

# *Miringotomia na Otite Média Aguda: Aspectos Experimentais*

*Jorge Spratley e Pedro Marques*

Uma discussão sobre a miringotomia no âmbito da otite média aguda (OMA) pode parecer, pelo menos à primeira vista, o reavivar de um tópico antigo, já que muito se escreveu sobre este assunto há algumas décadas e pouco em anos recentes. Embora os antibióticos tenham reduzido as indicações para a sua utilização rotineira, a miringotomia ainda é uma intervenção freqüente em idade pediátrica e para a qual existem indicações formais.<sup>1</sup> O seu interesse ou não na OMA não-complicada ainda é controverso – com defensores<sup>2,3</sup> e detratores<sup>4,5</sup> – mas, considerando a emergência atual de bactérias com múltiplas resistências aos antimicrobianos<sup>6-9</sup>, é de se prever um ressurgimento da sua utilização mais freqüente no futuro. A título de exemplo, ainda recentemente foi assumido que para se avaliar corretamente a eficácia antibiótica na OMA – um problema tão atual – o recurso das miringotomias seriadas é indispensável<sup>10</sup>; defende-se só assim ser possível avaliar a erradicação do agente infeccioso, realizando o denominado teste de sensibilidade *in vivo* e, deste modo, aferir qual a atividade real do antimicrobiano em questão.

Por outro lado, a execução da miringotomia na OMA é indiscutível sempre que se enfrenta o risco potencial ou declarado de uma complicação.<sup>11</sup>

## **O Rato Como Modelo da Miringotomia na OMA**

O estudo histopatológico da dinâmica da cicatrização timpânica pós-miringotomia, por razões de ética, não é possível ser efetuado no Homem. Ao longo dos anos, a indução experimental da OMA para estudo histopatológico tem sido desenvolvida preferencialmente através da inoculação da orelha média com diversos tipos de bactérias viáveis em diversas espécies animais como a chinchila<sup>12-15</sup>, o gerbil da Mongólia<sup>16</sup>, o gato<sup>17</sup> e o rato.<sup>18-30</sup>

De todos estes modelos experimentais, sem dúvida um dos mais consistentemente testados e que mais vezes se emprega atualmente em estudos clínicos e histopatológicos da OMA, tem sido o rato da estirpe Sprague-Dawley no qual se procede à inoculação intrabular de bactérias viáveis através de uma abordagem transcervical.<sup>18-20,22-24,26,28,29,31-35</sup> Justamente por se tratar de um modelo com uma alta eficácia e reprodutibilidade, utilizados de rotina nos laboratórios de otopatologia da Universidade de Umeå, Suécia, onde se levaram a cabo os experimentos aqui relatados, a ele se recorreu.

Note-se que, para mais, as já mencionadas semelhanças morfológicas entre a membrana timpânica (MT) do rato e do Homem<sup>36</sup>, favorecem a sua utilização

experimental e daí serem mais consistentes as extrapolações que se efetuam bem como possíveis aplicações com eventual interesse clínico. Por esta mesma razão, vários autores têm utilizado a MT do Rato como um modelo de estudo da cicatrização após miringotomia, tanto espontaneamente<sup>23,37-39</sup>, como após a aplicação tópica de substâncias que vão desde a heparina exógena<sup>40</sup>, corticosteroides<sup>41</sup>, ácido hialurônico<sup>42</sup>, diversos factores de crescimento<sup>43-45</sup>, até à utilização de células estaminais embrionárias.<sup>46</sup>

A discussão que a seguir é desenvolvida reporta-se a dois trabalhos experimentais efetuados no modelo animal, os quais procuraram avaliar: I) a evolução da resposta da MT durante a OMA, com e sem miringotomia; II) as fases precoces da cicatrização da MT após miringotomia na presença de OMA contra miringotomia em MTs não-infectadas como controles.

Para esse efeito, sob anestesia injetada numa veia da cauda, a *bulla tympanica* esquerda de cada animal foi abordada cirurgicamente e inoculada com  $\approx 50$  microlitros de uma suspensão contendo  $5 \times 10^7$  cfu/ml *Streptococcus pneumoniae* tipo 3 enquanto a *bulla* direita foi deixada intacta. Quarenta e oito horas mais tarde todos os animais haviam desenvolvido OMA na orelha esquerda, confirmada por otoscopia microscópica. No estudo I<sup>47</sup>, metade dos animais foi randomizada para um grupo no qual se efetuou uma miringotomia padronizada no quadrante pósterosuperior da MT esquerda, e a outra metade para um grupo em que as MT foram deixadas intactas. Subsequentemente, séries de quatro ratos foram eutanizados consecutivamente nos dias 1, 2, 4 e 7. No estudo II<sup>48</sup>, as miringotomias foram efetuadas tanto na orelha esquerda portadora de OMA como na orelha direita não-infectada. A seguir, séries de quatro ratos de cada grupo, foram sacrificados às 3, 6, 9, 12, 24, e 48 horas, e ao quarto e sétimo dias. Logo que cada animal era sacrificado, as suas MTs foram dissecadas e processadas segundo o protocolo laboratorial para exame em microscopia de luz e eletrônica.

### **Miringotomia na Otite Média Aguda Não-Complicada?**

Quando analisados conjuntamente, os resultados mencionados no estudo I<sup>47</sup> realçam a nível experimental algumas das considerações clínicas anteriormente publicadas<sup>4,5,49</sup> e permitem ir ainda mais longe, já que, ao nível da estrutura da MT, a realização de miringotomia no decurso da OMA contribuiu para atrasar a resolução dos fenómenos inflamatórios no período de convalescença precoce da infecção, o que contrastou com a forma rápida como se processou a recuperação espontânea nas MTs controles com OMA e sem miringotomia. Estes resultados são aliás complementares de um estudo de Magnuson e colaboradores<sup>23</sup>, em que os efeitos da miringotomia na OMA foram analisados a longo prazo. Esses investigadores observaram histopatologicamente que, seis e doze meses após a incisão timpânica, as MTs submetidas a miringotomia durante a infecção se mantinham mais espessadas e com uma desorganização da estrutura da camada conjuntiva, em comparação com as MTs não miringotomizadas. Por consequência, não restam dúvidas que a combinação de infecção e miringotomia causa alterações duradouras na estrutura da MT. Note-se que tanto o estudo I<sup>47</sup> como o estudo II<sup>48</sup> demonstram que estas alterações estruturais da MT são visualizáveis logo nas primeiras fases, horas ou poucos dias, da recuperação pós-miringotomia.

Transpostos para a prática clínica diária, o conjunto de dados referidos credibiliza o ponto de vista dos que defendem dever ser a utilização da miringotomia na OMA um ato de exceção, evitando-se o seu uso sistemático em situações de OMA não-complicada. Todavia, tal não significa que o recurso da miringotomia na OMA deva ser sempre evitado. Pelo contrário, a miringotomia está formalmente indicada na presença de complicações supuradas, em casos refratários ao tratamento médico, para análise microbiológica do agente infectante, e eventualmente em doentes com otalgia intensa.<sup>1</sup>

Deve-se realçar ainda o fato de se ter demonstrado no estudo I<sup>47</sup>, que o rato possui uma elevada capacidade de resolução espontânea da OMA, o que está em sintonia com os dados existentes na literatura. Segundo Hermansson e co-autores<sup>19</sup>, a fase aguda da OMA no rato começa a declinar no quarto dia após a inoculação bacteriana. Num outro estudo de OMA experimental por *S. aureus*, Gröte e colaboradores<sup>21</sup> registraram um declínio da inflamação ao nível da MT logo ao terceiro dia após o início da infecção. Note-se, contudo, que as taxas de cura espontânea da OMA parecem ser variáveis no Homem, podendo atingir 18% e 48% respectivamente nas infecções por *S. pneumoniae* e *H. influenzae*.<sup>50</sup> Segundo meta-análise efetuada por Rosenfeld e colaboradores<sup>51</sup>, relativa à eficácia dos antibióticos no tratamento da OMA, a taxa de resolução clínica completa do episódio infeccioso sem usar antibióticos foi de 73%, entre 7 e 14 dias. Este tipo de evidência, complementado com dados de investigação clínica, tem favorecido uma corrente terapêutica que advoga uma atitude de vigilância atenta, apenas com tratamento sintomático da OMA, e recurso à antibioterapia apenas se a infecção não regredir espontaneamente nos dias subsequentes.<sup>52-56</sup> Ressalva-se, contudo, que este tipo de abordagem terapêutica tem sido essencialmente defendido em países com um baixo índice de resistências bacterianas e com sistemas de saúde que permitem uma avaliação clínica seqüencial das crianças, sem encargos financeiros adicionais para a família do doente.

### **Fenômenos Precoces da Cicatrização da Membrana Timpânica**

A capacidade de cicatrização da MT é reconhecida desde longa data, como atestado numa publicação de Roosa<sup>57</sup>, em 1873, na qual se afirma que o potencial regenerador da MT é superior a qualquer outra membrana do corpo humano. Desde então foram numerosos os estudos e muitas as questões desvendadas neste domínio.<sup>58</sup> Não obstante a cicatrização das perfurações timpânicas ser convencional no que respeita aos fenômenos hemostáticos e à cadeia de fenômenos inflamatórios, as suas fases de proliferação e migração são distintas das de outros tecidos, como resultado do modo complexo como a MT se encontra suspensa no ar. Assim, enquanto na pele e na maioria das outras estruturas se desenvolve uma camada de tecido de granulação que serve de plataforma à proliferação do epitélio adjacente, os fenômenos de reparação das lesões da MT têm que se desenrolar na ausência de um suporte, como se tratasse da construção de uma ponte.<sup>39</sup>

Em estudos precedentes, sobre os aspectos citológicos da cicatrização da MT em modelos animais não infectados, foram defendidas opiniões divergentes. Os trabalhos pioneiros em cobaias<sup>59-61</sup> sugeriam um encerramento inicial das perfurações da *pars tensa*, tal como acontece na pele e na maioria dos outros

tecidos, com um ponto de partida na camada conjuntiva através da formação de tecido de granulação e só posterior cobertura epitelial por migração do epitélio queratinizante. Mais tarde, outros autores discordaram destas observações, defendendo que a reparação cicatricial da MT se inicia pela formação de uma ponte de epitélio queratinizante sobre o defeito, inicialmente sem qualquer suporte, e só secundariamente apoiado por tecido de granulação.<sup>37,39,62-65</sup> Após um estudo experimental de microperfurações timpânicas em cobaias, Clawson & Litton<sup>66</sup> afirmaram que o traumatismo estimulava os centros de germinação epitelial a produzir queratinócitos, que avançariam centrípeta em toda a circunferência da perfuração, até o seu encerramento. Deste modo, ao contrário da pele onde se dá uma estimulação máxima no centro da lesão, na MT a estimulação teria um ponto de partida mais periférico, já que as células da camada proliferativa basal eventualmente estarão ausentes nos bordos da perfuração.<sup>62,67-69</sup> Segundo Johnson & Hawke<sup>70</sup>, o primeiro contato entre os bordos opostos da perfuração é um fenômeno passivo, efetuado através dos esporões de queratina. Para O'Donoghue<sup>71</sup>, segundo uma investigação efectuada em MTs tratadas com tubos de ventilação, a capacidade proliferativa estaria dispersa por várias regiões da MT, em lugar de se encontrar restrita a um centro germinativo epitelial localizado. Em outros estudos em que se procedeu à imunolocalização *in situ* de F-actina, uma proteína contráctil do cito-esqueleto, importante na cinética celular, foi revelado que o estrato basal da camada epitelial externa da MT é rico nesta proteína, o que faz pressupor que este estrato também desempenhará um papel na migração epitelial.<sup>72,73</sup> No que diz respeito ao papel desempenhado pela mucosa na dinâmica da cicatrização timpânica, as opiniões divergem. Para Weinberger e colegas<sup>73</sup> a camada medial mucosa da MT seria das primeiras estruturas a encerrar a perfuração, enquanto que Smallman e co-autores<sup>74</sup> demonstraram que a mucosa desempenharia um papel muito pouco significativo neste contexto.

No presente estudo II<sup>48</sup> constatou-se que nas MTs com OMA e também, de forma nitidamente mais lenta, nas MTs não-infectadas, os bordos da incisão de miringotomia apresentaram sinais de estimulação em toda a sua circunferência e contribuíram para um encerramento centrípeta relativamente ao cerne da perfuração, tal como descrito por Clawson & Litton.<sup>66</sup> Contudo, os nossos resultados permitem ir mais longe e afirmar a existência, antes das 24 horas pós-miringotomia, dum predomínio da proliferação do bordo da perfuração adjacente ao cabo do martelo. Esta proliferação assimétrica dos bordos da incisão traduz-se num vetor mais potente de regeneração de tipo centrífugo (i.e. do cabo do martelo para o *annulus*), neste caso relativamente ao centro da própria MT. Aliás, este tipo de predomínio centrífugo observado na cicatrização da incisão de miringotomia no rato, enquadra-se no padrão da cicatrização observado em perfurações timpânicas humanas traumáticas.<sup>75,76</sup>

Na linha dos trabalhos em cobaias efectuados por Taylor & McMinn<sup>59,60</sup>, é ainda possível pressupor a partir da presente dissertação que o vetor predominante de encerramento da perfuração, com predomínio da cicatrização da região do cabo do martelo em direcção ao *annulus*, siga as linhas de migração epitelial normal da MT do Rato demonstradas por Kakoi e co-investigadores.<sup>77</sup> Aliás,

Reeve<sup>67</sup> já havia sugerido que, na ausência de complicações secundárias, a falha de reordenação dos fragmentos timpânicos constitui a única razão responsável por uma cicatrização deficiente e conseqüentemente pelo desenvolvimento de perfurações crônicas em cobaias.

Igualmente no estudo II<sup>48</sup>, ao compararem-se as fases precoces da cicatrização de incisões de miringotomia em MTs infectadas e não-infectadas, comprova-se que o avanço do epitélio queratinizante e do respectivo esporão de queratina se processa, de fato, como se tratasse de uma cabeça-de-ponte. Todavia, ficou igualmente claro que, para que este fenômeno decorra de forma harmoniosa, o epitélio precisa de ser sustentado em simultâneo pela proliferação do tecido conjuntivo subjacente, e não apenas secundariamente como vários autores tem defendido.<sup>39,62,63,74</sup> Aliás, parece perfeitamente lógico que assim aconteça, pois os fenômenos de angiogênese – necessários a todo o tipo de cicatrização – ocorrem apenas no interior da *lamina propria*.<sup>78</sup>

Não menos interessante foi ter-se verificado também no estudo II.<sup>48</sup> que as perfurações das MT das orelhas com OMA tenham encerrado muito mais precoce e exuberantemente do que nas MTs não infectadas. Tal parece estar intimamente associado às alterações várias que a infecção provoca na MT, com hipertrofia ao nível da camada queratinizante e também da *lamina propria* conjuntiva. Com efeito, é possível que a inflamação resultante da OMA, através da presença de um intenso infiltrado celular associado à libertação de diversos mediadores e de fatores de crescimento, contribua para o encerramento mais acelerado das incisões de miringotomia. De modo semelhante, verificou-se que em feridas cutâneas onde se efetuou a aplicação tópica de bactérias não-viáveis, da sua parede citoplasmática ou simplesmente de peptidoglicanos da própria parede celular ocorria facilitação do processo da cicatrização.<sup>79,80</sup>

Pode-se assim afirmar que o presente estudo II<sup>48</sup> contraria uma corrente que atribui à presença de infecção a causa freqüente de falência do encerramento de perfurações timpânicas agudas.<sup>81-83</sup> Aliás, em sintonia com os resultados da presente apresentação, é interessante que outros autores já houvessem mencionado ser a OMA, em determinadas circunstâncias, estimuladora da cicatrização secundária de perfurações timpânicas crônicas.<sup>84-86</sup> Os resultados agora apresentados, nos estudos I<sup>47</sup> e II<sup>48</sup>, são de maneira a poder inferir-se que a miringotomia no decurso da OMA se associa a um risco extremamente reduzido de degenerar numa perfuração crônica. Em contrapartida, a rapidez com que o encerramento da incisão se processa implicará necessariamente um período muito curto de arejamento da orelha média, o que em parte poderá explicar a ausência de diferenças entre a evolução da OMA nas orelhas miringotomizadas e as orelhas não-miringotomizadas no estudo II.<sup>48</sup>

Valerá a pena notar que Gillman e colegas<sup>87</sup>, referindo-se à cicatrização cutânea, haviam sugerido há já vários anos a possível influência que as células da camada epidérmica podem exercer no comportamento celular do tecido conjuntivo e vice-versa. Os conhecimentos atuais sobre fatores de crescimento e os elementos de regulação da expressão de diversos genes durante a cicatrização<sup>88-90</sup> têm vindo a sustentar esta hipótese.

Para finalizar, e não menos importante em termos histopatológicos, foram os dados colhidos no estudo II<sup>48</sup> quanto à dinâmica do encerramento das perfurações timpânicas no rato, que, de fato, tem início poucas horas após a agressão, ao contrário dos quatro dias inicialmente referidos por Clawson & Litton<sup>66</sup> no seu estudo em cobaias. É também curioso que McMinn & Taylor<sup>61</sup>, num outro artigo sobre a citologia da reparação de perfurações timpânicas experimentais, também em cobaias, tivessem mencionado não terem sido capazes de detectar qualquer papel dos mastócitos na cicatrização timpânica. É possível que esta afirmação, não corroborada pelos achados da presente investigação II<sup>48</sup> - em que observou uma degranulação mastocitária maciça na *pars flaccida* das MTs não infectadas seis horas após miringotomia - resulte tão-somente do fato dos seus autores não terem dedicado qualquer atenção à referida *pars flaccida*. Note-se que esta região da MT tem sido alvo de um interesse crescente, como área ativamente envolvida nos fenômenos inflamatórios da orelha média.<sup>22,91-93</sup> Da mesma forma, num estudo recente de Cayé-Thomasen & Tos<sup>29</sup>, encontraram-se mastócitos a infiltrar o quadrante ântero-superior da *pars tensa* na proximidade de possíveis perfurações timpânicas cicatrizadas, em fases tardias de OMA experimental. Com base nos presentes resultados experimentais, é lícito estabelecer analogias clínicas e eventualmente formular-se recomendações relativas a precauções na administração de produtos ou medicamentos com potencial inibitório da degranulação mastocitária, em doentes com perfurações timpânicas traumáticas ou nas fases imediatas pós-timpanoplastia.<sup>94,95</sup>

### Referências bibliográficas

1. Bluestone CD, Klein JO (1996) Otitis media, atelectasis, and Eustachian tube dysfunction. In: Bluestone C, Klein J, Kenna M (eds.). Pediatric Otolaryngology, vol.1, 3<sup>rd</sup> ed. WB Saunders CO, Philadelphia, PA, p.388-582.
2. Puhakka H, Virolainen E, Tuohimaa P, Aantaa E, Tuohima P, Eskola J, *et al.* (1979) Myringotomy in the treatment of acute otitis media in children. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 88:122-126.
3. Qvarnberg Y, Palva T (1980) Active and conservative treatment of acute otitis media: prospective studies. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89:269-270.
4. Engelhard D, Strauss N, Jorczak-Sarni L, Cohen D, Sacks T, Shapiro M (1989) Randomized study on myringotomy, amoxicillin/clavulanate, or both for acute otitis media in infants. *Lancet* 2:141-143.
5. Kaleida P, Casselbrant M, Rockette H, Paradise J, Bluestone C, Blatter M, *et al.* (1991) Amoxicillin or myringotomy or both for acute otitis media: results of a randomized clinical trial. *Pediatrics* 87:466-474.
6. Baquero F, Cantón R, Baquero-Artigao F (1997) Current patterns and evolution of antibiotic resistance among bacterial pathogens involved in acute otitis media. *Clin Microbiol Infect Suppl* 3:S26-S33.
7. Jacobs MR, Dagan R, Appelbaum PC, Burch DJ (1998) Prevalence of antimicrobials-resistant pathogens in middle ear fluid: multinational study of



- 917 children with acute otitis media. *Antimicrob Agents Chemother* 42:589-595.
8. Felmingham D, Grüneberg R, and the Alexander Project Group (2000) The Alexander Project 1996-1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 45:191-203.
  9. Gehanno P, Panajotopoulos A, Barry B, Nguyen L, Levy D, Bingen E, Berche P (2001) Microbiology of otitis media in the Paris, France, area from 1987 to 1997. *Pediatr Infect Dis J* 20: 570-573.
  10. Pichichero ME (2000) Acute otitis media: Part I. Improving diagnostic accuracy. *Am Fam Physician* 61:2051-2056.
  11. Spratley J, Hellström S, Eriksson PO, Pais-Clemente M (2002) Myringotomy Delays the Tympanic Membrane Recovery in Acute Otitis Media. A Study in a Rat Model. *Laryngoscope* 102:1474-1481. 21.
  12. Friedman I (1955) The comparative pathology of otitis media – experimental and human. *J Laryngol Otol* 69:27-50, 588-601.
  13. Giebink GS, Payne EE, Mills EL, Juhn SK, Quie PJ (1976) Experimental otitis media due to *Streptococcus pneumoniae*: immunopathogenic response in the chinchilla. *J Infect Dis* 134:595-604.
  14. Chung MH, Enrique R, Lim DJ, DeMaria TF (1994) *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*-induced experimental otitis media in the chinchilla. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 114:415-422.
  15. Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ, *et al.* (2002) Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA* 287:1710-1715.
  16. Fulghum RS, Brinn JE, Smith AM, Daniel SJ, Loesche PJ (1982) Experimental otitis media in gerbils and chinchillas with *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and other aerobic and anaerobic bacteria. *Infect Immun* 36:802-810.
  17. Hueb MM, Goycoolea MV, Paparella MM, Muchow D (1996) Experimental studies of the pathogenesis of granulation tissue in the middle ear. In: Lim DJ, Bluestone CD, Casselbrandt ML, Klein JO, Ogra P (Eds.) *Recent Advances in Otitis Media*. BC Decker Inc., Ontario, Canada p.451-452.
  18. Hermansson A, Emgård P, Prellner K, Hellström S (1988) A rat model for pneumococcal otitis media. *Am J Otolaryngol*, 9:97-101.
  19. Hermansson A, Prellner K, Hellström S (1990) Persistent structural changes in the middle ear mucosa of the rat, after experimentally induced episode of pneumococcal otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 109:421-430.
  20. Hermansson A, Melhus A, Westman E, Magnuson K, Hellström S, Prellner K (1996) Purulent otitis media caused by different bacteria: a comparison in the rat model. In: Lim DJ, Bluestone CD, Casselbrandt ML, Klein JO, Ogra P (Eds.) *Recent Advances in Otitis Media*. BC Decker Inc., Ontario, Canada p.516-517.
  21. Gröte J, Bakker D, Hesseling S, Blitterswijk C (1989) Tympanic membrane structure during a *Staphylococcus aureus*-induced middle ear infection. A

- study in the rat middle ear. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 107:225-234.
22. Magnuson K, Hellström S (1994) Early structural changes in the rat tympanic membrane during pneumococcal otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 251:393-398.
  23. Magnuson K, Hermansson A, Hellström S (1996) Healing of the tympanic membrane after myringotomy during *Streptococcus pneumoniae* otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 105:397-404.
  24. Magnuson K, Hermansson A, Melhus A, Hellström S (1997) The tympanic membrane and middle ear mucosa during non-typeable *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus influenzae* type b acute otitis media: a study in the rat. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 117:396-405.
  25. Zeevi A, Alper CM, Balaban C, Diven W, Burckart G, Doyle WJ (1996) Early inflammatory events in a rat model of otitis media caused by infection with *Streptococcus pneumoniae*. In: Lim DJ, Bluestone CD, Casselbrandt ML, Klein JO, Ogra P (Eds.) *Recent Advances in Otitis Media*. BC Decker Inc., Ontario, Canada p.258-261.
  26. Forseni M (2000) Inflammatory mediators and immunocompetent cells in the middle ear with particular regards to otitis media and tympanosclerosis. Thesis. Dept. of Otorhinolaryngology, Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden.
  27. Hellström S, Mattsson C, Eriksson P-O (2000) Early events in the development of middle ear inflammatory conditions as reflected by changes in the pars flaccida – A sequential experimental study. In: Veldman J, Passali D and Lim D (Eds.) *New Frontiers in Immunobiology*. Kugler Publications, The Hague, The Netherlands, p.3-7.
  28. Cayé-Thomasen P, Hermansson A, Tos M, Prellner K (2001) Goblet cell density in acute otitis media caused by *Moraxella catarrhalis*. *Otol Neurotol* 22:11-14.
  29. Cayé-Thomasen P, Tos M (2002) Histopathologic differences due to bacterial species in acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 63:99-110.
  30. Westman E, Melhus A (2002) The treatment of *Haemophilus influenzae* acute otitis media with amoxicillin protects against reinfection but not against structural changes. *J Antimicrob Chemoter* 49:141-147.
  31. Hellström S, Hermansson A, Johansson U, Prellner K (1988b) Experimentally induced mucoid effusion in rat middle ear – a complete model for otitis media research? In: Lim DJ, Bluestone CD, Klein JO, Nelson JD (Eds.) *Recent Advances in Otitis Media*. BC Decker Inc., Ontario, Canada, p.462-464.
  32. Johansson U, Hellström S, Anniko M (1993) Round window membrane in serous and purulent otitis media – structural study in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102:227-235.
  33. Melhus A, Hermansson A, Prellner K, (1994) Non-typeable and encapsulated *Haemophilus influenzae* yield different clinical courses of experimental otitis media. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 114:289-294.
  34. Mattsson C, Magnuson K, Hellström S (1998) Myringotomy: a prerequisite for the development of myringosclerosis? *Laryngoscope* 108:102-106.
  35. Westman E, Melhus A, Hellström S, Hermansson A (1999) *Moraxella*



- catarrhalis*-induced purulent otitis media in the rat middle ear. Structure, protection, and serum antibodies. APMIS 107:737-746.
36. Schmidt SE, Hellström SO (1991) Tympanic membrane structure – new views. A comparative study. ORL 53:32-36.
  37. Stenfors LE, Carlsöö, Winblad B (1981) Structure and healing capacity of the rat tympanic membrane after eustachian tube occlusion. Acta Otolaryngol (Stockh) 91:75-84.
  38. Stenfors LE (1980) Structure and pattern of motion of the tympanic membrane with special reference to experimental perforations and subsequent healing process. Thesis, Umeå University, Umeå, Sweden, p.7.
  39. Stenfors LE, Carlsöö, Salen, Winblad B (1980) Repair of experimental tympanic membrane perforations. Acta Otolaryngol (Stockh) 90:332-341.
  40. Hellström S, Spandow O (1994) Exogenous heparin topically administered aids the remodeling of connective tissue in the healing of experimental tympanic membrane perforations. ORL 56:45-50.
  41. Spandow O, Hellström S, Schmidt SH (1990) Hydrocortisone delay of tissue repair of experimental tympanic membrane perforations. Ann Otol Rhinol Laryngol 99:647-653.
  42. Laurent C, Hellström S, Fellenius E (1988) Hyaluran improves the healing of tympanic membrane perforations. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 114:1435-41.
  43. Mondain M, Saffiedine S, Uziel A (1991) Fibroblast growth factor improves the healing of experimental tympanic membrane perforations. Acta Otolaryngol (Stockh) 111:337-341.
  44. Amoils CP, Jackler RK, Lustig LR (1992) Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor. Otolaryngol Head Neck Surg 107:669-683.
  45. Fina M, Baird A, Ryan A (1993) Direct application of basic fibroblast growth factor improves tympanic membrane perforation healing. Laryngoscope 103:804-09.
  46. Von Unge M, Dirckx JJ, Olivius NP (2003) Embryonic stem cells enhance the healing of tympanic membrane perforations. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 67:215-219.
  47. Spratley, J, Sjöstedt A, Cotta F, Lunet N, Pereira C, Feliciano T, Pais-Clemente M (2003) Miringotomia na otite média aguda da criança. Estudo clínico e microbiológico pelo método PCR. Rev Port ORL 41(3):251-264.
  48. Spratley J, Hellström S, Eriksson PO, Pais-Clemente M (2002) Early Structural Tympanic Membrane Reactions to Myringotomy. A Study in an Acute Otitis Media Model. Acta Otolaryngol [Stockh] 122:479-487.
  49. Spratley J, Pais-Clemente M. (2005) Intra- and Extra-Temporal Bone Complications of Otitis Media. *In: Atlas of Otitis Media*, Paparella M., DeSouza C., Sperling N. (eds.), Bhalani Publishing House, Mumbai, India, pp.88-111.
  50. Howie VM, Ploussard JH (1972) Efficacy of fixed combination antibiotics versus separate components in otitis media. Effectiveness of erythromycin estolate, triple sulfonamide, ampicilin, erythromycin-triple sulfonamide, and placebo in

- 280 patients with acute otitis media under two and one-half years of age. *Clin Pediatr* 11:205-214.
51. Rosenfeld RM, Vertrees JE, Carr J, Cipolle RJ, Uden DL, Giebink GS, Canafax DM (1994) Clinical efficacy of antimicrobials drugs for acute otitis media: meta-analysis of 5400 children from 33 randomized trials. *J Pediatr* 124:355-367.
  52. van Buchem FL (1987) Antibiotics for otitis media? *J R Coll Gen Pract* 37:367-371.
  53. Del Mar C, Glaziou P, Hayem M (1997) Are antibiotics indicated as initial treatment for children with acute otitis media? A meta-analysis. *BMJ* 314:1526-1529.
  54. Molstad S, Eriksson M, Asplund R, Holm S (2000) Behandling av akutöroninflammation hos barn—Konsensusuttalande. In: Landstingsförbundet, Medicinska forskningsrådet och Socialstyrelsen i samverkan, AB C O Ekblad & Co, Västervick, Sweden, p.1-24.
  55. Damoiseaux RA, van Balen FA, Hoes AW, Verheij TJ, de Melker R (2000) Primary care based randomized, double blind trial of amoxicillin versus placebo for acute otitis media in children aged under 2 years. *BMJ* 320:350-354.
  56. Hoberman A, Marchant CD, Kaplan SL, Feldman S (2002) Treatment of acute otitis media consensus recommendations. *Clin Pediatr (Phila)* 41:373-390
  57. Roosa DB (1873) A practical treatise of the diseases of the ear including the anatomy of the organ. William Wood & Co., New York, E.U.A.
  58. Kristensen S (1992) Spontaneous healing of traumatic tympanic membrane perforations in man: A century of experience. *J Otol Laryngol* 106:1037-1050.
  59. Taylor M, McMinn R (1965) Healing of experimental perforations of the tympanic membrane. *J Laryngol Otol* 79:148-158.
  60. Taylor M, McMinn RM (1967) Cytology of repair in experimental perforation of the tympanic membrane and its relationship to chronic perforations in man. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 71:802-812.
  61. McMinn MH, Taylor M (1966) The cytology of repair in experimental perforations of the tympanic membrane. *Br J Surg* 53:222-232.
  62. McIntire C, Benitez JT (1970) Spontaneous repair of the tympanic membrane: histopathological studies in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 79:1129-1131.
  63. Reijnen CJ, Kuipers W (1971) The healing pattern of the drum membrane, *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 287:S1-S74.
  64. Söderberg O, Hellström S, Stenfors LE (1984) Myringotomy made by CO2 laser. An alternative to the ventilation tube. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 97:335-341.
  65. Söderberg O, Hellström S, Stenfors LE (1985) The healing pattern of experimental heat myringotomy. *Rev Laryngol Otol Rhinol* 106:81-85.
  66. Clawson JP, Litton WB (1971) The healing process of tympanic membrane perforations. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 75:1302-1312.

67. Reeve DR (1977) Repair of large experimental perforations of the tympanic membrane. *J Laryngol Otol* 91:767-778.
68. Boedts D (1978) The tympanic epithelium in normal and pathological conditions. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 32:294-419.
69. Olsen EG, Stenfors LE (1993) The behavior of tympanic membrane perforations in tissue culture: a scanning electron microscope study. *J Laryngol Otol* 107:1106-1109.
70. Johnson A, Hawke M (1987) The function of migratory epidermis in the healing of tympanic membrane perforations in the guinea pig. A photographic study. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 103:81-86.
71. O'Donoghue GM (1983) Epithelial migration on the guinea pig tympanic membrane: the influence of perforation and ventilation tube insertion. *Clin Otolaryngol* 8:297-300.
72. Boden P, Johnson A., Weinberg JM, Hawke M, Gotlieb A (1986) In situ localization of F-actin in the normal and injured guinea-pig tympanic membrane. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 101:278-285.
73. Weinberger JM, Hawke M, Gotlieb AI (1988) Repair of the wounded guinea pig tympanic membrane: organization of filamentous actin and special cellular reorganization. *J Otolaryngol* 17:352-358.
74. Smallman LA, Johnson AP, Kent SE (1989) The role of the different layers in healing of perforations of guinea pig tympanic membrane. A two dimensional histologic study. In: Tos M, Thomsen J, Peitersen E (Eds.) *Cholesteatoma and Mastoid Surgery*. Kugler & Ghedini Publications, Amsterdam, The Netherlands, p.297-302.
75. Christiansen CB (1984) Photography in the treatment of tympanic membrane perforations. *J Laryngol Otol* 98:107-111.
76. Makino K, Amatsu M, Kinishi M, Mohri M (1990) Epithelial migration in the healing process of tympanic membrane perforations. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 247:352-355.
77. Kakoi H, Anniko M, Pettersson CA (1996) Auditory epithelial migration: I. Macroscopic evidence of migration and pathways in rat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 116:435-438.
78. Hellström S, Spratley J, Eriksson PO, Pais-Clemente M (2003) Tympanic membrane vessels revisited. A study in an animal model. *Otol Neurotol* 24:494-499.
79. Levenson S, Chang T, Kan-Gruber D, Gruber C, Steinberg J, Liu X, Watford A, Freundlich L, Rojkind M (1996) Accelerating effects of non-viable *Staphylococcus aureus*, its cell wall, and cell wall peptidoglycans. *Wound Rep Reg* 4:461-469.
80. Imegwu O, Chang TH, Steinberg JJ, Levenson S (1997) *Staphylococcus aureus* peptidoglycan ameliorates cyclophosphamide-induced impairment of wound healing. *Eur J Neuroscience* 5:364-368.
81. Henry GA (1945) Blast injuries of the ear. *Laryngoscope* 55:663-672.
82. Griffin WL (1979) A retrospective study of traumatic tympanic membrane perforations in a clinical practice. *Laryngoscope* 89:261-282.

83. Gladstone HB, Jackler RK, Varav K (1995) Tympanic membrane healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am* 28:913-932.
84. Stinson WD (1936) Reparative processes in the *membrana tympani*: some interesting manifestations. *Arch Otolaryngol* 24:600-605.
85. Derlacki EL (1953) Repair of central perforations of the tympanic membrane. *Arch Otolaryngol* 58:405-420.
86. Dragovich JJ (1962) Closure of tympanic membrane perforations. *Arch Otolaryngol* 75:206-207.
87. Gillman T, Penn J, Bronks D, Roux M (1963) Reactions of healing wounds and granulation tissue in man to auto-Thiersch, autodermal and homodermal grafts. *Br J Plast Surg* 6:153-159.
88. Werner S, Peters KG, Longaker MT, Fuller-Pace F, Banda MJ, Williams MT (1992) Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6896-6890.
89. Wearing HJ, Sherratt JA (2000) Keratinocyte growth factor signaling: a mathematical model of dermal-epidermal interaction in epidermal wound healing. *Math Biosci* 165:41-62.
90. Sayo T, Sugiyama Y, Takahashi Y, Ozawa N, Sakai S, Ishikawa O, Tamura M, Inoue S (2002) Hyaluronan synthase 3 regulates hyaluronan synthesis in cultures of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 118:43-48.
91. Alm PE, Bloom GD, Hellström SO, Salén B, Stenfors LE (1982) The release of histamine from pars flaccida mast cells: one cause of otitis media with effusion? *Acta Otolaryngol (Stockh)* 94:517-522.
92. Eriksson PO, Hellstrom S (2001) Degranulation of mast cells provokes a massive inflammatory reaction in the tympanic membrane. *Laryngoscope* 111(7):1264-70.
93. Eriksson PO, Hellström SO (2003) Acute otitis media develops in the rat after intranasal challenge of *Streptococcus pneumoniae*. *Laryngoscope* 113:2047-2051.
94. Cole ZA, Clough GF, Church MK (2001) Inhibition by glucocorticoids of the mast cell-dependent weal and flare response in human skin *in vivo*. *Br J Pharmacol* 132:286-292.
95. Schoch C (2003) In vitro inhibition of human conjunctival mast-cell degranulation by ketotifen. *J Ocul Pharmacol Ther* 19:75-81.