o mesmo grupo apresentou os resultados da aplicação tópica de TGF- $\beta$  em perfurações traumáticas de ratos, não havendo diferença em relação ao controle quando a aplicação era feita em dose única, mas percebendo-se uma diminuição no tempo de cicatrização com a aplicação repetida do composto.<sup>46</sup>

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 Local de Estudo**

Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco, onde foi realizado o trabalho com os animais, desde seu armazenamento, alimentação, preparação e otomicroscopia.

### **4.2 Desenho de Estudo**

Trata-se de um estudo experimental, onde o pesquisador cria condições artificiais para estudar um determinado grupo longitudinal, analítico e prospectivo.

### **4.3 Período de Referência**

Os dados foram coletados de outubro de 2005 a setembro de 2006.

### **4.4 População de Estudo**

Trinta e seis ratos Wistar albinos saudáveis, pesando entre 200 e 400g, adultos jovens, com três meses de idade, foram adquiridos no biotério dos Departamentos de Bioquímica e Farmácia da Universidade de Pernambuco, sendo adotados como critério de exclusão a presença de alguma alteração como OMA ou opacificação da membrana timpânica em pelo menos uma das orelhas. Dos trinta e seis animais obtidos para o estudo, dezesseis foram excluídos por preencherem o critério de exclusão e três morreram durante os dezesseis dias de acompanhamento, sendo realizadas as análises em dezessete animais.

### **4.5 Método**

Os animais foram mantidos em um mesmo local, no Núcleo de Cirurgia Experimental, em gaiolas individuais com piso de serragem de madeira de pinho, iluminação artificial, temperatura ambiente, ciclo dia e noite natural e alimentação com água e ração. Os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral a 10%, 0,5ml para

cada IOOg por injeção intra-peritoneal, após o que foram colocados sobre a bancada cirúrgica, em decúbito lateral de modo a expor a orelha direita para o pesquisador.

Sob otomicroscopia, utilizando-se um microscópio cirúrgico marca D. Vasconcelos, de coluna, modelo MC-M 31, foi utilizado espelho auricular e realizada perfuração traumática timpânica, cerca de 30% da superfície da pars tensa com microestilete para cirurgia otológica super aquecido, marca Factory, com a finalidade de tornar a perfuração estável retardando sua cicatrização. Utilizando uma seringa descartável de 1mlref 1196, marca Kramer, foi aplicado 0,1ml de AL (minimum 100% - LI376, 25g - SIGMA) na OD de cada rato. A mesma metodologia foi realizada na OE (grupo controle), porém não foi aplicado o AL.

Feito o procedimento nas duas orelhas, os animais foram devolvidos às suas respectivas gaiolas. Por um período de 16 dias foram realizadas otomicroscopias no 7°, 9°, 12°, 14° e 16° dias nos ratos nos quais não ocorreu fechamento da membrana timpânica, sob anestesia, da forma descrita acima. Eram anotadas as alterações encontradas pelos examinadores (pesquisador e médico colaborador). Não havendo fechamento da membrana timpânica na OD era reaplicado o AL. Após o 16° dia os ratos foram sacrificados com dose letal de hidrato de cloral.

#### **4.6 Análise Estatística**

Foi realizada uma análise descritiva para apresentação dos resultados obtidos. O software utilizado foi o Excel 2000. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas e gráficos. A fim de verificar diferenças entre os grupos, tratamento e controle quanto à eficiência do medicamento foi aplicado o teste exato de Fisher, sendo todas as conclusões tomadas ao nível de significância de 5%.

#### **4.7 Considerações Éticas**

Esta pesquisa seguiu os princípios que regem o Código de Ética Experimental e as leis de proteção aos animais, de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei nº 9.605, Art. 32 e Decreto-lei nº 3.179, Art. 17, de 21 de setembro de 1999, com aprovação integral do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, Ofício nº 031/06 (ANEXO A), inclusive concordando que o sacrifício desses animais neste estudo justifica-se pelo

fato de não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico.

Toda intervenção realizada que pudesse implicar sofrimento ao animal foi realizada sob anestesia geral, com o cuidado de adequada assepsia e antissepsia.

Os animais foram obtidos de um mesmo fornecedor (Biotério dos Departamentos de Farmácia e Bioquímica) e mantidos no Biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE, em gaiolas individuais com piso em serragem de madeira de pinho, com controle ambiental adequado para luz e temperatura e receberam os cuidados necessários de veterinário.

Figura 1 – Ratos wistar



Fonte: o autor

Figura 2 – Instrumentos para miringotomia: espéculo de ouvido, microgancho, ponta de aspirador, microestiliete com ponta reta



Fonte: o autor

## 5 RESULTADOS

Iniciamos o estudo com um total de 36 ratos, dos quais 16 foram excluídos por apresentarem alteração na MT ou OM (critérios de exclusão). Dos 20 ratos selecionados, 3 foram a óbito durante o tempo de acompanhamento, permanecendo 17 animais até o final da coleta dos dados.

Todos os animais, 17 ratos, apresentaram à otomicroscopia fechamento da perfuração da OD até o 16° dia de observação (grupo tratamento) e apenas um animal não apresentou fechamento da perfuração da OE (grupo controle). A distribuição dos exames otomicroscópicos de cada animal até o 16° dia podem ser visto no quadro 1 (ANEXO B).

Na tabela 1 observamos a distribuição dos animais estudados do 7° ao 16° dia de coleta quanto ao desfecho da lesão (fechamento ou não fechamento da perfuração) e podemos verificar que os percentuais de fechamento da lesão não diferem entre os grupos tratamento e controle em nenhum dos dias observados (7°, 9°, 12°, 14° e 16°).

Tabela 1 – Distribuição dos animais do 7° ao 16° dia de coleta quanto ao desfecho da lesão (fechamento ou não fechamento)

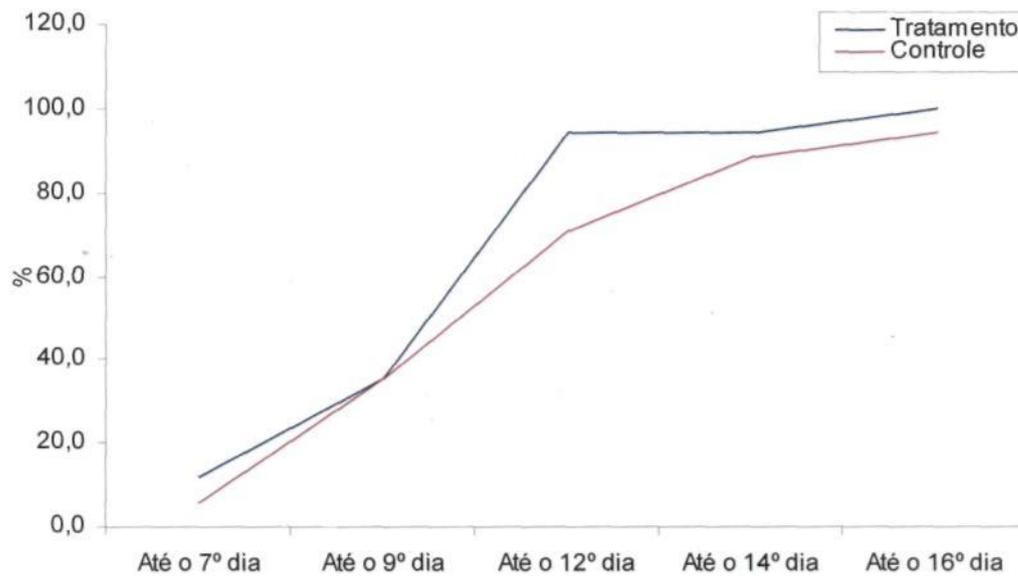
Resultados	Tratamento		Controle		p-valor
	N	%	N	%	
<b>Até o 7° dia</b>					
Fechou	2	11,8	1	5,9	1,000
Não fechou	15	88,2	16	94,1	
<b>Até o 9° dia</b>					
Fechou	6	35,3	6	35,3	1,000
Não fechou	11	64,7	11	64,7	
<b>Até o 12° dia</b>					
Fechou	16	94,1	12	70,6	0,175
Não fechou	1	5,9	5	29,4	
<b>Até o 14° dia</b>					
Fechou	16	94,1	15	88,2	1,000
Não fechou	1	5,9	2	11,8	
<b>Até o 16° dia</b>					
Fechou	17	100,0	16	94,1	1,000
Não fechou	0	0,0	1	5,9	

Fonte: o autor

Analisando a velocidade de fechamento das perfurações nos dois grupos (tabela 1, gráfico 1), verificamos que houve um número crescente de fechamento das perfurações nos dois grupos do 7<sup>o</sup> ao 16<sup>o</sup> dias, porém sem diferença estatisticamente significativa, não havendo, dessa forma evidência de que o AL interfira no tempo e na velocidade de cicatrização.

Gráfico 1 – Percentual de fechamento das perfurações do 7<sup>o</sup> ao 16<sup>o</sup> dia de coleta no grupo tratamento (OD) e grupo controle (OE)

### Percentual de Fechamento



Fonte: o autor

## 6 DISCUSSÃO

Sabendo que o AL é um dos componentes essenciais das membranas celulares e que ele está envolvido no binômio inflamação/cicatrização, seja de forma direta ou através de sua conversão em AA e, por conseguinte, em eicosanóides,<sup>6-9,12,15-18,19,24,26,28</sup> e, com base nos estudos que evidenciaram uma nítida atuação da aplicação tópica do AL em feridas de animais<sup>5,21,30</sup> ou em humanos,<sup>20</sup> é bastante plausível imaginar que este composto pudesse ter algum efeito sobre o mecanismo de fechamento da membrana timpânica. Essa hipótese era fortalecida pela existência de vários trabalhos mostrando os efeitos benéficos da aplicação tópica de outros mediadores inflamatórios sobre membranas timpânicas perfuradas, tanto em animais<sup>3,4,45,46</sup> como em humanos.<sup>2,44</sup>

É verdade que alguns estudos mostraram que o AL tem uma ação mais pronunciada na manutenção e restabelecimento da função de barreira (permeabilidade) da pele e menos importante na recuperação da integridade física da mesma,<sup>13,19,26,29</sup> porém, três importantes publicações recentes, uma em feridas cutâneas crônicas de humanos e três em feridas de pele de animais<sup>5,21,30</sup> justificam a procura de um eventual efeito da aplicação tópica de AL sobre perfurações timpânicas.

Os resultados encontrados no presente estudo (tabela 1), entretanto, não revelaram nenhuma diferença que fosse estatisticamente significante no índice de fechamento das perfurações timpânicas nem na velocidade de cicatrização entre as orelhas tratadas com AL e as orelhas do grupo controle. Alguns preceitos determinados pela literatura podem explicar essa ausência de efeito, como veremos adiante.

Os trabalhos que demonstraram haver alguma ação do AL no processo cicatricial foram realizados com feridas comuns.<sup>5,20,21,30</sup> Ora, a literatura mostra que a perfuração timpânica não se trata de uma ferida cutânea comum, visto que não possui um tecido subdérmico de sustentação para o crescimento epitelial e que, nela, o fechamento se faz inicialmente pela proliferação de células escamosas por migração a partir de um centro germinativo<sup>33-37</sup> e, só então, ocorre avanço do tecido conjuntivo na forma de tecido de granulação.<sup>3,4,36,41</sup> O AL já teve comprovada sua ação como precursor de mediadores inflamatórios que agem estimulando a proliferação de polimorfonucleares, fibroblastos e matriz extracelular e a angiogênese,<sup>9,16,28</sup> etapas

muito importantes na formação do tecido de sustentação para o crescimento epitelial superficial em feridas comuns, o que não é o caso das perfurações timpânicas. Além disso, outro trabalho revelou que o AL aplicado topicamente não parece se converter em AA imediatamente, sendo necessária para isso a sua absorção para a corrente sangüínea, retornando os seus metabólitos então para o local da ferida em concentrações insuficientes para exercer qualquer efeito.<sup>11,19</sup> Por isso, enquanto a aplicação tópica dos metabólitos do AL pode demonstrar algum efeito sobre o crescimento epitelial,<sup>8,11,14,29</sup> o AL em si não foi capaz disso.

Mesmo assim, os estudos feitos com a aplicação tópica de AH, um composto com conhecida ação sobre a proliferação de fibroblastos, em perfurações timpânicas de animais<sup>3,4,45</sup> ou em humanos<sup>2,44</sup> mostraram nitidamente uma aceleração da cicatrização. Esse efeito foi evidente também quando se aplicou TGF- $\beta$ <sup>46</sup>, outro composto com atuação sobre as células de resposta inflamatória, mas sem ação sobre a migração/proliferação epitelial. É possível, como admitem alguns autores desses estudos,<sup>2,4</sup> que esses compostos tenham apenas servido de ponte vetorial para o avanço do epitélio sobre o intervalo entre os bordos da perfuração, do mesmo modo como afirmam McIntire e Benitez,<sup>42</sup> com a aplicação de fragmento de veia sobre a perfuração. Talvez os próprios cuidados com assepsia, que são uma tônica dos estudos experimentais, tenham sido suficientes para garantir um bom índice de fechamento dessas perfurações, como demonstrado por Amadasun.<sup>44</sup> Já os trabalhos feitos com FCE e com a fibronectina, que têm ação comprovada sobre o crescimento epitelial, podem, sim, ter demonstrado com mais certeza a ação metabólica desses compostos sobre o mecanismo de cicatrização da MT.<sup>3,4,45</sup>

Particularmente, o trabalho de Helstrom et al.<sup>4</sup> demonstrou que a fibronectina causou um crescimento epitelial importante, porém, em direção ao lado medial da MT, contornando e revestindo o bordo da perfuração, por sobre o tecido conjuntivo da camada intermediária da MT. Ao que parece, após uma perfuração timpânica, duas tendências se conflitam: aquela que segue o mecanismo habitual de cicatrização de uma ferida, com a epitelização ocorrendo sobre uma camada de tecido conjuntivo (o que, no caso da MT, representa a epitelização dos bordos da perfuração, claramente prejudicial ao fechamento), e aquela que segue o mecanismo único da MT, com o avanço do epitélio em direção ao bordo oposto da perfuração. A tendência que predominar vai definir o destino daquela perfuração, sendo que, em condições normais, em quase todos os casos, o que vai predominar é o segundo mecanismo, o

que explica o grande índice de fechamento espontâneo das perfurações observado na prática.

Um outro fator importante a ser levado em consideração quando da análise dos resultados do estudo presente é o modelo experimental.

O rato como modelo animal tem sido utilizado por vários pesquisadores para estudos de doenças da orelha média e como modelo para o estudo da cicatrização da membrana timpânica.<sup>3,4,37,41-43,46</sup> o referido animal apresenta algumas vantagens, como a fácil avaliação da MT através da otomicroscopia e estrutura da MT e OM semelhantes à humana.

Dos 36 animais obtidos inicialmente para nosso estudo, 16 (44,4%) deles foram excluídos por apresentarem, em pelo menos uma das orelhas, alteração de MT ou OM, achado semelhante ao encontrado por Becker e Fukuda<sup>47</sup> e Leal et al.<sup>48</sup> que relataram a ocorrência de 44,8% e 34%, respectivamente, de alteração da MT em pelo menos uma das orelhas na seleção dos animais da mesma espécie. Sendo o rato um animal, com tendência à infecção natural na OM, é importante o cuidado na criação em biotérios bem preparados e na seleção dos animais para pesquisas otológicas.

A realização de perfuração da MT através de cauterização teve o intuito de torná-las perfurações mais estáveis, já que, como descrito anteriormente por outros autores,<sup>1-3</sup> as perfurações por agressões térmicas podem dificultar ou retardar o tempo de cicatrização. Dessa forma permitiria melhor avaliação da possível diferença da velocidade de cicatrização de uma orelha (com uso do AL) em relação à orelha controle (cicatrização espontânea). Estudos realizados por diversos autores<sup>33,37-41</sup> demonstraram que perfurações timpânicas agudas em ratos (sem cauterização dos bordos) cicatrizam em um tempo muito curto, de até uma semana, na maioria dos casos.

Esse modelo seguiu, portanto, aquele usado por Helstrom et al.<sup>4</sup> que conseguiram um bom efeito com a aplicação de AH. Entretanto, não existe nenhum outro trabalho que se tenha utilizado do AL em membranas timpânicas de ratos. Foi escolhida a concentração de 100 % para a substância empregada após verificada ausência de lesões cáusticas após a aplicação tópica na MT íntegra dos ratos em um estudo piloto realizado previamente. O uso do AL puro permitiu então a observação do seu efeito sobre as membranas perfuradas sem a interferência de outros compostos que porventura viessem a integrar a sua fórmula. Tal cuidado não tomado, por exemplo, por outros estudos que utilizaram o AL em feridas cutâneas.<sup>20,21,30</sup> Todavia,

a frequência e a forma de aplicação foi decidida de forma empírica, com base nos estudos anteriormente realizados com outras substâncias, podendo não ser as mais adequadas para o AL. Assim, outros trabalhos podem ser necessários para atestar a ineficácia desse ácido graxo sobre o índice e a velocidade de fechamento da perfuração timpânica.

## 7 CONCLUSÃO

A aplicação tópica de AL não alterou de maneira significativa o índice ou a velocidade de fechamento de perfurações timpânicas agudas de ratos.

## REFERÊNCIAS

1. Kristensen S. Spontaneous healing of traumatic tympanic membrane perforations in man: a century of experience. *J Laryngol Otol.* 1992;106(2):1037-50.
2. Stenfors LE. Repair of tympanic membrane perforations using hyaluronic acid: an alternative to myringoplasty. *J Laryngol Otol.* 1989;103(1):39-40.
3. Guneri EA, Tekin S, Yilmaz O, Ozkara E, Erdag TK, Ikiz A O, et al. The effects of hyaluronic acid, epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol.* 2003;24:371-6.
4. Helstrom S, Bloom GD, Berghen L, Stenfors LE, Soderberg O. A comparison of hyaluronan and fibronectin in the healing of tympanic membrane perforations. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1991;248(4):230-5.
5. Cardoso CRB, Souza MA, Ferro EAV, Favoreto S, Pena JDO. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair Regen.* 2004;12(2):235-43.
6. Corsi RCC, Corsi PR, Pirana S, Muraco FAE, Jorge D. Cicatrização das feridas: revisão da literatura. *Rev Bras Cir.* 1994;84(1):17-24.
7. Declair V. The importance of growth factors in wound healing. *Ostomy Wound Manage.* 1999;45(4):64-74.
8. Pentland AP, Needleman P. Modulation of keratinocyte proliferation *in vitro* by endogenous prostaglandin synthesis. *J Clin Invest.* 1986;77:246-51.
9. Nolan RD, Danilowicz RM, Eling TE. Role of arachidonic acid metabolism in the mitogenic response of BALB/c 3T3 to epidermal growth factor. *Mol Pharmacol.* 1988;33:650-6.
10. Orengo IF, Black HS, Kettler AH, Wolf JE. Influence of dietary menhaden oil upon carcinogenesis and various cutaneous responses to ultraviolet radiation. *Photochem Photobiol.* 1989;49:71-7.
11. Moch D, Schewe T, Kuhn H, Schmidt D, Buntrock P. The linoleic acid metabolite 9D<sub>s</sub>-hydroxy-10,12(E,Z)-octadecadienoic acid is a strong proinflammatory mediator in an experimental wound healing model of the rat. *Biomed Biochim Acta.* 1990;49(4):201-7.
12. Glasgow WC, Eling TE. Epidermal growth factor stimulates linoleic acid metabolism in BALB/c 3T3 fibroblasts. *Mol Pharmacol.* 1990;38(4):503-10.
13. Choi JH, Yu BP. Brain synaptosomal aging: free radicals and membrane fluidity. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(2):133-9.
14. Ruthig DJ, Meckling-Gill AK. Both (n-3) and (n-6) fatty acids stimulate wound healing in the rat intestinal epithelial cell line, IEC-6. *J Nutr.* 1999;129:1791-8.

15. James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:S343-8.
16. Savla U, Appel HJ, Sporn PHS, Waters CM. Prostaglandin E2 regulates wound closure in airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280:L421-31.
17. Medeiros FJ, Leite LHM, Rosa G, Vaz EM. Recentes evidencias sobre os ácidos graxos poliinsaturados. *Arq Bras Med.* 1998;72(5):175-80.
18. Van Dorp DA. Essential fatty acids and prostaglandins. *Acta Biol Med Ger.* 1976;35(8-9):1041-9.
19. Prottey C. Investigation of functions of essential fatty acids in the skin. *Br J Dermatol.* 1977;97:29-38.
20. Declair V. Tratamento de úlceras crônicas de difícil cicatrização com ácido linoleico. *J Bras Med.* 2002;82(6):36-41.
21. Marques SR, Peixoto CA, Messias JB, Albuquerque AR, Silva Jr VA. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. *Acta Cir Bras.* 2004;19(3):196-209.
22. Kietzmann M. Improvement and retardation of wound healing: effects of pharmacological agents in laboratory animal studies. *Rev Dermatol.* 1999;10(2):83-8.
23. Corsi RCC, Corsi PR, Pirana S, Muraco FAE, Jorge D. Fatores que influenciam a cicatrização das feridas: revisão da literatura. *Rev Bras Cir.* 1995;85(2):48-53.
24. Colder PC. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Braz J Med Res.* 1998;31(4):467-90.
25. Hume EM, Smith HH. The relation of a fat-free diet to the scaly tail condition in rats described by Burr and Burr. *Biochem J.* 1931;25(1):300-6.
26. Mohrhauer M, Holman RT. The effect of dose level of fatty acids upon fatty acid composition of the rat liver. *J Lipid Res.* 1963;4:151.
27. Prottey C, Hartop PJ, Black JG, McCormack JI. The repair of impaired barrier function in rats by the cutaneous application of linoleic acid. *Br J Dermatol.* 1976;94(1):13-21.
28. Hartop PJ, Prottey C. Changes in transepidermal water loss and the composition of the epidermal lecithin after applications of pure fatty acid triglycerides to the skin of essential fatty acid-deficient rats. *Br J Dermatol.* 1976;95(3):255-64.
29. Ziboh VA, Hsia SL. Effects of prostaglandin E2 on rat skin: inhibition of sterol ester biosynthesis and clearing of scaly lesions in essential fatty acid deficiency. *J Lipid Res.* 1972;13:458.

30. Zimmer MM, Frank J, Barker JH, Becker H. Effect of extracts from the Chinese and European mole cricket on wound epithelialization and neovascularization: in vivo studies in the hairless mouse ear wound model. *Wound Repair Regen.* 2006;14(2):142-51.
31. Caldas Neto, S. Anatomofisiologia da orelha humana. In: Caldas N, et al. editores *Otologia e audiologia em pediatria.* Rio de Janeiro: Revinter; 1999. p. 8-16.
32. Mack JÁ, Anand S, Maytin EV. Proliferation and comification during development of the mammalian epidermis. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2005;75(4):314-29.
33. Reeve DRE. Repair of large experimental perforations of the tympanic membrane. *J Laryngol Otol.* 1977;91:767-78.
34. Lim DJ. Structure and function of the tympanic membrane: a review. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 1995;49(2):101-15.
35. Clawson JP, Litton WB. The healing process of tympanic membrane perforations. *Tr Am Acad Ophthal Otolaryngol.* 1971;75(6):1302-12.
36. Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations: a two dimensional histological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 1990;109:406-15.
37. Wang WQ, Wang ZM, Chi FL. Spontaneous healing of various tympanic membrane perforations in the rat. *Acta Otolaryngol.* 2004;124(10):1141-4.
38. Bogar P, Sennes LU, Busch GHC, Marone SAM, Miniti A, Bento RF. Perfurações traumáticas da membrana timpânica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1993;59(4):276-8.
39. Leite, FA. Regeneração espontânea da membrana timpânica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1971;37(3):345-8.
40. Kristensen S. Spontaneous healing of traumatic tympanic membrane perforations in man: a century of experience. *J Laryngol Otol.* 1992;106:1037-50.
41. Stenfors LE, Carlsöö B, Salém B, Winblad B. Repair of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol.* 1980;90(5-6):332-41.
42. McIntire C, Benitez JT. Spontaneous repair of the tympanic membrane. Histopathological studies in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1970;79:1129-31.
43. Rahman A, Hulcrantz M, Dirckx J, Margolin G, von Unge M. Fresh tympanic membrane perforations heal without significant loss of strength. *Otol Neurotol.* 2005;26(6):1100-6.
44. Amadasun JE. An observational study of the management of traumatic tympanic membrane perforations. *J Laryngol. Otol.* 2002;116(3):181-4.

45. Kaftan H, Hosemann W, Junghans D, Gopferich A, Schindler E, Beule A. Traumatic tympanic membrane perforations: local application of alginate matrix loaded with epidermal growth factor in an animal model. *HNO*. 2005;53(6):539-45.
46. Kaftan H, Herzog M, Miehle B, Hosemann W. Topical application of transforming growth factor-beta1 in acute traumatic tympanic membrane perforations: an experimental study in rats. *Wound Repair Regen*. 2006;14(4):453-6.
47. Becker CG, Fukuda Y. Avaliação da orelha média de ratos pós-eletrocauterização da tuba auditiva. *Acta Awho*. 1991; 10(2):76-81.
48. Leal M, Bento R, Caldas Neto S, Caldas N, Peixoto C, Lessa F, et al. Influence of hypercalcemia in the formation of tympanosclerosis in rats. *Otol Neurotol*. 2006;27:27-32.

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFPE

ANEXOS

### ANEXO A

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 031/06

Recife, 10 de julho de 2006

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE  
Para: Prof. Nelson Costa Rego Caldas  
Departamento de Cirurgia - UFPE

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 do uso tópico do ácido linoléico em perfurações traumáticas da membrana timpânica em ratos”.

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

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

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

Atenciosamente,

*Silene Carneiro*  
Prof. Silene Carneiro do Nascimento  
Presidente CEEA  
UFPE

CCB: Integrar para desenvolver

## ANEXO B – AVALIAÇÃO OTOMICROSCÓPICA

Quadro 1 – Avaliação Otomicroscópica

DIAS	7°		9°		12°		14°		16°	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
<b>RATO</b>										
<b>1</b>	OB	TO								
<b>2</b>	A	A	A	A	OB	TO				
<b>3</b>	A	A	F	A	F	F	FECHADO			
<b>4</b>	A	A	A	A	F	A	F	F	FECHADO	
<b>5</b>	A	A	A	A	F	F	FECHADO			
<b>6</b>	F	F	F	F	FECHADO					
<b>7</b>	A	A	A	F	F	F	FECHADO			
<b>8</b>	A	A	A	A	F	F	FECHADO			
<b>9</b>	A	A	A	A	A	A	A	F	F	F
<b>10</b>	A	A	F	F	FECHADO					
<b>11</b>	A	A	A	A	F	A	F	A	F	A
<b>12</b>	A	A	A	F	F	F	FECHADO			
<b>13</b>	A	A	A	F	F	F	FECHADO			
<b>14</b>	A	A	F	F	F	F	FECHADO			
<b>15</b>	A	A	A	A	F	A	F	F	FECHADO	
<b>16</b>	A	A	F	A	F	F	FECHADO			
<b>17</b>	A	A	ÓBITO							
<b>18</b>	F	A	F	A	F	F	FECHADO			
<b>19</b>	A	A	A	A	F	A	F	A	ÓBITO	
<b>20</b>	A	A	A	A	F	F	FECHADO			

A: Aberto; F: Fechado; OD: Orelha direita; OE: Orelha esquerda.

## **ANEXO C – NORMAS ADOTADAS PARA DISSERTAÇÃO**

### **COMITÊ DE ÉTICA**

#### **Normas adotadas para dissertação**

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