

Miringotomía en la Otitis Media Aguda

Aspectos Experimentales

Jorge Spratley y Pedro Marques

Una discusión sobre la miringotomía en el ámbito de la otitis media aguda (OMA) puede parecer, por lo menos a primera vista, el reavivar un tópico antiguo, ya que mucho se ha escrito sobre este asunto hace algunas décadas y poco en años recientes. Aunque los antibióticos hayan reducido las indicaciones para su utilización rutinaria, la miringotomía todavía es una intervención frecuente en las edades pediátricas y para la cual existen indicaciones formales.¹ Su importancia o no en la OMA no-complicada todavía es controversial – con defensores^{2,3} y detractores^{4,5} - pero, considerando la emergencia actual de bacterias con múltiples resistencias a los antibioticos⁶⁻⁹, es de preverse un resurgimiento de su utilización mucho más frecuente en el futuro. A título de ejemplo, todavía recientemente se asumía que para evaluar correctamente la eficacia antibiótica en la OMA - un problema tan actual – el recurso de la miringotomía seriada es indispensable¹⁰; se postula que solo así sería posible evaluar la erradicación del agente infeccioso, realizando el denominado examen de sensibilidad *in vivo* y, de este modo, inferir cual es la actividad real del antibiótico en estudio.

Por otro lado, la realización de la miringotomía en la OMA es indiscutible siempre que se enfrenta el riesgo potencial o declarado de una complicación.¹¹

El ratón como modelo de la miringotomía en la OMA

El estudio histopatológico de la dinámica de la cicatrización timpánica pos-miringotomía, por razones de ética, no es posible de efectuarse en el hombre. A lo largo de los años, la inducción experimental de la OMA para el estudio histopatológico ha sido desarrollada preferencialmente a través de la inoculación en el oído medio con diversos tipos de bacterias viables en diversas especies animales como la chinchilla¹²⁻¹⁵, el gerbil de Mongolia¹⁶, el gato¹⁷ y el ratón.¹⁸⁻³⁰ De todos estos modelos experimentales, sin duda uno de los más consistentemente evaluados y que más veces se emplea actualmente en estudios clínicos e histopatológicos de la OMA, ha sido el ratón de la estirpe Sprague-Dawley en el cual se procede a la inoculación intrabular de bacterias viables a través de un abordaje transcervical.^{18-20,22-24,26,28,29,31-35} Justamente por tratarse de un modelo con una alta eficacia y reproducibilidad, utilizados de rutina en los laboratorios de otopatología de la Universidad de Umeå, Suecia, donde se llevaron a cabo los experimentos aquí relatados, se recurrió a su uso.

Debe notarse que, además, las ya mencionadas semejanzas morfológicas entre la membrana timpánica (MT) del ratón y del hombre³⁶, favorecen su utilización

experimental y son mas consistentes las extrapolaciones que se efectúan así como las posibles aplicaciones con un eventual interés clínico. Por esta misma razón, varios autores han utilizado la MT del ratón como un modelo de estudio de la cicatrización después de la miringotomía, tanto espontáneamente^{23,37-39}, como después de la aplicación tópica de sustancias que van desde la heparina exógena⁴⁰, corticosteroides⁴¹, ácido hialurónico⁴², diversos factores de crecimiento⁴³⁻⁴⁵, hasta la utilización de células embrionarias.⁴⁶

La discusión que se desarrolla a seguir se reporta de dos trabajos experimentales efectuados en el modelo animal, los cuales buscaron evaluar: I) la evolución de la respuesta de la MT durante la OMA, con y sin miringotomía; II) las fases precoces de la cicatrización de la MT después de la miringotomía en la presencia de OMA contra miringotomía en MTs no-infectadas como controles.

Para ese efecto, bajo anestesia intravenosa inyectada en una vena de la cola, la *bulla timpánica* izquierda de cada animal fue abordada quirúrgicamente e inoculada con ≈ 50 microlitros de una suspensión que contenía 5×10^7 cfu/ml *Streptococcus pneumoniae* tipo 3 mientras la *bulla* derecha se dejó intacta. Cuarenta y ocho horas mas tarde todos los animales habían desarrollado OMA en el oído izquierdo, confirmado por otoscopia microscópica. En el estudio I⁴⁷, mitad de los animales fue randomizado para un grupo en el cual se efectuó una miringotomía padronizada en el cuadrante póstero-superior de la MT izquierda, y la otra mitad para un grupo en que las MT se dejaron intactas. Posteriormente, se realizó la eutanasia en series de cuatro ratones consecutivamente en los días 1, 2, 4 y 7. En el estudio II⁴⁸, las miringotomías se efectuaron tanto en el oído izquierdo portador de OMA como en el oído derecho no-infectado. A seguir, series de cuatro ratones de cada grupo, fueron sacrificados a las 3, 6, 9, 12, 24, y 48 horas, y al cuarto y séptimo días. Después de que cada animal era sacrificado, sus MTs fueron disecadas y procesadas según el protocolo de laboratorio para examen en microscopio electrónico.

Miringotomía en la Otitis Media Aguda No-Complicada?

Cuando analizados conjuntamente, los resultados mencionados en el estudio I⁴⁷ realzan a nivel experimental algunas consideraciones clínicas anteriormente publicadas^{4,5,49} y permiten ir todavía mas lejos, ya que, a nivel de la estructura de la MT, la realización de miringotomía durante un cuadro de OMA contribuyó para atrasar la resolución de los fenómenos inflamatorios en el período de convalecencia precoz de la infección, lo que contrastó con la forma rápida como se procesó la recuperación espontánea en las MTs controles con OMA y sin miringotomía. Estos resultados son complementarios a un estudio de Magnuson y colaboradores²³, en que los efectos de la miringotomía en la OMA fueron analizados a largo plazo. Esos investigadores observaron histopatológicamente que, seis y doce meses después de la incisión timpánica, las MTs sometidas a miringotomía durante la infección se mantenían más gruesas y con una desorganización de la estructura de la camada conjuntiva, en comparación con las MTs no miringotomizadas. En consecuencia, no quedan dudas de que la combinación de infección y miringotomía causa alteraciones duraderas en la estructura de la MT. Note que tanto el estudio I⁴⁷ como el estudio II⁴⁸ demostraron

que estas alteraciones estructurales de la MT se visualizan en las primeras fases, horas o pocos días, de la recuperación pos-miringotomía. Transpuestos para la práctica clínica diaria, el conjunto de datos referidos da crédito al punto de vista de los que defienden que la realización de la miringotomía en la OMA debe ser un acto de excepción, evitándose su uso sistemático en situaciones de OMA no-complicada. Sin embargo, esto no significa que el recurso de la miringotomía en la OMA deba evitarse siempre. Por el contrario, la miringotomía está formalmente indicada en la presencia de complicaciones supurativas, en casos refractarios al tratamiento médico, para análisis microbiológica del agente infectante, y eventualmente en enfermos con otalgia intensa.¹

Se debe resaltar el hecho de haberse demostrado en el estudio I⁴⁷, que el ratón posee una elevada capacidad de resolución espontánea de la OMA, lo que está en sintonía con los datos existentes en la literatura. Según Hermansson y co-autores¹⁹, la fase aguda de la OMA en el ratón comienza a declinar en el cuarto día después de la inoculación bacteriana. En otro estudio de OMA experimental por *S. aureus*, Gröte y colaboradores²¹ registraron un declinio de la inflamación al nivel de la MT al tercer día después del inicio de la infección. Se nota sin embargo, que las tasas de cura espontánea de la OMA parecen ser variables en el hombre, pudiendo llegar a 18% y 48% respectivamente en las infecciones por *S. pneumoniae* y *H. influenzae*.⁵⁰ Según un metanálisis realizado por Rosenfeld y colaboradores⁵¹, relativo a la eficacia de los antibióticos en el tratamiento de la OMA, la tasa de resolución clínica completa del episodio infeccioso sin usar antibióticos fue de 73%, entre 7 y 14 días. Este tipo de evidencia, complementado con datos de investigación clínica, han favorecido una corriente terapéutica que aboga por una actitud de vigilancia atenta, apenas con tratamiento sintomático de la OMA, y recurrir a la antibioticoterapia solo si la infección no desaparece espontáneamente en los días siguientes.⁵²⁻⁵⁶ Se resalta, sin embargo, que este tipo de abordaje terapéutico ha sido esencialmente defendido en países con un bajo índice de resistencias bacterianas y con sistemas de salud que permiten una evaluación clínica secuencial de los niños, sin cargos financieros adicionales para la familia del paciente.

Fenómenos Precoces de la Cicatrización de la Membrana Timpánica

La capacidad de cicatrización de la MT se reconoce desde hace tiempo, como fue presentado en una publicación de Roosa⁵⁷, en 1873, en la cual se afirma que el potencial regenerador de la MT es superior a cualquier otra membrana del cuerpo humano. Desde entonces fueron múltiples los estudios y muchas de las preguntas desvendadas en este dominio.⁵⁸ Aunque la cicatrización de las perforaciones timpánicas sea convencional en lo que respecta a los fenómenos hemostáticos y a la cadena de fenómenos inflamatorios, sus fases de proliferación y migración son distintas a las de otros tejidos, como resultado del modo complejo como la MT se encuentra suspendida en el aire. Así, mientras en la piel y en la mayoría de las otras estructuras se desarrolla una capa de tejido de granulación que sirve de plataforma a la proliferación del epitelio adyacente, los fenómenos de reparación de las lesiones de la MT tienen que desarrollarse en la ausencia de un soporte, como si se tratase de la construcción de un puente.³⁹

En estudios previos, sobre los aspectos citológicos de la cicatrización de la MT en modelos animales no infectados, fueron defendidas opiniones divergentes. Los trabajos pioneros en cobayas⁵⁹⁻⁶¹ sugirieron un cierre inicial de las perforaciones de la *pars tensa*, tal como ocurre en la piel y en la mayoría de los otros tejidos, con un punto de partida en la camada conjuntiva a través de la formación de tejido de granulación y solo posteriormente la cobertura epitelial por migración del epitelio queratinizante. Mas tarde, otros autores discordaron de estas observaciones, defendiendo que la reparación cicatricial de la MT se inicia por la formación de un puente de epitelio queratinizante sobre el defecto, inicialmente sin cualquier soporte, y solo secundariamente apoyado por tejido de granulación.^{37,39,62-65} Después de un estudio experimental de micro perforaciones timpánicas en cobayas, Clawson & Litton⁶⁶ afirmaron que el traumatismo estimulaba los centros de germinación epitelial a producir queratinócitos, que avanzarían centripetamente en toda la circunferencia de la perforación, hasta su cierre. De este modo, al contrario de la piel donde se da una estimulación máxima en el centro de la lesión, en la MT la estimulación tendría un punto de partida más periférico, ya que las células de la camada proliferativa basal eventualmente estarán ausentes en los bordes de la perforación.^{62,67-69} Según Jonson & Hawke⁷⁰, el primer contacto entre los bordes opuestos de la perforación es un fenómeno pasivo, efectuado a través de los espolones de queratina. Para O'Donoghue⁷¹, según una investigación efectuada en MTs tratadas con tubos de ventilación, la capacidad proliferativa estaría dispersa por varias regiones de la MT, en lugar de encontrarse restringida a un centro germinativo epitelial localizado. En otros estudios en que se procedió a la inmunolocalización *in situ* de F-actina, una proteína contráctil del cito-esqueleto, importante en la cinética celular, fue revelado que el extrato basal de la camada epitelial externa de la MT es rico en esta proteína, lo que hace suponer que este extracto también desempeñará un papel en la migración epitelial.^{72,73} Respecto al papel desempeñado por la mucosa en la dinámica de la cicatrización timpánica, las opiniones son divergentes. Para Weinberger y colegas⁷³ la capa mucosa de la MT sería de las primeras estructuras a cerrar la perforación, mientras que Smallman y co-autores⁷⁴ demostraron que la mucosa desempeñaría un papel muy poco significativo en este contexto.

En el presente estudio II⁴⁸ se constató que en las MTs con OMA y también, de forma nítidamente mas lenta, en las MTs no-infectadas, los bordes de la incisión de miringotomía presentaron signos de estimulación en toda su circunferencia y contribuyeron para un cierre centripeto relativamente al centro de la perforación, tal como descrito por Clawson & Litton.⁶⁶ Sin embargo, nuestros resultados permiten ir más lejos y afirmar la existencia, antes de las 24 horas pos-miringotomía, de un predominio de la proliferación del borde de la perforación adyacente al martillo. Esta proliferación asimétrica de los bordes de la incisión se traduce en un vector más potente de regeneración de tipo centrífugo (i.e. del mango del martillo para el *annulus*), en este caso relativamente al centro de la propia MT. Este tipo de predominio centrífugo observado en la cicatrización de la incisión de miringotomía en el ratón, se encuadra en el padrón de la cicatrización observado en perforaciones timpánicas humanas traumáticas.^{75,76}

En la línea de los trabajos en cobayas efectuados por Taylor & McMinn^{59,60}, es todavía posible suponer a partir de la presente disertación que el vector predominante de encerramiento de la perforación, con predominio de la cicatrización de la región del mango del martillo en dirección al *annulus*, siga las líneas de migración epitelial normal de la MT del ratón demostradas por Kakoi y co-investigadores.⁷⁷ Reeve⁶⁷ ya había sugerido que, en la ausencia de complicaciones secundarias, la falla de reordenamiento de los fragmentos timpánicos constituye la única razón responsable por una cicatrización deficiente y consecuentemente por el desarrollo de perforaciones crónicas en cobayas.

Igualmente en el estudio II⁴⁸, al compararse las fases precoces de la cicatrización de incisiones de miringotomía en MTs infectadas y no-infectadas, se comprueba que el avance del epitelio queratinizante y del respectivo espolón de queratina se procesa, de hecho, como si se tratara de una cabeza-de-puente. Todavía, quedo igualmente claro que, para que este fenómeno siga de forma armoniosa, el epitelio requiere estar sustentado simultáneamente por la proliferación del tejido conjuntivo subyacente, y no solo secundariamente como varios autores han defendido.^{39,62,63,74} Parece perfectamente lógico que ocurra así, pues los fenómenos de angiogenesis – necesarios a todo el tipo de cicatrización – ocurren solo en el interior de la *lamina propia*.⁷⁸

No menos interesante fue haber verificado también en el estudio II.⁴⁸ que las perforaciones de las MT de los oídos con OMA hayan cerrado mucho más precozmente y exuberantemente que en las MTs no infectadas. Tal parece estar íntimamente asociado a las alteraciones que la infección provoca en la MT, con hipertrofia al nivel de la camada queratinizante y también de la *lámina propia* conjuntiva. Es posible que la inflamación resultante de la OMA, a través de la presencia de un intenso infiltrado celular asociado a la liberación de diversos mediadores y de factores de crecimiento, contribuya para el cierre más rápido de las incisiones de miringotomía. De modo semejante, se verificó que en las heridas cutáneas donde se efectuó la aplicación tópica de bacterias no-viables, de su pared citoplasmática o simplemente de peptidoglicanos de la propia pared celular ocurría facilitación del proceso de cicatrización.^{79,80}

Se puede afirmar que el presente estudio II⁴⁸ está contra una corriente que atribuye a la presencia de infección la causa frecuente de falla en el cierre de perforaciones timpánicas agudas.⁸¹⁻⁸³ En sintonía con los resultados de esta presentación, es interesante que otros autores ya hubieran mencionado ser la OMA, en determinadas circunstancias, estimuladora de la cicatrización secundaria de perforaciones timpánicas crónicas.⁸⁴⁻⁸⁶ Los resultados ahora presentados, en los estudios I⁴⁷ e II⁴⁸, son de manera a poder inferirse que la miringotomía en el curso de la OMA se asocia a un riesgo extremadamente reducido de degenerar una perforación crónica. En contrapartida, la rapidez con que el cierre de la incisión se procesa implicará necesariamente un período muy corto de ventilación del oído medio, lo que en parte podrá explicar la ausencia de diferencias entre la evolución de la OMA en los oídos con miringotomía y los oídos sin miringotomía en el estudio II.⁴⁸

Vale la pena notar que Gillman y colegas⁸⁷, refiriéndose a la cicatrización

cutánea, habían sugerido hace ya varios años la posible influencia que las células de la camada epidérmica pueden ejercer en el comportamiento celular del tejido conjuntivo y vice-versa. Los conocimientos actuales sobre factores de crecimiento y los elementos de regulación de la expresión de diversos genes durante la cicatrización⁸⁸⁻⁹⁰ han venido a sustentar esta hipótesis.

Para finalizar, y no menos importante en términos histopatológicos, fueron los datos tomados en el estudio II⁴⁸ en cuanto a la dinámica del cierre de las perforaciones timpánicas en el ratón, que, de hecho, se inicia pocas horas después de la agresión, al contrario de los cuatro días inicialmente referidos por Clawson & Litton⁶⁶ en su estudio en cobayas. Es también curioso que McMinn & Taylor⁶¹, en otro artículo sobre la citología de la reparación de perforaciones timpánicas experimentales, también en cobayas, hubiesen mencionado no haber sido capaces de detectar cualquier papel de los mastócitos en la cicatrización timpánica. Es posible que esta afirmación, no corroborada por los hallazgos de esta investigación II⁴⁸ - en que se observó una degranulación mastocitaria maciza en la *pars flácida* de las MTs no infectadas seis horas después de una miringotomía - resulte solamente del hecho que los autores no dedicaron ninguna atención a la referida *pars flácida*. Nótese que esta región de la MT ha sido alvo de un interés creciente, como área activamente envuelta en los fenómenos inflamatorios del oído medio.^{22,91-93} De la misma forma, en un estudio reciente de Cayé-Thomasen & Tos²⁹, se encontraron mastocitos a infiltrar el cuadrante antero-superior de la *pars tensa* en la proximidad de posibles perforaciones timpánicas cicatrizadas, en fases tardías de OMA experimental. En base a los presentes resultados experimentales, es lícito establecer analogías clínicas y eventualmente formular recomendaciones relativas a precauciones en la administración de productos o medicamentos con potencial inhibitorio de la degranulación mastocitaria, en pacientes con perforaciones timpánicas traumáticas o en las fases inmediatas post-timpanoplastia.^{94,95}

Referencias 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, 3rd 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, Enggård 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, Hesselning 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 Peadiat* 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) Citology of repair in experimental perforation of the tympanic membrane and its relationship to chronic perforations in man. *Trans Am Acad Ophtalmol 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.