

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde
Área de Concentração em Clínica Cirúrgica

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DA TERAPIA COM CÉLULAS
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM
PERFURAÇÕES AGUDAS DE MEMBRANA TIMPÂNICA**

DANIELA DIAS FABRICIO

**PORTO ALEGRE
2009**

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde
Área de Concentração em Clínica Cirúrgica

**EFEITO DA TERAPIA COM CÉLULAS
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM
PERFURAÇÕES AGUDAS DE MEMBRANA TIMPÂNICA**

DANIELA DIAS FABRICIO

Orientador: Jefferson Luis Braga da Silva

Co-orientador: Sady Selaimen da Costa

Dissertação apresentada à Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul para obtenção do
título de Mestre em Medicina e Ciências da Saúde
Área de concentração: Clínica Cirúrgica

**PORTO ALEGRE
2009**

F126e Fabrício, Daniela Dias.
 Efeito da terapia com células mononucleares de medula óssea em perfurações agudas de membrana timpânica / Daniela Dias Fabrício ; orient. Jefferson Luis Braga da Silva, co-orient. Sady Selaimen da Costa. Porto Alegre: PUCRS, 2008.
 64 f.: il. tab.

 Dissertação(Mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

 1. Perfuração da Membrana Timpânica. 2. Células Mononucleares. 3. Células da Medula Óssea. 4. Células-Tronco. 5. Cicatrização de Feridas. 6. Orelha Média. 7. Epidemiologia Experimental. I. Silva, Jefferson Braga da. II. Costa, Sady Selaimen. III. Título.

CDD 617.85
NLM WV 225

Bibliotecária Responsável:
Sabrina Caimi Silva da Costa
CRB10/1606

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha família, que sempre esteve do meu lado, incondicionalmente.

À minha mãe, Maria Elice Dias, a quem eu amo e admiro muito por sua força e alegria de viver, sempre contagiando ao seu redor.

Ao meu pai, João Aécio Corrêa Fabrício, por mostrar aos seus filhos a importância da dedicação e disciplina na formação profissional.

Ao meu irmão, Henrique Dias Fabrício, minha fonte de inspiração para a medicina e para otorrinolaringologia.

Ao meu sobrinho, Gustavo Fabrício, pelo seu sorriso lindo e seu abraço apertado.

Ao meu namorado, David Sena, pelo companheirismo e compreensão durante a execução desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Jefferson Luis Braga da Silva, meu orientador, por ter me acolhido como aluna no programa de pós-graduação desta instituição, e por despertar em mim o gosto pela pesquisa experimental.

Ao Dr. Sady Selaimen da Costa, meu co-orientador, que através da sua renomada experiência em otologia foi essencial para realização desta dissertação.

Ao Dr. Nédio Steffen, chefe do Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital São Lucas da PUCRS, um dos grandes responsáveis pelo meu crescimento profissional e acadêmico.

Ao Dr. Gerson Maahs, um dos mais importantes mestres que tive. A quem atribuo uma competência profissional e integridade pessoal irretocáveis.

Ao bioterista, Gilmar, por sua incansável dedicação com os animais e com os pesquisadores.

À Dra. Viviane Feller Martha, pela amizade e apoio na revisão desta dissertação.

Ao Dr. Zanol, pelo auxílio na análise histológica.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GERAL.....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
3.1 HISTOLOGIA DA MEMBRANA TIMPÂNICA	5
3.2 CICATRIZAÇÃO DA MEMBRANA TIMPÂNICA.....	6
3.3 ACELERAÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	8
3.4 CÉLULAS TRONCO.....	9
3.4.1 Células mononucleares de medula óssea	10
3.4.2 Células tronco em perfuração timpânica	11
3.5 MOBILIDADE TIMPÂNICA.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 MATERIAL.....	13
4.1.1 Delineamento	13
4.1.2 Amostra.....	13
4.1.3 Critérios de Exclusão	14
4.2 MÉTODOS	14
4.2.1 Preparação dos Animais.....	14
4.2.2 Extração de células mononucleares da medula óssea.....	14
4.2.3 Protocolo anestésico	15
4.2.4 Protocolo cirúrgico	15
4.2.5 Pós-operatório	16
4.2.6 Protocolo de avaliação	16
4.2.7 Eutanásia	17
4.2.8 Avaliação da mobilidade timpânica	18
4.2.9 Protocolo de análise histológica	18
4.2.9.1 Procedimento de retirada do material	18
4.2.9.2 Técnica de preparo do material	19
4.2.9.3 Avaliação histológica das lâminas.....	19
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
4.4 ASPECTOS ÉTICOS	20
5 RESULTADOS	21

5.1 EFEITO DA TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES	21
5.2 IMITANCIOMETRIA	22
5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA	23
6 DISCUSSÃO	25
7 CONCLUSÕES	29
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXO A. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).	35
ANEXO B. Normas de publicação da Revista Otology&Neurotology.	36
ANEXO C. Artigo submetido na Revista Otology & Neurotology	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMs	Células Mononucleares
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTs	Células Tronco
daPa	Decapascal
dB	Decibéis
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acetato
FCE	Fator de Crescimento Epitelial
FCF	Fator de Crescimento Fibroblástico
g	Gramas
gota/kg	Gota por quilograma
HE	Hematoxilina-Eosina
ISO	International Organization of Standardization
kHz	Quilohertz
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilograma
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MT	Membrana Timpânica
ng/ml	Nanograma por mililitro
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RNA	Ácido Ribonucléico
µg	Microgramas
µg/ml	Microgramas/ml
µm	Micrômetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempo de cicatrização da MT	21
Tabela 2. Timpanometria	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Acondicionamento dos animais	14
Figura 2. Tíbias e fêmures dos animais utilizados para a coleta da medula óssea	15
Figura 3. Perfuração total da <i>pars tensa</i> realizada com bisturi de miringotomia.	16
Figura 4. Aparência da MT no sétimo dia de cicatrização.....	17
Figura 5. Aparência da MT no décimo dia de cicatrização.....	17
Figura 6. Retirada da bula do osso temporal.....	19
Figura 7. Gráfico de Kaplan Meier mostrando o período de cicatrização da MT.....	21
Figura 8. Curva timpanométrica tipo A em ambas orelhas.....	23
Figura 9. Membrana timpânica cicatrizada junto ao cabo do martelo (coloração pela HE, aumento de 40X).	24
Figura 10. Reação fibroblástica da MT próxima à inserção no osso timpânico, com a presença de fibroblastos jovens (coloração HE, aumento de 100X).....	24

RESUMO**EFEITO DA TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM PERFURAÇÕES AGUDAS DE MEMBRANA TIMPÂNICA**

INTRODUÇÃO: As células mononucleares de medula óssea têm sido utilizadas em diversas patologias na tentativa de regeneração tecidual. O objetivo deste estudo foi avaliar o seu potencial efeito na cicatrização de perfurações agudas da membrana timpânica (MT).

MÉTODOS: Foram realizadas perfurações timpânicas bilateralmente por meio de miringotomia em 10 ratos *Wistar*. Células mononucleares de medula óssea foram utilizadas de um lado e solução fisiológica no lado contralateral. Avaliou-se o tempo de cicatrização, a mobilidade timpânica e a histologia.

RESULTADOS: O lado que utilizou células mononucleares cicatrizou em média 3 dias antes que o controle ($p=0,006$). Não houve diferença de mobilidade ou padrão histológico entre os grupos.

CONCLUSÃO: As células mononucleares de medula óssea proporcionaram uma cicatrização mais rápida da MT que o grupo controle.

Palavras-chave: perfuração de membrana timpânica, células mononucleares de medula óssea, células tronco, cicatrização de feridas, orelha média.

ABSTRACT**EFFECT OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS ON FRESH
TYMPANIC MEMBRANE PERFORATIONS**

INTRODUCTION: Bone marrow mononuclear cells have been utilized in tissue regeneration attempts in several pathologies. The aim of this study was to evaluate the potential healing effect of these cells in fresh tympanic membrane perforations.

METHODS: Bilateral myringotomy was performed in 10 *Wistar* rats. Bone marrow mononuclear cells were used in one side and physiologic solution (control) in the opposite side. We evaluated healing time, tympanic membrane mobility and histology.

RESULTS: The side where mononuclear cells were applied healed 3 days earlier than the control side ($p=0,006$). There was no difference in mobility or histology between groups.

CONCLUSION: Bone marrow mononuclear cells provided a faster tympanic membrane healing time when compared to a control group.

Keywords: tympanic membrane perforation, bone marrow mononuclear cells, stem cells, wound healing, middle ear.

1 INTRODUÇÃO

As perfurações da membrana timpânica têm como causa principal as infecções de orelha média. Sua prevalência atinge 1% a 3% da população norte-americana¹. Apresentam maior risco de tornarem-se crônicas de acordo com a agressividade dos patógenos, nas infecções sem tratamento adequado ou infecções de repetição. Isto se deve provavelmente à interferência no processo fisiológico de cicatrização pela inibição da atividade mitogênica local e pela grande concentração de proteases ativas². São consideradas crônicas quando não ocorre uma cicatrização espontânea após três meses de evolução, caracterizado histologicamente pela formação de uma junção escamo-cúbica, na qual o epitélio escamoso estratificado da camada externa encontra o epitélio cubóide simples da camada interna³.

A segunda maior causa de perfuração é o trauma, com uma prevalência de 0,6% da população norte-americana⁴. As perfurações traumáticas apresentam cicatrização espontânea em cerca de 80% dos casos⁵. A probabilidade de uma perfuração residual aumenta em perfurações amplas, naquelas que apresentam mecanismo térmico ou necrose tecidual extensa, e na presença de infecções associadas^{1,4}.

As manifestações clínicas da perfuração timpânica podem incluir perda auditiva condutiva com *gap* aéreo-ósseo variando de 10 a 40db, zumbido, plenitude auricular e infecções de repetição. Além disso, nos casos de perfuração marginal, pode ocorrer migração de tecido epitelial para a orelha média, podendo dar origem a uma otite média crônica colesteatomatosa^{6,7}.

Quando o fechamento espontâneo não ocorre, é indicado a miringoplastia, procedimento cirúrgico no qual é colocado enxerto autólogo, geralmente de fáschia do músculo temporal ou pericôndrio do tragus, a fim de reconstituir a membrana timpânica (MT). A cirurgia visa prevenir infecções de orelha média e restaurar a audição. Mesmo com uma técnica precisa e em mãos experientes ocorrem insucessos na integração do enxerto, dependendo das características da perfuração, principalmente, o tamanho, a localização, e a presença de timpanosclerose; além de fatores individuais que dificultem a cicatrização, como diabetes mellitus e a presença de infecções locais ou sistêmicas^{8,9,10}. Estudos retrospectivos e prospectivos de pacientes submetidos à

miringoplastia mostram sucesso na integração do enxerto variando de 75 a 97% independente da técnica utilizada⁸⁻¹². Apesar deste sucesso, deve ser lembrado que qualquer procedimento cirúrgico apresenta morbidades, desconforto ao paciente durante o período pós-operatório, além de representar custos à sociedade.

A faixa etária pediátrica é a mais acometida pelas otites médias agudas, e conseqüentemente apresenta maior incidência de perfuração timpânica. A cirurgia é indicada, geralmente, a partir dos sete anos de idade, devido ao risco cirúrgico de lesão do nervo facial, que se encontra muito superficial nas crianças menores, e aos cuidados pós-operatórios, difíceis de serem realizados nesta faixa etária. Isto significa que a criança permanece, em alguns casos, anos com a perfuração, sujeita a suas complicações¹².

Visando a diminuição da morbidade com o procedimento cirúrgico e na tentativa de evitar perfurações residuais, cada vez mais têm sido estudados métodos para aprimorar e acelerar a cicatrização da MT.

O processo de reparo e cicatrização é complexo, tanto nos casos traumáticos quanto em cirurgias, e envolve uma série de eventos celulares, mediados por proteínas que servem como mediadores químicos, estimulando a diferenciação celular e a migração tecidual. A maioria das pesquisas atuais está voltada para o uso de substâncias que aceleram ou induzam este processo de cicatrização. As substâncias mais estudadas atualmente são os fatores de crescimento, principalmente o fator de crescimento epitelial (FCE), e o fator de crescimento fibroblástico (FCF). Estas substâncias estimulam a síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA), proteínas e ácido hialurônico, produzindo um efeito mitogênico, que é essencial para o processo de cicatrização. O emprego destas substâncias nas perfurações timpânicas tem demonstrado bons resultados, apresentando fechamento mais precoce, tanto nas perfurações agudas quanto nas subagudas, ou seja, aquelas com evolução de 30 a 90 dias¹³⁻¹⁷.

A utilização de células tronco (CTs) em perfurações timpânicas começou a ser estudada recentemente, ainda com poucas pesquisas a cerca do assunto. Contudo, o seu emprego em diversas outras patologias tem obtido resultados promissores¹⁸.

As CTs são uma população de células precursoras teciduais imaturas capazes de auto-renovação e de produção ou substituição de células de vários tecidos. Existem, basicamente, duas modalidades de terapia celular com CTs: as CTs embrionárias, que derivam do blastocisto, e são pluripotentes; e as CTs somáticas adultas, consideradas multipotentes, pois apresentam diferenciação para alguns tipos celulares. Apesar das CTs embrionárias apresentarem um grande potencial de diferenciação, sua utilização tem se restringido principalmente por conflitos éticos. Já as CTs somáticas adultas têm apresentado importante expansão no campo da pesquisa, especialmente o emprego de células tronco de medula óssea ¹⁹.

As CTs de medula óssea apresentam facilidade na sua obtenção e podem ser utilizadas em sua forma mais primária, as chamadas células mononucleares (CMs), ou por processos de cultura são isoladas em linhagem mesenquimal ou hematopoiética^{20,21}. Seu uso tem sido relatado em orelha interna, na tentativa de regeneração de cócleas com perdas auditivas neurossensoriais, com bons resultados^{22,23}. O seu uso em orelha média ainda é pouco desenvolvido, com resultados controversos nos poucos estudos publicados²⁴⁻²⁶. O uso, especificamente, de CMs de medula óssea em perfurações timpânicas ainda não foi descrito na literatura.

Desta forma, com objetivo de proporcionar ou acelerar a regeneração da MT em perfurações agudas, a fim de diminuir a morbidade destes pacientes, impedindo que as perfurações se transformem em crônicas, e evitando um posterior tratamento cirúrgico, deseja-se avaliar o efeito das CMs de medula óssea nas perfurações agudas de MT. Este estudo pode contribuir para melhor compreensão, tratamento e diminuição de custos na abordagem desta patologia.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito da terapia com células mononucleares de medula óssea em perfurações agudas de membrana timpânica em modelo animal.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) comparar o tempo de cicatrização da membrana timpânica com células mononucleares de medula óssea em relação aos controles.
- b) avaliar a mobilidade da membrana timpânica cicatrizada.
- c) avaliar o padrão histológico da cicatrização da membrana timpânica.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 HISTOLOGIA DA MEMBRANA TIMPÂNICA

A MT é constituída por 3 camadas bem definidas: 1) a camada externa, composta por tecido epitelial escamoso, uma continuação do epitélio que recobre o conduto auditivo externo; 2) a camada média, chamada de lâmina própria ou estroma, composta por fibras colágenas de orientação radial e circular; 3) e a camada interna, mucosa, em continuação com a mucosa da cavidade timpânica. A *pars* flácida, região localizada entre os ligamentos tímpano-maleolares, não apresenta camada média²⁷.

As características ultra-estruturais da MT humana são semelhantes à dos ratos, o que muda, principalmente, são as dimensões. O diâmetro timpânico ântero-posterior nos ratos varia de 2,2 a 2,4 mm, enquanto no humano é de 8 a 10mm. Há uma grande área de *pars* flácida, correspondendo a quase 1/3 da *pars* tensa, e ela distende-se com a respiração, formando uma bolha que ocupa grande extensão da MT. Os ossículos são cerca de ¼ do tamanho dos humanos, e ficam quase totalmente escondidos no epítímpano. A mastóide é constituída por uma única célula aerada^{28,29}.

Knutsson *et al.*³⁰, realizaram análise imunohistoquímica da lâmina própria da MT de 10 ratos Sprague-Dawley. Observaram que a *pars* tensa é constituída predominantemente por colágeno tipo II e IV, a porção interna do ânulus por colágeno tipo II e a porção externa do ânulus por colágeno tipo III e IV.

Stenfeldt *et al.*³¹ avaliaram a estrutura de colágeno durante uma perfuração traumática e durante uma infecção induzida por *Streptococcus pneumoniae*, em ratos, e evidenciaram que após a miringotomia, na fase aguda da cicatrização, predominava colágeno tipo I e III no bordo da perfuração, e durante a infecção a camada de colágeno encontrava-se espessada e com abundante colágeno tipo II. Após 3 meses em ambos os grupos, colágeno tipo I,II e III estavam presentes nas membranas cicatrizadas.

3.2 CICATRIZAÇÃO DA MEMBRANA TIMPÂNICA

Em um estudo observando 227 perfurações traumáticas de MT em humanos, realizado por Griffin⁴, a cicatrização espontânea ocorreu em 40% das MT que apresentavam extensão de 50 a 70% da área. Além disso, 70% das perfurações cicatrizaram em 30 dias, caindo para 18% nos meses subseqüentes.

Kristensen⁵ em revisão realizada com 500 artigos sobre perfuração traumática, observou uma média de cicatrização espontânea de 80%, em um período de 3 meses, especialmente quando afeta menos de um quarto de sua área total. Quando ocorre mecanismo térmico envolvido no trauma este percentual cai para 39%. O tempo de cicatrização variou de 1 a 6 semanas.

O rato apresenta fechamento espontâneo de perfuração traumática de MT dentro de 1 a 4 semanas, especialmente nas primeiras duas semanas. O processo de reparo inicia com uma rápida cicatrização da camada epitelial externa, que serve de substrato para um posterior fechamento da camada média ou lâmina própria. A camada média perde a organização radial e circular de suas fibras colágenas e torna-se freqüentemente espessada. A camada epitelial externa e a camada mucosa interna retornam à espessura normal³². Segundo Johnson *et al.*³³ a camada interna mucosa parece não ter função significativa no reparo da MT.

Wang *et al.*³⁴ observaram a cicatrização de MT de 50 ratos, com perfurações de diferentes tamanhos e em diferentes regiões. Concluíram que o centro de geração epitelial ocorre no cabo do martelo e no ânulus, áreas que devem ser manipuladas com cuidado nas cirurgias de orelha média. Todas as MT cicatrizaram independente de tamanho ou localização, mesmo quando danificado o cabo do martelo. O mesmo padrão de geração epitelial foi visto em um estudo de Kako *et al.*³⁵, com predominância no ânulus e no cabo do martelo. Além disso, observaram que o padrão de migração epitelial vai do cabo do martelo para o ânulus, e as células geradas no ânulus migram para o conduto auditivo externo. Não foi encontrada evidência de geração epitelial na *pars flácida*.

Rahman *et al.*³⁶ estudaram as propriedades mecânicas da MT após cicatrização de perfurações traumáticas em ratos, e observaram que após 2 semanas a elasticidade é restabelecida apesar da falta de orientação das fibras colágenas.

Bigelow *et al.*³⁷ realizaram um estudo para observar a funcionalidade da MT após sua cicatrização, e observaram que as alterações de baixa frequência na transmissão sonora que ocorrem com a perfuração timpânica foram reversíveis após a cicatrização. No entanto, o processo de cicatrização afetou a transmissão sonora nas altas frequências, entre 5.0 e 40.0 kHz. Também observaram fechamento completo da perfuração entre 7 e 11 dias, nos 5 ratos estudados, apesar de terem realizado uma perfuração extensa, envolvendo toda a *pars tensa*.

Em um estudo com objetivo de avaliar a cicatrização no diabetes, Vrabc³⁸ comparou o tempo de cicatrização completa de perfurações realizadas no quadrante posterior da MT em 24 ratos. Dividiu em 3 grupos: a) grupo controle; b) diabetes tipo I; e c) diabetes tipo II. O tempo médio de cicatrização foi de oito, nove e onze dias respectivamente. Comparando os grupos se observou uma diferença estatisticamente significativa, com maior tempo de cicatrização nos ratos com diabetes tipo II.

O plasminogênio, proteína plasmática implicada no processo de coagulação, parece apresentar um papel importante no processo de remodelamento tecidual na cicatrização. A cicatrização da MT é uma cadeia de eventos inflamatórios bem organizada, com invasão inicial de células inflamatórias, seguido por fases de reparação e regeneração. Li *et al.*³⁹ mostraram que em ratos com deficiência de plasminogênio a cicatrização da MT está totalmente estagnada. Não foi evidenciada cicatrização após 143 dias de observação. Houve recrutamento de células inflamatórias, mas não ocorreu regeneração tecidual. Além disso, remoção de fibrina, migração de queratinócitos e tecidos de crescimento estiveram diminuídos. Contrasta com estudos em pele que mesmo sem o plasminogênio, a cicatrização atrasa, mas ocorre. Isso leva a crer que o complexo plasminogênio/plasmina tem papel maior na cicatrização timpânica que na pele.

3.3 ACELERAÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

Vários métodos ao longo dos anos têm sido desenvolvidos e pesquisados com objetivo de induzir ou acelerar o processo de cicatrização da MT^{13,40,41}.

A cauterização química dos bordos da perfuração com ácido tricloroacético, é um método simples, utilizado em consultório, cujo mecanismo é baseado na remoção do epitélio escamoso do bordo da perfuração, estimulando a reparação por fibroblastos. Apresenta bons resultados somente em perfurações pequenas a moderadas⁴².

Os fatores de crescimento teciduais vêm sendo utilizados como estimuladores de cicatrização em diversas áreas. Os tipos mais estudados em perfuração timpânica são o FCE, e o FCF¹³⁻¹⁷.

Os fatores de crescimento são polipeptídeos liberados pelo sangue ou tecidos que estimulam a migração e proliferação celular, desencadeando uma cascata enzimática de eventos intracelulares que promovem a diferenciação celular, a produção de matriz extracelular e a angiogênese. Estas substâncias estimulam a síntese de DNA, RNA, proteínas e ácido hialurônico, produzindo um efeito mitogênico, o que é essencial para o processo de cicatrização¹⁵.

O'Daniel *et al.*⁴³ foram os pioneiros na pesquisa de expressão de FCE na MT em um estudo realizado em porcos, e evidenciaram receptores específicos com alta afinidade em todas as camadas da MT, especialmente no epitélio escamoso.

Güneri *et al.*¹⁴ realizaram perfuração no quadrante póstero-superior de 30 ratos aleatoriamente divididos em quatro grupos de tratamento: ácido hialurônico, FCE, Mitomicina C e controle. O tempo médio de cicatrização foi de 8,8 dias no grupo tratado com ácido hialurônico, 7,4 dias com FCE e 15 dias nas orelhas controle. O grupo da mitomicina C não apresentou cicatrização em 60 dias de observação.

As drogas indutoras do fluxo sanguíneo também têm sido estudadas como aceleradores da cicatrização, especialmente em tecidos com pouca vascularização. A droga mais utilizada deste grupo é a pentoxifilina, que atua aumentando o fluxo sanguíneo e diminuindo a tensão do oxigênio tecidual por modificação das

características hemorreológicas do sangue. Estudos experimentais realizados com retalhos miocutâneos demonstraram melhor viabilidade dos retalhos com seu uso⁴⁴.

Ramalho *et al.*¹⁷ em um estudo com perfurações subagudas em 40 orelhas de chinchilas divididas em 4 grupos: pentoxifilina, FCE, FCE e pentoxifilina e controle, observaram um aumento na cicatrização apenas no grupo com FCE, os demais grupos foram semelhante ao controle.

3.4 CÉLULAS TRONCO

O conceito atual de manejo terapêutico em diversas doenças tem sido revolucionado pelo progressivo entendimento da terapia com CTs. A potencialidade biológica de tais células vem sendo estudada e explorada de maneira promissora na área da engenharia tecidual.

As CTs iniciaram seu processo terapêutico através do transplante de medula óssea em pacientes com leucemias ou linfomas, e foi através desta experiência que suas propriedades foram estabelecidas. Representam uma população de células precursoras teciduais imaturas, que apresentam pelo menos duas características fundamentais: a auto-renovação, capacidade de produzir cópias idênticas a si mesmo; e a multipotencialidade, habilidade de se diferenciar em células altamente especializadas^{18,19}.

Atualmente, existem duas modalidades mais utilizadas de terapia celular com CTs: as CTs embrionárias, que derivam do blastocisto; e as CTs somáticas adultas⁴⁵.

As CTs embrionárias são obtidas da massa celular interna do embrião e possuem a capacidade de se diferenciar em tipos celulares dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma), essa característica é chamada de pluripotencialidade. O isolamento destas células ocorreu inicialmente em 1998, e desde então aumentam progressivamente as pesquisas nesta área, envolvendo melhorias nas condições de cultura, manipulação genética e indução e diferenciação em diversos tecidos. Apesar de serem consideradas as mais promissoras das CTs, em razão da sua pluripotencialidade, o conhecimento atual não permite sua aplicação clínica, especialmente pelo risco de formação de tumores resultantes da diferenciação

desorganizada destas células⁴⁶. Além disso, seu uso terapêutico tem gerado conflitos éticos e legais, em razão de serem obtidas de embriões humanos.

As CTS somáticas adultas são células indiferenciadas presentes entre células diferenciadas em tecidos ou órgãos, podendo se renovar e se diferenciar em células especializadas. São consideradas multipotentes, ou seja, podem originar vários outros tipos celulares, mas em número limitado. O papel principal de uma célula tronco adulta em um organismo vivo é manter e reparar o tecido no qual se encontram. Vários estudos nos últimos anos têm demonstrado que estas células são capazes de originar tipos celulares de um tecido completamente diferente ao seu de origem, um fenômeno conhecido como plasticidade. Exemplo deste fenômeno são células mesenquimais de medula óssea que se transformam em neurônios, ou células hematopoiéticas que se transformam em cardiomiócitos^{18,19,22}.

As CTs de medula óssea são as CTs adultas mais utilizadas em terapia celular, especialmente pela facilidade de sua obtenção.

3.4.1 Células mononucleares de medula óssea

As células da medula óssea podem sofrer dois processos de diferenciação: as células mononucleares e as multinucleares. As CMs são células indiferenciadas que podem dar origem tanto à células da linhagem hematopoiética quanto à linhagem mesenquimal²¹.

Alguns estudos em regeneração tecidual e cicatrização utilizam células mesenquimais, outros hematopoiéticas e outros ainda, a porção mais primária – as CMs. Existem métodos e custos distintos de isolamento destas frações celulares da medula óssea. A fonte mais acessível para terapia com CTs são as CMs⁴⁷.

Existem muitas dúvidas a cerca de qual fração celular apresenta maior plasticidade, implicando em melhores resultados na regeneração tecidual. Segundo Gowdak *et al.*⁴⁸, a utilização de um conjunto de células, como as CMs, seria melhor que um único tipo celular, acreditando que estas células dariam o primeiro suporte à proliferação e à manutenção das CTs.

Em um estudo realizado por Guarita-Souza *et al.*²⁰, comparando o uso de células mesenquimais ou mononucleares de medula óssea no infarto agudo do miocárdio, concluiu que ambos os tipos celulares, mostraram regeneração vascular e estabilização da fração de ejeção.

A principal desvantagem das CTs mesenquimais de medula óssea é o tempo de cultura para sua obtenção que é de aproximadamente 20 dias. Já as CMs podem ser utilizadas cerca de uma a duas horas após a coleta da medula óssea, tornando factível seu uso em patologias agudas como perfurações traumáticas, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico e também durante o período transoperatório^{20,21}.

Em vista da facilidade de obtenção, do baixo custo e da possibilidade de utilização rápida das CMs optou-se por esta fração celular de medula óssea nesta pesquisa.

3.4.2 Células tronco em perfuração timpânica

Von Unge *et al.*²⁴ utilizaram CTs embrionárias para o tratamento de perfuração aguda de membrana timpânica em esquilos da Mongólia e evidenciaram através de imunofluorescência a presença de CTs na MT cicatrizada. Além disso, realizaram interferometria de Moiré, método utilizado para avaliar a deformação da MT durante a pressurização, e verificaram que a MT sob tratamento com CTs apresentava maior resistência à pressão que o grupo controle.

Rahman *et al.*²⁶ utilizaram 17 ratos Sprague-Dawley, e realizaram perfurações timpânicas bilaterais. De um lado utilizaram CTs embrionárias, e no lado contralateral solução fisiológica, como controle. Observaram que não houve diferença quando ao tempo de cicatrização e quanto à resistência da MT comparando os lados.

Em outro estudo, Rahman *et al.*²⁵ criaram modelo de perfuração timpânica crônica em 10 ratos Sprague-Dawley através da utilização de corticóide na lesão. Em 8 semanas 4 das MT tratadas com CTs embrionárias cicatrizaram enquanto que no grupo controle somente 1 MT apresentou fechamento.

Não há nenhum estudo na literatura que utilize a fração mononuclear da medula óssea em perfurações timpânicas em modelo animal ou humano, razão do inusitado desta pesquisa.

3.5 MOBILIDADE TIMPÂNICA

A mobilidade timpânica e as condições funcionais da orelha média podem ser avaliadas através da imitanciometria ou, também chamada, timpanometria. É um método diagnóstico onde é medida a capacidade que a membrana possui de refletir um som introduzido no meato acústico externo, em resposta a graduais modificações de pressão no conduto auditivo externo. É representada graficamente por uma curva, que leva em consideração a pressão e a complacência.

A complacência acústica é realizada quantificando-se a energia sonora refletida pela membrana. Quando o sistema do ouvido médio está endurecido maior quantidade de energia será refletida. Quando a energia refletida é menor, isso significa que maior nível de energia é absorvido pelo sistema e que o sistema está flácido.

A classificação das curvas timpanométricas foi determinada segundo Jerger⁴⁹:

a) curva A: pico máximo ao redor de zero daPa de pressão. Caracteriza uma curva normal, ou seja, com mobilidade preservada.

Esta condição pode gerar dois tipos de resultados classificados como Ar (de rigidez), que ocorre quando há uma diminuição da complacência, em média menor que 0,28 ml, significando rigidez de cadeia ossicular; e Ad (de desarticulação) quando não ocorre pico de complacência, sugerindo uma disjunção de cadeia ossicular ou um tímpano com zonas de neotímpano mais flácidas.

b) curva B: curva mostra-se plana, inalterada mesmo que as variações de pressão no conduto auditivo externo sejam grandes. Representa líquido na orelha média.

c) curva C: seu ponto de máxima complacência fica deslocado para pressões muito negativas, além de -100 daPa. Caracteriza disfunção tubária.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Delineamento

Trata-se de um estudo experimental controlado realizado em modelo animal.

4.1.2 Amostra

Foram utilizados 14 ratos albinos da espécie *Wistar*, isogênicos, pesando entre 250 e 300 g. Dois ratos, machos, foram utilizados como doadores da medula óssea, e 12 ratas, fêmeas, utilizadas para o protocolo de intervenção. Esta diferença de sexo ocorreu em decorrência da possibilidade de identificação, através da hibridização, de CMs dos doadores na MT dos receptores. A seleção deste animal baseou-se na semelhança anatômica da MT de ratos e humanos, segundo trabalho de Judkins e Li²⁹.

Os animais foram adquiridos no biotério da PUCRS, dispostos em gaiolas individuais e receberam água e ração *ad libidum* (Figura 1). Foi respeitado ciclo biológico claro/escuro de 12 horas. A manipulação dos animais foi realizada somente pelo pesquisador e pelo bioterista, em ambiente silencioso e com temperatura controlada (22°C).

O experimento foi realizado no Laboratório de Microcirurgia da Faculdade de Medicina da PUCRS.



Figura 1. Acondicionamento dos animais

4.1.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos animais com infecção de orelha externa ou média ou sinais de retração da MT.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação dos Animais

Cada animal selecionado foi disposto em uma gaiola individual identificada. Os animais foram submetidos a jejum de 8 horas previamente a cada procedimento anestésico.

4.2.2 Extração de células mononucleares da medula óssea

A extração das CMs da medula óssea do rato doador foi realizada após o sacrifício do mesmo com overdose de tiopental (30mg/kg). A coleta da medula óssea foi feita a partir da tíbia e fêmur do animal (Figura 2). Para a separação das células mononucleares, o sangue obtido da medula óssea foi diluído em meio RPMI 1640 (1:1) (Gibco®, EUA). Esta suspensão foi fracionada em um gradiente de densidade gerado

por centrifugação sobre Histopaque® na densidade de 1,077g/L (Sigma-Aldrich®, EUA) a 400g durante 30 minutos a 25°C. A fração mononuclear situada sobre a interface com o Histopaque® foi coletada e lavada duas vezes com solução salina 0,9% estéril. Foi realizada contagem celular em câmara de Neubauer a fim de obter densidade 10^6 células por ml. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com Trypan Blue Stain 0,4% (Gibco, EUA), apresentando 99% de células viáveis.



Figura 2. Tíbias e fêmures dos animais utilizados para a coleta da medula óssea

4.2.3 Protocolo anestésico

A indução anestésica foi realizada com o animal sob contenção e em decúbito dorsal. Os anestésicos foram aplicados por via intraperitoneal utilizando seringa e agulha de insulina. Foram administrados 0,2 mg de clorpromazina associado à 0,8 mg de quetamina (4 mg/kg).

4.2.4 Protocolo cirúrgico

Os animais foram dispostos em decúbito lateral direito ou esquerdo a depender da orelha sob intervenção.

Foi posicionado o microscópio óptico (D.F. Vasconcelos®) e introduzido cone otológico a fim de visualizar a MT. Realizamos a perfuração da MT, com bisturi de

miringotomia, em toda extensão da *pars tensa*, partindo do cabo do martelo em direção do ânulus timpânico, a fim de padronizar todas as perfurações (Figura 3). O mesmo procedimento foi repetido no lado contralateral.

No lado esquerdo foram introduzidas 0,2 ml células mononucleares de medula óssea, obtidos de um rato doador do sexo masculino, na concentração de 10^6 /ml, emersas em gel-foam, entrando em contato direto com a perfuração, encobrimo-a. O lado direito foi o controle, sendo utilizado gel-foam com soro fisiológico. Não foram utilizados antibióticos no experimento.



Figura 3. Perfuração total da *pars tensa* realizada com bisturi de miringotomia.

4.2.5 Pós-operatório

Após o procedimento os animais ficaram em observação por uma hora. Foram devolvidos para suas gaiolas quando bem acordados e com débito urinário presente.

4.2.6 Protocolo de avaliação

A cada dois dias os animais foram anestesiados com metade da dose descrita no protocolo anestésico, a fim de visualizar as MTs (Figuras 4 e 5). Assim determinamos o dia mais aproximado em que ocorreu o fechamento da MT em cada lado.



Figura 4. Aparência da MT no sétimo dia de cicatrização



Figura 5. Aparência da MT no décimo dia de cicatrização

4.2.7 Eutanásia

A eutanásia foi realizada com injeção intraperitoneal de tiopental (30mg/kg). Após o óbito e a remoção da peça para histologia os animais foram desprezados em lixo hospitalar.

4.2.8 Avaliação da mobilidade timpânica

Cinco ratos foram escolhidos aleatoriamente para realizar avaliação da mobilidade timpânica e a funcionalidade da orelha média através da imitanciometria. Foi realizada sedação com a metade da dose do protocolo anestésico. Foi utilizado o imitanciômetro Interacoustics® (impedance audiometer AZ26), calibrado de acordo com ISO9001. Inicialmente foi introduzida uma oliva para vedação do conduto auditivo externo ligada ao imitanciômetro, a seguir foi acionado o comando para emitir pressão e foi registrada a curva timpanométrica de cada lado. A classificação das curvas foi determinada segundo Jerger⁴⁹.

4.2.9 Protocolo de análise histológica

Seis animais foram escolhidos aleatoriamente para a análise histológica das membranas timpânicas com o objetivo de avaliar qualitativamente o processo de cicatrização em casos e controles. Dois animais foram analisados com 14 dias de evolução, ou seja, período precoce do fechamento, dois com 1 mês após a cicatrização da perfuração e os outros dois com 2 meses de cicatrização.

4.2.9.1 Procedimento de retirada do material

Após a eutanásia foi realizada incisão interauricular na pele da região correspondente à porção posterior das bulas dos ossos temporais, via de acesso cirúrgico à orelha média dos ratos. Após o afastamento dos músculos adjacentes a bula foi identificada, dissecada e retirada através de broca cirúrgica de 2mm (Figura 6). Após a remoção foi imersa em formaldeído a 37%.

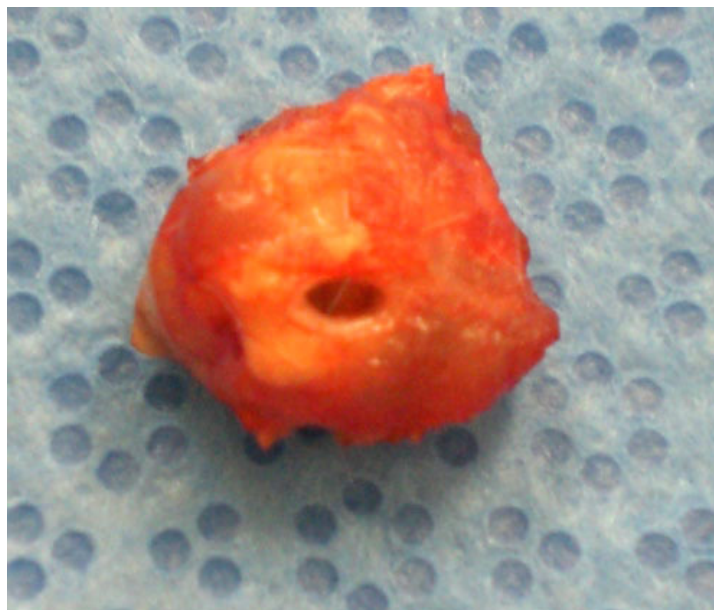


Figura 6. Retirada da bula do osso temporal

4.2.9.2 Técnica de preparo do material

Através de dissecação anatômica as MTs foram desinseridas da bula e fixadas em formaldeído a 37% tamponado por 24 horas. Após este período ocorreu a descalcificação em solução de etileno diamino tetra acetato (EDTA) a 5% por duas semanas. As amostras foram então incluídas em blocos de parafina, e submetidas a cortes longitudinais ao plano coronal com 6 μ m de espessura, com o auxílio do micrótomo. Posteriormente foram transferidas para lâminas de vidro, colocadas em estufa a 60⁰C por uma hora para secagem, e a seguir desparafinadas e hidratadas com banhos sucessivos de xilol, álcool e água. Por fim foi realizada a coloração com hematoxilina-eosina (HE).

4.2.9.3 Avaliação histológica das lâminas

As lâminas foram avaliadas por um patologista do Serviço de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS através de microscopia óptica. Inicialmente foi utilizado aumento panorâmico para identificação de todos os campos e a seguir em aumentos de 40, 100 e 400 vezes. Foram observados os seguintes fatores morfológicos: hiperplasia epitelial, presença de infiltrado inflamatório, caracterização dos fibroblastos (jovens ou maduros), hiperplasia de camada mucosa.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo da amostra foi realizado com o auxílio de programa estatístico (Graph Pad Stat Mate – versão 2.0), com base em estudo piloto prévio com 5 animais, cuja diferença entre o grupo tratado e o controle foi de quatro dias, apresentando um desvio padrão de quatro, utilizando nível de significância $p=0,05$ e poder estatístico de 90%.

Os dados obtidos na pesquisa foram digitados em uma planilha eletrônica (Microsoft Office Excel 2003), checados quanto à consistência dos dados a fim de corrigir possíveis erros de digitação. Devido à distribuição assimétrica dos dados foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon, com auxílio do programa estatístico SPSS 14.0. Adotou-se nível de significância $p=0,05$ e poder estatístico de 90%.

A análise histológica e as curvas timpanométricas foram somente descritivas.

4.4 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o protocolo de pesquisa n° 07/04000 (Anexo A). A pesquisa foi realizada com base nas normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)⁵⁰. Também seguiu a lei número 11.794, de 8 de outubro de 2008, que estabelece normas para o uso científico de animais⁵¹.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DA TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES

Todos os animais apresentaram cicatrização completa da MT em 15 dias. A média do fechamento do lado direito, em que foi utilizado soro fisiológico foi de 13 dias, com desvio padrão de 1,47, enquanto, no lado esquerdo, cuja terapia com CMs de medula óssea foi utilizada foi de 10,17 dias, com desvio padrão de 1,33 (Tabela 1 e Figura 7). A diferença observada entre os grupos mostrou-se estatisticamente significativa ($p=0,006$).

Tabela 1. Tempo de cicatrização da MT

Tempo de cicatrização (em dias)	CM	SF	P
Média	10,17	13	0,006*
Desvio padrão	1,33	1,47	
Mínimo	9	11	
Máximo	13	15	

CM: células mononucleares; SF: soro fisiológico

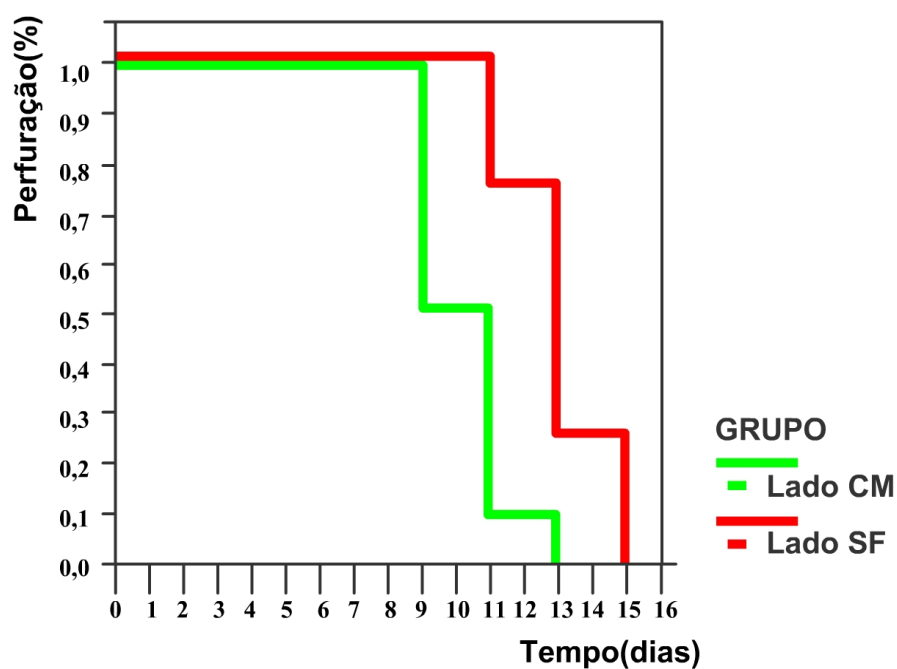


Figura 7. Gráfico de Kaplan Meier mostrando o período de cicatrização da MT

5.2 IMITANCIOMETRIA

Entre as 10 orelhas testadas, 7 apresentaram curva A, 2 mostraram Ar (no mesmo animal), e 1 curva C.

A média da complacência nas orelhas que utilizaram CMs foi de 0,39 ml, enquanto a média de pressão foi de -73,6 daPa. No lado controle observamos 0,44 ml de complacência e -53 daPa de pressão (Tabela 2). Não houve diferença estatística entre os lados.

Tabela 2. Timpanometria

Rato	Substância	Complacência (ml)	Curva	Pressão (daPa)
Rato 1	CM	0,36	A	-95
	SF	0,42	A	-74
Rato 2	CM	0,25	Ar	-23
	SF	0,26	Ar	-32
Rato 3	CM	0,37	A	-59
	SF	0,32	A	-75
Rato 4	CM	0,42	C	-104
	SF	0,74	A	-72
Rato 5	CM	0,58	A	-41
	SF	0,46	A	-12
Média	CM	0,39	-	-73,6
	SF	0,44	-	-53

CM: células mononucleares; SF: soro fisiológico

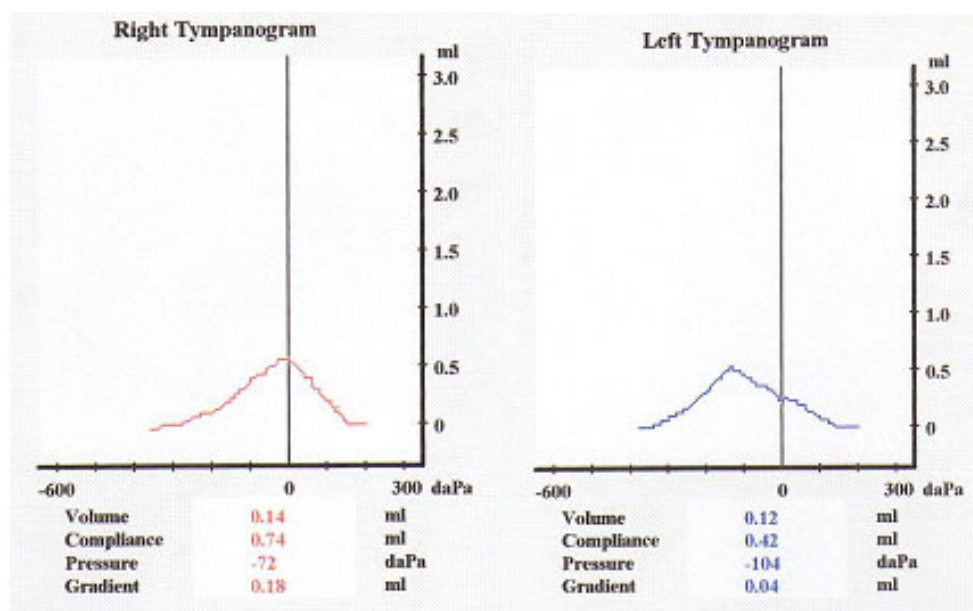


Figura 8. Curva timpanométrica tipo A em ambas orelhas.

5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Seis animais, num total de 12 orelhas, foram submetidos à análise histológica. Foram analisados 2 animais com 14, 30 e 60 dias após a perfuração timpânica.

As lâminas observadas com 14 dias de evolução apresentavam importante proliferação fibroblástica e infiltrado inflamatório, além de hiperplasia da camada epitelial. Nas orelhas analisadas com 30 e 60 dias não foi evidenciado infiltrado inflamatório ou hiperplasia epitelial, somente a presença de fibroblastos jovens e tecido conetivo (Figuras 9 e 10). Não foi encontrada hiperplasia da camada mucosa em nenhuma das MT cicatrizadas. Não houve diferenças nas características histológicas entre os grupos.

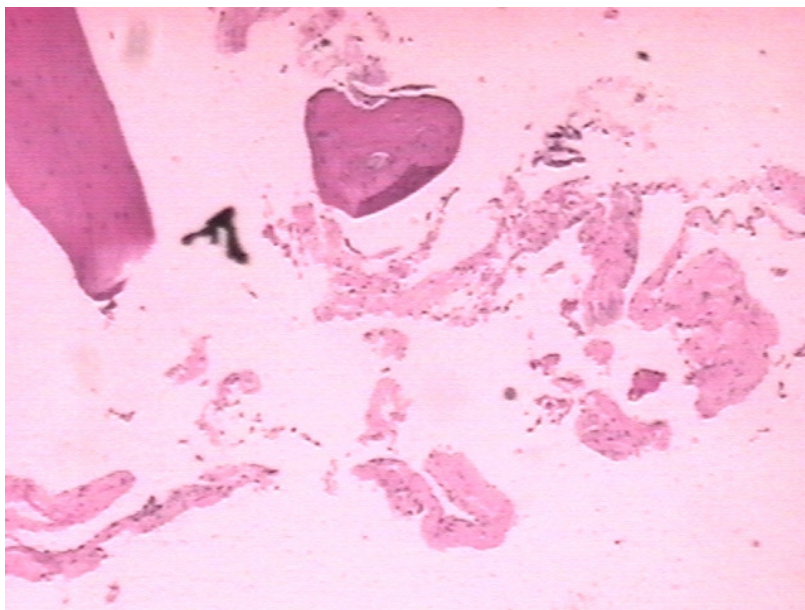


Figura 9. Membrana timpânica cicatrizada junto ao cabo do martelo (coloração pela HE, aumento de 40X).

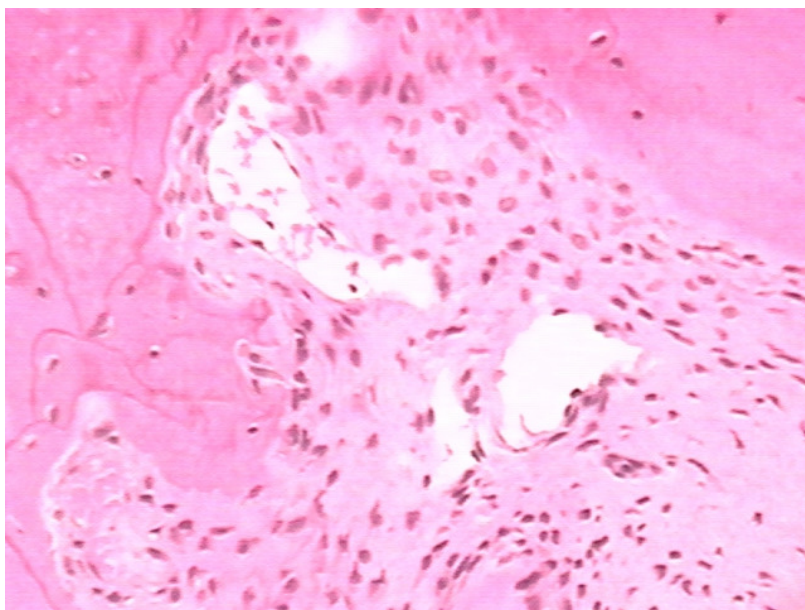


Figura 10. Reação fibroblástica da MT próxima à inserção no osso timpânico, com a presença de fibroblastos jovens (coloração HE, aumento de 100X)

6 DISCUSSÃO

As perfurações timpânicas causam diversos prejuízos aos pacientes e à sociedade. A prevalência exata desta patologia não é conhecida, mas sabe-se que em países em desenvolvimento se pode verificar até 12% de prevalência nas áreas menos favorecidas²⁶.

O objetivo inicial do presente estudo foi avaliar a possibilidade de oferecer aos pacientes com perfurações agudas de MT, um procedimento clínico ambulatorial, na tentativa de proporcionar alívio mais rápido dos sintomas e dos riscos de perfuração residual, através da cicatrização mais precoce. Desta forma, optou-se pelo estudo de CMs de medula óssea devido à sua reprodutibilidade na prática clínica, já que é um método de fácil obtenção, baixo custo e a vantagem de ser autólogo.

O modelo animal escolhido decorre da semelhança anatômica da orelha média do rato com a do humano e pela facilidade de manejo e cuidados com a espécie²⁹. Diversos estudos sobre cicatrização de MT utilizaram o rato como modelo¹³⁻¹⁶.

Os animais utilizados na pesquisa eram geneticamente iguais, evitando qualquer risco de rejeição das células utilizadas.

A escolha do gel-foam ocorreu pela necessidade de um veículo capaz de manter a solução utilizada em contato direto com a MT, além de evitar o escape da solução através do conduto auditivo externo.

O efeito final do tratamento sobre as perfurações de MT foi diferente entre os grupos. Ocorreu uma cicatrização mais precoce em 3 dias nas orelhas que utilizaram as células mononucleares.

Sabe-se que a cicatrização dos tecidos nos ratos é mais precoce que em humanos. Não existem estudos específicos para avaliar quanto realmente significa estes 3 dias em relação à cicatrização da MT em humanos. Mas diversos estudos demonstram que a cicatrização espontânea da MT em ratos varia de 5 a 30 dias, enquanto no humano varia de 7 a 90 dias, dependendo do tamanho da perfuração. Utilizando o critério que se aplica na maioria dos tecidos, em que ocorre uma cicatrização 3 vezes mais rápida no rato, pode-se inferir que a cicatrização das

perfurações agudas de MT em humanos poderia atingir um fechamento mais precoce em até 9 dias com a utilização desta terapia.

Estes achados não podem ser comparados diretamente aos de outros autores que utilizaram CTs. Os demais artigos descritos com o uso de CTs em perfuração timpânica agudas utilizaram CTs embrionárias. Sabe-se que o potencial destas células em diferenciação é maior do que a utilização de CMs de medula óssea, mas apresentam a grande desvantagem do desconhecimento dos efeitos à longo prazo relacionados com seu crescimento desorganizado, podendo dar origem à tumores. Além disso, apresentam conflitos éticos em algumas sociedades.

Von Unge *et al.*²⁴ no primeiro estudo realizado com CTs em perfurações de MT utilizam metodologia diferente desta para avaliação da cicatrização da MT. Foram utilizados 5 esquilos da Mongólia, e avaliou-se as perfurações somente até o quinto dia de evolução. Verificou-se que todas as MT submetidas às CTs embrionárias apresentaram cicatrização, o que ocorreu em somente 2 MT do grupo controle. No entanto é um grupo muito pequeno para qualquer conclusão, e os resultados não demonstraram significância estatística. É provável que esta cicatrização tenha sido de forma tão precoce em decorrência do tipo de perfuração realizada, já que os autores utilizaram perfurações do quadrante inferior da *pars tensa*. Além disso, foi possível observar através da microscopia eletrônica em 3 MT, a existência de CTs obtida através de células marcadas com proteína fluorescente verde.

Neste estudo não foi analisado o potencial de integração das células mononucleares à MT devido aos custos de uma hibridização. Em decorrência disto pode-se discutir se o efeito obtido foi em razão das CMs propriamente ditas ou devido à liberação de fatores estimulantes da cicatrização pelas mesmas; e se realmente ocorreu uma diferenciação desta célula *in situ*. Estas dúvidas podem ser elucidadas em estudos subsequentes a fim de avaliar a quantidade de células que realmente aderem à MT e em que tipo de célula elas se diferenciam.

Em outro estudo com CTs embrionárias em perfurações agudas de MT, Rahman *et al.*²⁵ não observaram benefício com esta terapia. Posteriormente, este mesmo autor realizou um modelo de perfuração crônica em ratos *Sprague-Dawley*, e utilizou CT mesenquimais de medula óssea. Observou que 40% das perfurações fecharam com o

uso de CTs mesenquimais comparado com 10% dos controles, mas não houve significância estatística devido ao número pequeno de animais estudados²⁶.

Durante o projeto piloto tentou-se reproduzir um modelo de perfuração crônica com o uso de corticóide local conforme Rahman *et al.*²⁶, mas todas as perfurações fecharam antes de completar 1 mês. Como as perfurações traumáticas apresentam alta taxa de cicatrização espontânea, o ideal seria utilizar um modelo de perfuração crônica para poder avaliar a indução da cicatrização e não somente a aceleração, conforme foi avaliado neste estudo. No entanto, o fato de acelerar este processo ajuda a evitar que perfurações agudas evoluam para cronicidade.

O estudo que mais se aproxima desta metodologia foi de Vrabc *et al.*¹³, que utilizou FCF para acelerar a cicatrização em perfurações agudas de ratos. O fechamento da MT ocorreu em média 4 dias mais rápido com o uso do FCF. Não foram encontradas diferenças nos padrões histológicos entre os grupos nos primeiros meses, mas observaram que com 5 meses de evolução a espessura da MT cicatrizada com FCF era menor.

No entanto, Mondaim *et al.*¹⁶ em um estudo histológico da cicatrização da MT após o tratamento com FCF não observaram diferenças entre os grupos tanto no tempo de cicatrização quanto na sua histologia.

Na análise histológica observou-se que com 14 dias de evolução havia hiperplasia do tecido epitelial na MT cicatrizada, o que concorda com outros estudos que demonstram que o tecido epitelial é a primeira barreira a dar início à cicatrização da MT, servindo de substrato para as demais camadas. Além disso, verificou-se células inflamatórias e importante reação fibroblástica, compatível com a fase aguda da cicatrização. Já com 30 e 60 dias encontrou-se a presença de fibroblastos jovens e tecido conectivo. Não se observou hiperplasia da camada mucosa em nenhuma das orelhas, o que vai ao encontro com outros estudos que demonstram que este tipo celular não faz parte do processo de cicatrização precoce^{13,14,37}.

Não foram verificadas diferenças na histologia entre os grupos, mas o número limitado de animais permitiu somente uma análise descritiva, sem parâmetros

estatísticos. Estudos de avaliação tardia seriam interessantes a fim de avaliar a cicatrização a longo prazo.

Ao investigar a aceleração do processo de cicatrização da MT, deve-se lembrar da funcionalidade desta MT, já que espessamento, diminuição da complacência e flacidez são fatores que podem determinar uma piora na audição, assim como predispor a retrações e a colesteatoma. A timpanometria pode ser considerada o método mais objetivo de avaliação funcional da MT. Neste estudo não foram observadas diferenças na timpanometria entre os grupos. A maioria dos animais apresentou curva A, mostrando uma adequada mobilidade timpânica após a cicatrização. Os resultados sugerem que a aplicação de CMs não interfere com a mobilidade timpânica. Clymer *et al.*⁷ mostraram uma tendência maior a curva A nas MT tratadas com fator de crescimento queratinócito, mas sem significância estatística. Outros estudos mostraram que independente da substância utilizada para acelerar a cicatrização a funcionalidade permanece semelhante à do controle^{13,14,24,25}.

No presente estudo observou-se uma cicatrização mais precoce com o uso de CMs de medula óssea em perfurações agudas de MT. Este resultado pode abrir novas perspectivas para o tratamento desta patologia. Estudos subsequentes são necessários para avaliar este efeito em perfurações crônicas.

7 CONCLUSÕES

a) As células mononucleares de medula óssea proporcionaram uma cicatrização mais rápida da membrana timpânica em comparação aos controles.

b) A mobilidade da membrana timpânica não foi alterada após a cicatrização independente da substância utilizada.

c) Não foram observadas diferenças no padrão histológico com o uso de células mononucleares de medula óssea em relação ao controle.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gladstone HB, Jackler RK, Varak K. Tympanic membrane wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am.* 1995; 28(5):913-32.
2. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg.* 1993; 166(1):74-1.
3. Spandow O, Hellstrom S, Dahlstrom M. Structural characterization of persistent tympanic membrane perforations. *Laryngoscope.* 1996; 106(3 Pt 1):346-52.
4. Griffin WL, Jr. A retrospective study of traumatic tympanic membrane perforations in a clinical practice. *Laryngoscope.* 1979; 89(2Pt1):261-82.
5. Kristensen S. Spontaneous healing of traumatic tympanic membrane perforations in man: a century of experience. *J Laryngol Otol.* 1992; 106: 1037-50.
6. Costa, SS. Otite Média Crônica Não-colesteatomatosa. *Tratado de Otorrinolaringologia.* 1ª edição. São Paulo: Roca; 2002.
7. Clymer MA, Schwaber MK, Davidson MJ. The effects of keratinocyte growth factor on healing of tympanic membrane perforations. *Laryngoscope.* 1996; 106:280-5.
8. Sheehy JL, Anderson RG. Myringoplasty. A review of 472 cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1980;89(4 Pt 1):331-4.
9. Caldas Neto S, Bunzen D, Campos A, Sperandio F. Influência dos achados intra-operatórios no resultado anatômico das miringoplastias. *Arq Int Otorrinolaringol.* 2006; 10(4):284-8.
10. Rizer FM. Overlay versus underlay tympanoplasty. Part I: historical review of the literature. *Laryngoscope.* 1997; 107(12Pt2):1-25.
11. Vertiainen E, Nuutinen J. Success and pitfalls in myringoplasty: follow up study of 404 cases. *Am J Otol.* 1993; 14(3):301-5.
12. Carr MM, Poje CP, Nagy NL, Pizzuto MP, Brodsky LS. Success rates in paediatric tympanoplasty. *J Otolaryngol.* 2001; 30(4): 199-202.
13. Vrabec JT, Schwaber MK, Davidson MJ, Clymer MA. Evaluation of basic fibroblast growth factor in tympanic membrane repair. *Laryngoscope.* 1994; 104:1059-64.
14. Güneri EA, Tekin S, Yilmaz O, Özkara E, Erdag TK, Ikiz AÖ, Sarioglu S, Güneri A. The effects of hyaluronic acid, epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol.* 2003; 24:371-6.

15. Özkaptan Y, Gerek M, Simsek S, Deveci S. Effects of fibroblast growth factor on the healing process of tympanic membrane perforations in an animal model. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1997; 254 (1):S2-S5.
16. Mondain M, Ryan A. Histological study of the healing of traumatic tympanic membrane perforation after basic fibroblast growth factor application. *Laryngoscope.* 1993; 103:312-18.
17. Ramalho JRO, Bento RF. Healing of subacute tympanic membrane perforations in chinchillas treated with epidermal growth factor and pentoxifylline. *Otol Neurotol.* 2006; 27(5):720-27.
18. Körbling M, Estrov Zeev. Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept. *N Engl J Med.* 2003; 349:570-82.
19. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Blackstad, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002; 418:41-9.
20. Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Rebelatto C, Senegaglia C, Hansen P, Furuta M, Miyague N, Francisco JC, Olandoski M, Woitowics V, Simeoni R, Faria-Neto JR, Brofman P. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto agudo do miocárdio. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2003; 20(3):270-8.
21. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Amesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Edresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grogaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006; 355:1199-209.
22. Matsuoka AJ, Kondo T, Miyamoto R, Hashino E. In vivo and in vitro characterization of bone marrow-derived stem cells in the cochlea. *Laryngoscope.* 2006; 116: 1363-7.
23. Coleman B., Hardman J. Fate of Embryonic Stem Cells Transplanted into the Deafened Mammalian Cochlea. *Cell Transplant.* 2006; 15:369-80.
24. Von Unge M, Dirckx J, Olivius P. Embryonic stem cells enhance the healing of tympanic membrane perforations. *Int J Pediatr Otorhinolaringol.* 2003; 67:215-9.
25. Rahman A, Olivius P, Dirckx J, von Unge M, Hultcrantz M. Stem cells and enhanced healing of chronic tympanic membrane perforation. *Acta oto-Laryngologica.* 2008; 128:352-9.
26. Rahman A, Olivius P, Dirckx J, von Unge M, Hultcrantz M. Healing time, long-term result and effects of stem cell treatment in acute tympanic membrane perforation. *Int J Pediatr Otorhinolaringol.* 2007; 71(7):1129-37.
27. Nóbrega M. Anatomia e fisiologia da orelha média. *Tratado de Otorrinolaringologia.* 1ªed. São Paulo: Roca; 2002.

28. Hellstrom S, Salen B, Stefors L. Anatomy of rat middle ear. *Acta Anat (Basel)*. 1982; 112:346-52.
29. Judkins RF, Li H. Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997; 117:438-47.
30. Knutsson J, Bagger-Sjöbäck D, von Unge M. Distribution of different collagen types in rat's tympanic membrane and its suspending structures. *Otol Neurotol*. 2007; 28(4): 486-91.
31. Stenfeldt K, Johanson C, Hellström S. The collagen structure of the tympanic membrane. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006; 132:293-8.
32. Rahman A, Olivius P, Dirckx J, von Unge M, Hultcrantz M. Structural and functional properties of healed tympanic membrane: a long-term follow-up after laser myringotomy. *Otol Neurotol*. 2007; 28:685-91.
33. Johnson AP, Snallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. A two dimensional histological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol*. 1990; 119:406-15.
34. Wang WQ, Wang ZM, Chi FL. Spontaneous healing of various tympanic membrane perforations in the rat. *Acta Otolaryngol*. 2004; 124(10):1141-4.
35. Kakoi H, Anniko M. Auditory migration. II: Morphological evidence for auditory eidermal cell migration in rat. *Acta Otolaryngol*. 1996; 116(6):850-3.
36. Rahman A, Olivius P, Dirckx J, von Unge M, Hultcrantz M, Margolin G. Fresh tympanic perforations heal without significant loss of strength. *Otol Neurotol*. 2005; 26:1100-6.
37. Bigelow DC, Kay D, Saunders JC. Effect of healed tympanic membrane perforations on umbo velocity in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1998; 107(11 Pt 1):928-34.
38. Vrabc JT. Tympanic membrane perforations in the diabetic rat: a model of impaired wound healing. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998; 118(3Pt1):304-8.
39. Li J, Eriksson PO, Hansson A, Hellström S, Ny T. Plasmin/plasminogen I essential for the healing of tympanic membrane perforations. *Tromb Haemost*. 2006; 96(4):512-9.
40. Oliveira JAP, Hyppolito MA, Netto JC, Mrué F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003; 69(5):649-55.
41. Kutluhan A, Ugras S, Inalkaç E, Akpolat N. The effects of hyaluronic acid on myringoplasty in rats. *Tr J of Medical Sciences*. 1999; 29:401-7.
42. Scaramella LF, Farrell BP, Kooiker PD, Marra S. Effectiveness of nonsurgical office closure of tympanic membrane pars tensa perforations. *Ear Nose Throat J*. 2002; 81(8): 556-60.

43. O'Daniel TG, Petitjean M, Jones SC, Zogg J, Martinez SA, Nolph MB, Schultz GS. Epidermal growth factor binding and actions on tympanic membranes. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1990; 99(1):80-4.
44. Armstrong M, Jr., Kunar DR, Cummings CW. Effect of pentoxifylline [corrected] on myocutaneous flap viability in pigs. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993; 109(4): 668-75.
45. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells. The paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*. 2006; 169(2): 338-46.
46. Stem Cell Information. The National Institute of Health resource for stem cell research. Capturado da Internet em 10/11/2008. Disponível em <http://www.stemcells.nih.gov/>
47. Tognoli GK, Olsson DC, Martins DB, Júnior EBS, Salbergo FZ, Oliveira GK, Braga FVA, Raiser AG, Dezengrini R, Cruz FSF, Castro MB, Rosa MC, Carregaro AB, Pippi NL. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. *Ciência Rural*. 2008; 6:10.
48. Gowdak LHW, César LAM. Insuficiência coronariana na hipertensão arterial. *Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão*. 2004; 7(1):11-13.
49. Jerger J. Clinical experience with impedance audiometry. *Arch otolaryngol*. 1970; 92:311-24.
50. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Princípios éticos para o uso de animais de laboratório[Internet]. [capturado 2009 fev 02]. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20eticos>
51. Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília – [capturado 2009 fev 09]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccIVIL_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm.

ANEXOS

ANEXO A. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 1461/07-CEP

Porto Alegre, 30 de novembro de 2007.

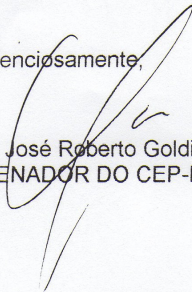
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS
apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 07/04000, intitulado:
**"Efeito da terapia com células tronco mesenquimais em perfurações agudas de
membrana timpânica"**.

Sua investigação está autorizada a partir da
presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser
entregues a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Jefferson Luis Braga da Silva
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO B. Normas de publicação da Revista **Otology & Neurotology**.

Otology & Neurotology

Online Submission and Review System

Author Resources

Instructions for Authors (this page)

[Copyright Transfer \(PDF\)](#)

[Reprint Ordering](#)

[Permissions Requests](#)

[ePrints](#)

[Reprints](#)

SCOPE

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

MANUSCRIPT SUBMISSION

Online manuscript submission: All manuscripts must be submitted online through the Web site at <http://on.editorialmanager.com>. **First time users:** Please click "Author & Reviewer Info" from the menu on the left-hand side of the page. Then on the following page, please click the Register button from the main menu and enter the requested information. On successful registration, you will be sent an e-mail indicating your user name and password. Print a copy of this information for future reference. Note: If you have received an e-mail from us with an assigned user ID and password, or if you are a repeat user, you do not have to register again, even if your status changes (i.e., author, reviewer, or editor). **Authors:** Please click the log-in button from the menu at the top of the page and log into the system as an Author. Submit your manuscript according to the author instructions. You will be able to track the progress of your manuscript through the system. If you experience any problems, please contact Marianna Hagan, Managing Editor, marianna.hagan@wolterskluwer.com; phone: (215) 521-8350, fax: (215) 521-8488. Requests for help and other questions will be addressed in the order received.

Electronic files should be submitted in a standard word processing format; Microsoft Word (or Corel WordPerfect) is preferred. Although

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

ETHICAL/LEGAL CONSIDERATIONS

A submitted manuscript must be an original contribution not previously published (except as an abstract or preliminary report), must not be under consideration for publication elsewhere, and, if accepted, must not be published elsewhere in similar form, in any language, without the consent of Lippincott Williams & Wilkins. If the work being submitted has been published previously in another language, please disclose this information with the submission of the manuscript.

Each person listed as an author is expected to have participated in the study to a significant extent. Although the editors and referees make every effort to ensure the validity of published manuscripts, the final responsibility rests with the authors, not with the Journal, its editors, or the publisher. A summary of the Journal's policy on redundant publication is available (Otol Neurotol 2003;24:131).

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

Disclosure of Competing Interest: All listed authors are required to disclose any financial support they received that relates in any way to information contained in the manuscript. All authors must also disclose support for the reported research or other financial interests related to the study reported.

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

Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. Authors should mask patients' eyes and remove patients' names from figures.

Compliance with NIH and Other Research Funding Agency Accessibility

Requirements: A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, LWW will identify to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and will transmit the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute, or other funding agencies to PubMed Central. The revised Copyright Transfer Agreement provides the mechanism.

IRB Approval: When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration (*JAMA* 2000;284:3043–3049). When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on, the care and use of laboratory animals was followed.

For experiments on human or animal subjects, please provide the institutional affiliation of the Institutional Review Board or Animal Use Committee that provided consent for the research described in the report. Please also provide the protocol or application number and the name of the Principal Investigator submitted to the Institutional Review Board or Animal Use Committee for review of your research.

Copyright: All authors must sign a copy of the Journal's "Authorship Responsibility, Financial Disclosure, and Copyright Transfer" form and submit it with the original manuscript. You may fax or mail your copyright form to Adam Nicely at Lippincott Williams & Wilkins, 530 Walnut Street, Philadelphia, PA 19106, USA; Fax: (215) 521-8488.

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

Preparation of Manuscript

Manuscripts that do not adhere to the following instructions will be

returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review.

Title page: Title page must be submitted as a separate file. Include on the title page (a) complete manuscript title; (b) short running head; (c) authors' full names, highest academic degrees, and affiliations; (d) name and address for correspondence, including fax number, telephone number, and e-mail address; (e) address for reprints if different from that of corresponding author; (f) sources of support that require acknowledgment; and (g) disclosure of funding received for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH), Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute (HHMI), and other(s).

The title page must also include disclosure of funding received for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH); Wellcome Trust; Howard Hughes Medical Institute (HHMI); and other(s).

Structured Abstract: A concise abstract of no more than 250 words is required for all original clinical and basic science contributions, including review articles. No reference citations should be included in the abstract. To facilitate rapid indexing and assimilation into the medical literature, abstracts should be organized according to the outlines listed under the Article Types section.

Text: Organize the manuscript into four main headings: Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. Define abbreviations at first mention in text and in each table and figure. If a brand name is cited, supply the manufacturer's name and address (city and state/country). Acknowledge all forms of support, including pharmaceutical and industry support, in an Acknowledgments paragraph. *Authors are required to target a manuscript length of 3500 words or less (this count is for the main text only; it excludes the abstract, references, acknowledgments, figures, and tables).*

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

Minimal Reporting Guidelines: Otolology & Neurotology requires that contributors use a standard format for data presentation for certain subject areas in which well-recognized uniform standards have been developed. The goal of this journal's minimal reporting guidelines policy is to facilitate interstudy comparability by future investigators

and thus to permit more meaningful meta-analyses. The data sets required are intended to serve only as guidance. It is not the intention of this policy to discourage innovative data interpretations or the use of novel presentation formats. Authors are welcome to present their data in any format that they consider valid and informative, as long as data also are included in the standardized format. The following reference sources contain the guidelines to be used in presenting data in *Otology & Neurotology*:

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

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

Journal article [follow AMA style]

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

Book:

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

Chapter in a Book:

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

Journal Article in Press:

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

Journal Article in a Foreign Language:

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

Internet:

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

Abstract, Comment, Letter to the Editor:

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

Unpublished Meeting/Conference Presentation:

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

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

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

Color figures: The journal accepts for publication color figures that will enhance an article. Authors who submit color figures will receive an

estimate of the cost for color reproduction. If they decide not to pay for color reproduction, they can request that the figures be converted to black and white at no charge.

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

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

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

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

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

Article Types

Clinical Studies:

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

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

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

Patients: Primary eligibility criteria and key demographic features.

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

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

Results: Include statistical measures as appropriate.

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

Basic Science Reports:

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

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

Methods: Succinct summary of techniques and materials used.

Results: Include statistical measures where appropriate.

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

Reviews and Meta-Analyses:

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

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

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

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

Data Synthesis: Specify statistical techniques used for data analysis.

Conclusions: Concise statement of primary inferences with any recommendations.

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

Clinical Capsule Report:

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

Patients: Primary eligibility criteria and key demographic features.

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

Main Outcome Measure(s): The most essential criterion that addresses the validity of a diagnostic test or a therapeutic outcome

Results: Include statistical measures as appropriate.

Conclusions: Include only those conclusions that are directly supported by observations generated from the study and make the report noteworthy.

A report will be considered for acceptance as a Clinical Capsule if it reflects a valid observation or clinical outcome, but is not powered by formal experimental methods (e.g. prospective, controlled observations). As best as possible, the title should state the

compelling point that draws the reader's attention. These reports will describe a new disease state (with diagnostic documentation including pathologic findings), identification of a new complication from a treatment or procedure, a new diagnostic technique, a new technology transferred from one field to another, or further elucidate clinical approaches to significant disorders.

A Clinical Capsule should offer new insights and not simply report established information. Novel diagnostic or therapeutic considerations can be effectively conveyed in the context of a Clinical Capsule. If the report provides a new treatment option, the disease should be of such rarity that it is unlikely that a series could be developed that would be amenable to standard analyses. Capsule reports may also be based on seminal observations that provide an understanding of the mechanism of disease, particularly when the pathophysiology involves a rare and not easily retested event. *The text for a clinical capsule should not exceed 1500 words (excluding the abstract and references). Up to 5 tables and/or figures may be included with the submission.*

Imaging Case of the Month **Please note updated guidelines below**

New: The Journal now encourages the submission of non-radiology images that are relevant to the radiology case being presented. Submissions that only include radiology images are also acceptable. Additional images may include, but are not limited to: surgical pathology, intraoperative or clinical images, or diagnostic testing (audiograms, vestibular testing, etc.).

Content: Content should include 1) a brief description of the patient and clinical presentation 2) concise description of the images citing the key diagnostic point and 3) differential diagnosis of the radiological images. The optimal imaging modalities for demonstrating the lesion (i.e., CT, MRI, angiography) and parameters (e.g., axial vs coronal, T1- or T2-weighted, with contrast) and a radiographic differential diagnosis should be included. For submissions that include surgical pathology, a high magnification image of sufficient contrast to show the relevant pathologic features should be provided. A scale bar should be included for reference.

Note: Space limitations do not permit discussions of the role that radiology or a diagnostic modality plays in the diagnosis and management of the role process.

Length: must be brief and not exceed 2 journal pages. As a rule of thumb, this limits contributions to no more than 6 images and no more than 2 typewritten pages (double-spaced and 12 point Arial or Times New Roman font size). Readers interested in more detailed information can look up the cited reference(s).

References: Only a few key references should be provided, preferably

no more than 5.

Figures: Images submitted must be of exemplary quality, and be at least 300 dpi in either .tif or .jpg format. Patient identifiers must be masked. Up to six images may be submitted and should be labeled A, B, C, D, E, and F. A single figure legend should have callouts that refer to each of these panels. An attempt should be made, if possible, to make the radiology and clinical images the same size to allow for optimal layout in a 2x2 or 3x2 format. For CT scans, high-resolution, bone-reviewed images are preferred. Include more than one plane of view only when the second perspective adds unique information. For MRI scans, it is preferred that both T1- or T2-weighted images be included. Pre- and postcontrast, fat saturation, and multiplanar images may be submitted as required.

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

Temporal Bone Histopathology Case of the Month

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

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

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

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

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

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

Article Plus™

Acceptable File Formats: The types of materials that may be submitted include, color photographs, data graphs and charts, short audio files, web site URLs, word documents, spreadsheet, and small video or

audio files (keeping download time in mind). An expanded list of acceptable file formats follows:

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

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

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

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

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

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

Captions must embedded within the Article Plus™ image file.

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

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

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

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

Submit each image separately.

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

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

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

OR

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

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

Style: Pattern manuscript style after the *American Medical Association Manual of Style* (9th edition). *Stedman's Medical Dictionary* (27th

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

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

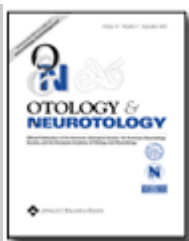
After Acceptance

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

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

Publisher's contact: Fax corrected page proofs, reprint order form, and any other related materials to Journal Production Editor, Jennifer Aronstein, fax: 410-558-6844. Color proofs should be returned to Journal Production Editor, Jennifer Aronstein, Lippincott Williams & Wilkins, 351 W. Camden Street, Baltimore, MD 21201.

Permissions: Authors interested in reusing or reprinting material from their accepted work are advised to contact the Publisher's permissions department at journalpermissions@LWW.com. In your request, please include 1) your full contact information; 2) the specific material being requested and the citation for the published material; and 3) a statement as to how the material being borrowed will be used.



Copyright 2008, Lippincott Williams & Wilkins. All rights reserved
Published by Lippincott Williams & Wilkins

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

ANEXO C. Artigo submetido na Revista Otology & Neurotology

! Attachments, pictures, and links in this message have been blocked for your safety.
Show content

ON Submission Confirmation for EFFECT OF THERAPY WITH BONE MARROW
MONONUCLEAR CELLS IN ACUTE TYMPANIC PERFORATIONS

From: em.on.0.10fcd6.3caabf2b@editorialmanager.com on behalf of Otology and
Neurotology (marianna.hagan@wolterskluwer.com)

! You may not know this sender. Mark as safe | Mark as junk

Sent: Thursday, February 12, 2009 5:31:41 PM

To: danielafabricio@hotmail.com

Dear Dr. Fabricio,

Your submission entitled "EFFECT OF THERAPY WITH BONE MARROW
MONONUCLEAR CELLS IN ACUTE TYMPANIC PERFORATIONS" has been
received by the journal editorial office.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial
Manager as an author.

<http://on.edmgr.com/>

username: Your username is: ddfabricio

password: Your password is: fabricio263445

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind Regards,

Otology & Neurotology

Editorial Manager(tm) for Otology & Neurotology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: EFFECT OF THERAPY WITH BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS IN ACUTE TYMPANIC PERFORATIONS

Article Type: Original Study

Section/Category: Middle Ear and Mastoid Disease

Keywords: tympanic membrane perforation; bone marrow mononuclear cells; stem cells; wound healing; middle ear.

Corresponding Author: Dr. Daniela Dias Fabricio, M.D.

Corresponding Author's Institution: São Lucas Hospital

First Author: Daniela Dias Fabricio, M.D.

Order of Authors: Daniela Dias Fabricio, M.D.; Jefferson B Silva, PhD; Sady S Costa, PhD

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: INTRODUCTION: Bone marrow mononuclear cells have been used in tissue regeneration attempts in several pathologies. This study evaluated their potential effect on the healing of acute tympanic membrane (TM) perforations. MATERIAL AND METHOD: Bilateral tympanic perforations were produced by myringotomy in 10 Wistar rats. Bone marrow mononuclear cells were applied to one side and saline solution to the contralateral side. Healing time, tympanic membrane mobility and histology were evaluated. RESULTS: The side treated with mononuclear cells healed 3 days earlier than the control side ($p=0.006$). There were no differences in mobility or histological features between groups. CONCLUSION: Treatment with bone marrow mononuclear cells promoted faster TM healing.

**EFFECT OF THERAPY WITH BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS IN
ACUTE TYMPANIC PERFORATIONS**

Fabricio, Daniela Dias; MD

Silva, Jefferson Luis Braga; PhD

Costa, Sady Selaimen; PhD

Department of Otolaryngology, Pontific Catholic University of Rio Grande do Sul,
Brazil

Address correspondence to:

Daniela Dias Fabricio, MD

Mário Leitão, 60/1205

Zipcode: 90690-425

Porto Alegre – RS/ Brazil

Phone: 55-51- 33345627

E-mail: danielafabricio@hotmail.com

Abstract:

INTRODUCTION: Bone marrow mononuclear cells have been used in tissue regeneration attempts in several pathologies. This study evaluated their potential effect on the healing of acute tympanic membrane (TM) perforations. **MATERIAL AND METHODS:** Bilateral tympanic perforations were produced by myringotomy in 10 Wistar rats. Bone marrow mononuclear cells were applied to one side and saline solution to the contralateral side. Healing time, tympanic membrane mobility and histology were evaluated. **RESULTS:** The side treated with mononuclear cells healed 3 days earlier than the control side ($p=0.006$). There were no differences in mobility or histological features between groups. **CONCLUSION:** Treatment with bone marrow mononuclear cells promoted faster TM healing.

Key words: tympanic membrane perforation, bone marrow mononuclear cells, stem cells, wound healing, middle ear.

INTRODUCTION:

Tympanic membrane perforations occur due to trauma or infection¹. Traumatic perforations heal spontaneously in 80% of the cases, particularly when less than 25% of the total tympanic membrane area is affected². Spontaneous healing depends on a number of local and systemic factors, such as the size of the perforation, its location, clinical and metabolic conditions of the patient, and the presence of associated infections³.

Some of the clinical signs of tympanic membrane perforation are conductive hearing loss, air-bone gap of 10 to 40 db, tinnitus, aural fullness, and recurrent infections. Moreover, when the perforation reaches the edge of the membrane, epithelial tissue may migrate into the middle ear and give rise to chronic otitis media with cholesteatoma⁴.

When healing is not spontaneous, myringoplasty is indicated. However, failure in graft integration may occur even when the technique is accurate and the surgeon is experienced⁵.

Several methods have been studied to improve and accelerate tympanic membrane healing, as well as to reduce the morbidity associated with surgery and residual perforation.

Growth factors have been the focus of most current studies, but no definite solutions have been found for the nonoperative treatment of tympanic perforations^{6,7}.

Few studies have investigated the use of stem cells for the treatment of tympanic membranes. However, their tissue regeneration potential has been shown in other pathologies, which suggests that its use in these cases should be further studied.

Adult somatic stem cells can self-renovate and replace cells of different tissues⁸. The cells most often used in studies are bone marrow stem cells, which have a more primary lineage (mononuclear cells) that may give origin both to mesenchymal and hematopoietic cell lines. Some authors believe mononuclear cells are the bone marrow cell fraction with the greatest plasticity^{9,10}.

The objective of this study was to evaluate the potential effect of bone marrow mononuclear cells on the healing of acute perforations of the tympanic membrane (TM) in an animal model.

MATERIAL AND METHODS:

Fourteen isogenic Wistar rats weighing 250-300 g were used. Two male rats were bone marrow donors, and 12 female rats underwent the intervention. The animals were obtained from the animal laboratory of Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil. They were kept in individual cages and

received water and food ad lib. A 12-hour light/dark cycle was used. Animals with signs of infection in outer or middle ear were excluded. This study was approved by the Ethics in Research Committee of PUCRS under number 07/04000.

The extraction of mononuclear cells from donor rats was made after euthanasia with an overdose of thiopental (30 mg/kg). Bone marrow was collected from the tibia and femur of the animals. For the separation of mononuclear cells, the blood obtained from the bone marrow was diluted in RPMI 1640 medium (1:1) (Gibco®, USA). This suspension was fractionated in a density gradient generated by centrifugation on Histopaque® at a density of 1.077 g/l (Sigma-Aldrich®, USA) for 400 g during 30 minutes at 25° C. The mononuclear fraction on the interface with Histopaque® was collected and rinsed twice with 0.9% sterile saline solution. Cells were counted in a Neubauer chamber to a density of 10⁶ cells per ml. Cell viability was evaluated using the exclusion method with 0.4% trypan blue stain (Gibco, USA), and 99% of the cells were viable.

Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of 0.2 mg chlorpromazine and 0.8 mg ketamine (4 mg/kg). Tympanic perforations on the pars tensa were produced bilaterally using a myringotomy scalpel under microscopic visualization (Figure 1). In the left side, 0.2 ml of bone marrow mononuclear cells at a 10⁶/ml concentration was introduced; the cells were immersed in gel foam, came into direct contact with the perforation and covered it. The right side was the control side and gel-foam with saline solution was used.

The perforations were examined at every two days to evaluate healing time (Figure 2). After complete healing, the animals underwent tympanometry (impedance audiometer, Interacoustics®, AZ26) and were classified according to curves as described by Jerger¹¹.

Euthanasia was performed with thiopental (30 mg/kg). Histological analysis was performed in 2 animals at 15, 30 and 60 days, in a total of 6 animals. The bulla of the temporal bones were removed and decalcified in 5% EDTA for two weeks. Samples were then embedded in paraffin blocks and longitudinally sectioned coronally to obtain 6- μ m thick sections. Specimens were stained with hematoxylin-eosin (HE). Slides were examined under light microscopy (40, 100 and 400X magnifications).

Statistical analysis was performed using the nonparametric Wilcoxon test and the SPSS 14.0 software. The level of significance was set at $p=0.05$, and statistical power, at 90%. Histological and mobility analyses were only descriptive.

RESULTS:

TM perforations healed completely in all animals at 15 days. Mean right side healing, in which saline solution was used, was 13 days (SD=1.47); in the left side, in which the therapy with bone marrow mononuclear cells was used, it was 10.17 days (SD=1.33) Table 1. The difference between groups was statistically significant ($p=0.006$).

Of the 10 ears examined, 7 had an A curve, two (in the same animal) had an As curve, and one, a C curve.

Mean compliance in the ears that received mononuclear cells was 0.39 ml, whereas mean pressure was -73.6 daPa. In the control side, compliance was 0.44 ml, and pressure, -53 daPa (Table 2). There were no statistically significant differences between sides.

The histological analysis of ears at 14 days showed hyperplasia of the epithelial layer, presence of inflammatory infiltrate and fibroblast proliferation. In the ears

analyzed at 30 and 60 days, there was no inflammatory infiltrate or epithelial hyperplasia, only the presence of young fibroblasts and connective tissue. Hyperplasia of the mucous layer was not seen in any of the healed TM. There were no differences in histological features between groups.

DISCUSSION:

The use of bone marrow mononuclear cells has some advantages that make it affordable in clinical practice. These cells are easy to obtain, are rapidly available for use, their cost is low, and there are not risks of rejection because they are autologous. They have been used in some acute diseases, such as acute myocardial infarction, and good results have been reported^{9,12}.

In this study, TM perforations in rats treated with mononuclear cells healed 3 days earlier. No specific studies have investigated the association between TM healing in rats and human beings. Tissue healing in rats has been reported to be three times faster than in human beings. Therefore, it may be inferred that healing of acute TM perforations in human beings could occur 9 days earlier with the use of this therapy.

These findings cannot be directly compared with results reported by other authors in studies with stem cells, because other studies described the use of embryonic stem cells in acute tympanic perforation. Embryonic cells have a greater potential to differentiate than bone marrow mononuclear cells, but the long term effects of their disorganized growth are still unknown and may give origin to tumors, as well as raise ethical conflicts.

Von Unge *et al.*¹³ conducted the first study with embryonic stem cells to treat TM perforations using a different method to evaluate healing. However, their sample was small and had no statistical power, and the animals were examined only up to the fifth healing day. The great advantage of their study was that it reported on the

observation under electronic microscopy of stem cells marked with a fluorescent protein integrated in some TMs.

Our study did not analyze the potential of mononuclear cells to integrate into the TM. Therefore, it may be argued that the effect obtained was a result of the differentiation of MNC or due to their release of healing-promoting factors. These questions may be further explained in future studies to evaluate into which type of cell they differentiate and how many cells effectively integrate into the TM.

In another study with embryonic stem cells in acute TM perforations, Rahman *et al.*¹⁴ did not find any benefits of this therapy. Later, the same authors conducted a study with a chronic perforation model in Sprague-Dawley rats, and used mesenchymal bone marrow stem cells. They found that 40% of the perforations healed with the use of this treatment, in comparison with 10% of the control group, but no statistical significance was found because of the small sample size¹⁵.

As traumatic perforations have a high rate of spontaneous healing, we can only evaluate the acceleration of healing in this study. The use of a chronic perforation model may be useful to evaluate the induction and stimulus to healing.

The histological analysis revealed that at 14 days there was hyperplasia of epithelial tissues in the healed TM, which is in agreement with other studies that found that the epithelial tissue is the first to develop in TM healing, and it serves as a substrate for the other layers^{16,17}. Moreover, we found inflammatory cells and substantial fibroblastic reaction, compatible with the acute phase of healing. At 30 and 60 days, we found young fibroblasts and connective tissue. We did not find any hyperplasia of the mucous layer in any ear, which is in agreement with findings of other studies that demonstrated that this type of cell does not take part in early healing processes^{6,18,19}.

No differences were found in the comparison of histological features between groups, but only a descriptive analysis could be conducted because of the small number of animals and no statistical parameters. Longer studies should be conducted to evaluate long-term healing.

Tympanometry did not show any differences between groups. Most animals had an A curve, which indicates an adequate tympanic mobility after healing. Results suggest that the use of MNC does not affect TM mobility. Clymer *et al.*²⁰ found a greater trend towards A curves in TMs treated with keratinocyte growth factors, but their results were not statistically significant. Other studies showed that, regardless of the substance used to accelerate healing, function remained similar to that found in control groups^{6,13,15,18}.

In our study, earlier healing was found when bone marrow mononuclear cells were used in acute TM perforations, but did not find any differences in histological features or tympanic mobility when compared with the control group. These results bring into discussion the use of new alternative treatments for tympanic perforations. Future studies should evaluate the effect of MNC on chronic perforations.

REFERENCES:

- 1- Gladstone HB, Jackler RK, Varak K. Tympanic membrane wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am.* 1995; 28(5):913-32.
- 2- Kristensen S. Spontaneous healing of traumatic tympanic membrane perforations in man: a century of experience. *J Laryngol Otol.* 1992; 106: 1037–50.
- 3- Sheehy JL, Anderson RG. Myringoplasty. A review of 472 cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1980;89(4 Pt 1):331-4.
- 4- Costa, SS. Otite Média Crônica Não-colesteatomatosa. *Tratado de Otorrinolaringologia.* 1ª edição. São Paulo: Roca; 2002.

- 5- Vertiainen E, Nuutinen J. Success and pitfalls in myringoplasty: follow up study of 404 cases. *Am J Otol*. 1993; 14(3):301-5.
- 6- Vrabec JT, Schwaber MK, Davidson MJ, Clymer MA. Evaluation of basic fibroblast growth factor in tympanic membrane repair. *Laryngoscope*. 1994; 104:1059-64.
- 7- Ramalho JRO, Bento RF. Healing of subacute tympanic membrane perforations in chinchillas treated with epidermal growth factor and pentoxifylline. *Otol Neurotol*. 2006; 27(5):720-27.
- 8- Körbling M, Estrov Zeev. Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept. *N Engl J Med*. 2003; 349:570-82.
- 9- Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Rebelatto C, Senegaglia C, Hansen P, Furuta M, Miyague N, Francisco JC, Olandoski M, Woitowics V, Simeoni R, Faria-Neto JR, Brofman P. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto agudo do miocárdio. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2003; 20(3):270-8.
- 10- Gowdak LHW, César LAM. Insuficiência coronariana na hipertensão arterial. *Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão*. 2004; 7(1):11-13.
- 11- Jerger J. Clinical experience with impedance audiometry. *Arch otolaryngol*. 1970; 92:311-24.
- 12- Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Amesén H, Abdelnoor M, Egeland T, Edresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grogaard HK, Bjømerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006; 355:1199-209.
- 13- Von Unge M, Dirckx J, Olivius P. Embryonic stem cells enhance the healing of tympanic membrane perforations. *Int J Pediatr Otorhinolaringol*. 2003; 67:215-9.
- 14- Rahman A, Olivius P, Dirckx J, von Unge M, Hulterantz M. Healing time, long-term result and effects of stem cell treatment in acute tympanic membrane perforation. *Int J Pediatr Otorhinolaringol*. 2007; 71(7):1129-37.
- 15- Rahman A, Olivius P, Dirckx J, von Unge M, Hulterantz M. Stem cells and enhanced healing of chronic tympanic membrane perforation. *Acta oto-Laryngologica*. 2008; 128:352-9.
- 16- Rahman A, Olivius P, Dirckx J, von Unge M, Hulterantz M. Structural and functional properties of healed tympanic membrane: a long-term follow-up after laser myringotomy. *Otol Neurotol*. 2007; 28:685-91.

- 17- Bigelow DC, Kay D, Saunders JC. Effect of healed tympanic membrane perforations on umbo velocity in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1998; 107(11 Pt 1):928-34.
- 18- Güneri EA, Tekin S, Yilmaz O, Özkara E, Erdag TK, İkiz AÖ, Sarioglu S, Güneri A. The effects of hyaluronic acid, epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol.* 2003; 24:371-6.
- 19- Johnson AP, Snallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. A two dimensional histological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 1990; 119:406-15.
- 20- Clymer MA, Schawaber MK, Davidson MJ. The effects of keratinocyte growth factor on healing of tympanic membrane perforations. *Laryngoscope.* 1996; 106:280-5.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1 – Total perforation of pars tensa performed with a myringotomy scalpel.

Figure 2 – Tympanic membrane in 10th day of cicatrization.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

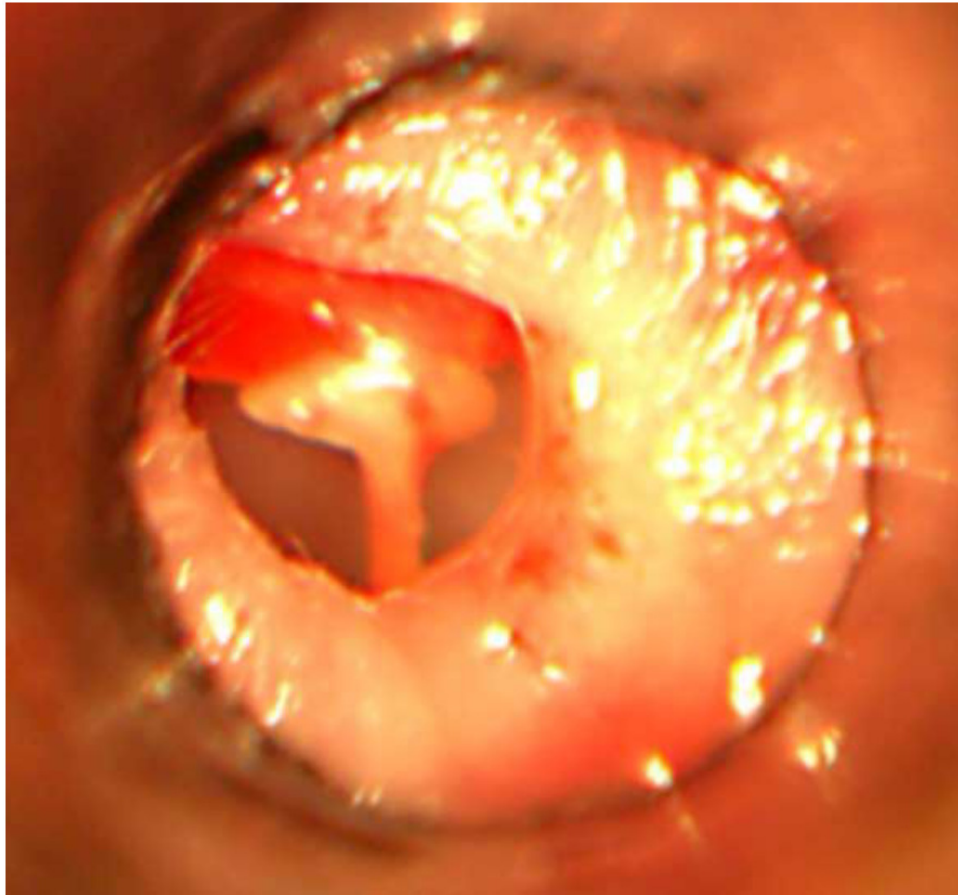


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)



Table

Table 1 – Time of TM healing

Healing time (days)	MC	SS	P
Mean	10.17	13	0.006*
Standard deviation	1.33	1.47	
Minimum	9	11	
Maximum	13	15	

MC: Mononuclear cells; SS: Saline solution

Table 2 - Tympanometry

Rat	Substance	Compliance (ml)	Curve	Pressure (daPa)
Rat 1	MC	0.36	A	-95
	SS	0,42	A	-74
Rat 2	MC	0.25	As	-23
	SS	0,26	As	-32
Rat 3	MC	0,37	A	-59
	SS	0,32	A	-75
Rat 4	MC	0,42	C	-104
	SS	0,74	A	-72
Rat 5	MC	0,58	A	-41
	SS	0,46	A	-12
Mean	MC	0,39	-	-73,6
	SS	0,44	-	-53

MC: Mononuclear cells; SS: Saline solution