

JORGE EDUARDO DE FREITAS SPRATLEY

# **OTITE MÉDIA AGUDA ESTUDO CLÍNICO NA CRIANÇA E EXPERIMENTAL NO RATO**

INTERACÇÕES ENTRE O OUVIDO MÉDIO E O OUVIDO INTERNO,  
MIRINGOTOMIA E ASPECTOS DA CICATRIZAÇÃO DA MEMBRANA TIMPÂNICA



PORTO | 2003

**Jorge Eduardo de Freitas Spratley**

**OTITE MÉDIA AGUDA**

**ESTUDO CLÍNICO NA CRIANÇA E EXPERIMENTAL NO RATO**

**INTERACÇÕES ENTRE O OUVIDO MÉDIO E O OUVIDO INTERNO,  
MIRINGOTOMIA E ASPECTOS DA CICATRIZAÇÃO DA MEMBRANA TIMPÂNICA**

*Dissertação de candidatura ao grau de  
Doutor apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade do Porto*

**PORTO  
2003**

### **Ficha Técnica**

<i>Título</i>	<b>Otite Média Aguda. Estudo Clínico na Criança e Experimental no Rato</b>
<i>Autor</i>	Jorge Eduardo de Freitas Spratley
<i>Edição</i>	Do Autor (j.spratley@mail.telepac.pt)
<i>Produção Gráfica</i>	MEDISA - Edições e Divulgações Científicas, Lda 4000-270 Porto, Portugal www.medisa.pt
<i>Depósito-Legal</i>	213026/04
<i>ISBN</i>	972-9098-83-2
<i>Ano</i>	2003

Artigo 48º, parágrafo 3

“A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.”

*(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto – Decreto 19 337,  
de 29 de Janeiro de 1931)*

## CORPO CATEDRÁTICO DA FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

### **Professores Efectivos**

*Doutor Alberto Manuel Barros da Silva*

*Doutor Alexandre Sousa Pinto*

*Dôtor Altamiro Costa Pereira*

*Doutor Álvaro Leal Machado de Aguiar*

*Doutor António Freitas Ribeiro Saraiva*

*Doutor António José Pacheco Palha*

*Doutor Belmiro dos Santos Patrício*

*Doutor Cassiano Pena de Abreu Lima*

*Doutor Daniel Filipe da Lima Moura*

*Doutora Deolinda Maria Lima Teixeira*

*Doutor Eduardo Rodrigues Pereira*

*Doutor Francisco Carneiro Chaves*

*Doutora Isabel Maria Pereira Ramos*

*Doutor Jorge Castro Tavares*

*Doutor José Agostinho Marques Lopes*

*Doutor José Henrique Pinto de Barros*

*Doutor José Lopes Teixeira Amarante*

*Doutor Manuel Sobrinho Simões*

*Doutor Manuel Cardoso de Oliveira*

*Doutor Manuel Rodrigues Gomes*

*Doutor Manuel Maria Paula Barbosa*

*Doutora Maria Amélia Duarte Ferreira*

*Doutora Maria Dulce Cordeiro Madeira*

*Doutora Maria de Fátima Carneiro*

*Doutora Maria Isabel Amorim de Azevedo*

*Doutor Patrício Manuel Araújo Silva*

*Doutor Rui Manuel Mota Cardoso*

*Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães*

## **Professores Jubilados ou Aposentados**

*Doutor Abel Sampaio Tavares*  
*Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares*  
*Doutor António Augusto Lopes Vaz*  
*Doutor António Almeida Coimbra*  
*Doutor António Falcão de Freitas*  
*Doutor António Fernandes da Fonseca*  
*Doutor António Fernandes Ribeiro Braga*  
*Doutor António Luís Tomé da Rocha Ribeiro*  
*Doutor António Manuel Araújo Teixeira*  
*Doutor António Silva Leal*  
*Doutor Artur Giesteira de Almeida*  
*Doutor Cândido Alves Hipólito Reis*  
*Doutor Carlos Magalhães Ramalhão*  
*Doutor Casimiro Águeda Azevedo*  
*Doutor Celso Paiva da Cruz*  
*Doutor Daniel Pinto Serrão*  
*Doutor Fernando Cerqueira Magro*  
*Doutor Francisco Sousa Lé*  
*Doutor Henrique Lecour*  
*Doutor João da Silva Carvalho*  
*Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva*  
*Doutor Joaquim Oliveira da Costa Maia*  
*Doutor José Augusto Fleming Torrinha*  
*Doutor José Carvalho de Oliveira*  
*Doutor José Fernando Castro Correia*  
*Doutor José Manuel Pina Cabral*  
*Doutor José Manuel Mesquita Guimarães*  
*Doutor José Pinto de Barros*  
*Doutor Levi Eugénio Guerra*  
*Doutor Luís António Pereira Leite*  
*Doutor Manuel Amarante Júnior*  
*Doutora Maria da Conceição Magalhães*  
*Doutor Mário Cerqueira Gomes Braga*  
*Doutor Valdemar Miguel Santos Cardoso*  
*Doutor Walter Osswald*  
*Doutor Wilhelm Ludwig Osswald*

O Decreto-Lei nº388/70, Art. 8º, parágrafo 2, refere:

*“É admitido na elaboração da dissertação o aproveitamento, total ou parcial, do resultado de trabalhos já publicados, mesmo em colaboração, devendo neste caso, o candidato esclarecer qual a sua contribuição pessoal”.*

Foram compilados os seguintes trabalhos na presente dissertação, que serão referenciados pelos respectivos números romanos. A ordem de apresentação corresponde ao modo como são expostos na dissertação.

- I. Spratley J, Moura C, Cardoso V, Barros H, Pais-Clemente M. (1997) Audiometric thresholds in acute otitis media. In: Lim D, Bluestone C, Casselbrant M, Klein J, Ogra P (Eds.) Recent Advances in Otitis Media, BC Decker Inc., Ontario, p. 362-364.
- II. Spratley J, Schachern P, Paparella M, Yoon T, Le CT. (2000) Histopathologic study of serous labyrinthitis in human temporal bones. Folia ORL 6: 39-46.
- III. 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: 251-264.
- IV. 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.

- V. 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.
- VI. Spratley J, Hellström S, Mattsson C, Pais-Clemente M (2001) Topical ascorbic acid reduces the myringosclerosis in perforated tympanic membranes: A study in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110: 585-591.

A contribuição pessoal nestes trabalhos foi a seguinte:

Contribuição na sua concepção, colaboração na recolha do material, obtenção dos resultados e redacção da primeira versão do manuscrito.



## AGRADECIMENTOS

*Este estudo foi realizado no Serviço de Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, no Departamento de Ciências Clínicas – Otorrinolaringologia da Universidade de Umeå, Suécia, e no Laboratório de Otopatologia da Universidade de Minnesota, Estados Unidos da América.*

*Desejo expressar a minha sincera gratidão a todos os que de alguma forma tornaram esta tese uma realidade. Gostaria de mencionar em particular:*

*Professor Doutor Manuel Pais Clemente, meu Mestre, Amigo, orientador e grande impulsionador desta dissertação. Por me ter despertado o interesse pela investigação em Otorrinolaringologia e pelo seu exemplo de energia inquebrantável para enfrentar novos desafios. Agradeço a confiança que em mim depositou, o seu profundo espírito de exigência, a sua análise construtiva do trabalho e o seu encorajamento permanente.*

*Professor Doutor Norberto Teixeira Santos, Mestre de saudosa memória e co-orientador desta dissertação até à data do seu prematuro falecimento. Recordo os conselhos amigos que me transmitiu, os comentários genuínos com que temperava o seu discurso e o apoio que sempre me dispensou.*

*Professor Doutor Sten Hellström, co-orientador e fonte permanente de inspiração científica. Por me ter aberto as portas do seu Departamento e ensinado as técnicas de investigação otológica no modelo animal. Pelo seu entusiasmo contagiante e rigor científico. Pela amizade cimentada por muitas horas de experiências e discussões científicas, mas também pelos momentos refrescantes de descontração passados em conjunto.*

*Professor Doutor Michael Paparella, por ter permitido o meu primeiro estágio no estrangeiro como Fellow da International Hearing Foundation e supervisionado a minha iniciação na histopatologia do osso temporal humano. Pelos numerosos conceitos clínicos que me transmitiu, pelo seu modo afável e pela amizade que me tem dispensado ao longo dos anos. Por tudo o que tem de estimulante trabalhar com uma personalidade tão singular da Otorrinolaringologia.*

*Professores Doutores António Coimbra, Manuel Miranda Magalhães, Manuel Paula Barbosa, Henrique Barros e António Freitas da Fonseca, pelo apoio generoso e comentários construtivos que me dedicaram sempre que frequentei as instalações dos respectivos Institutos e Serviços sob a sua liderança.*

*Per-Olof Eriksson, Amigo e co-autor, pela partilha do seu gabinete de trabalho e de momentos de bom humor. Pela sua rara disponibilidade para ajudar.*

*Co-autores Carla Moura, Vítor Cardoso, Patricia Schachern, Tae Yoon, Chap T. Le, Anders Sjöstedt, Fernanda Cotta, Nuno Lunet, Cecília Pereira, Telma Feliciano e Cecília Mattsson, pelos seus contributos e empenhamento. Aos colaboradores Margarida Tavares, Miguel Ângelo Amorim, Bengt Lundquist, Carin Olofsson e Cláudia Silva pelo apoio dispensado.*

*Cathrine Johansson, Ann-Louise Grehn, Kristina Forsgren, Sherry Fulton e Noriko Morizono, pela boa companhia durante longos dias de intenso trabalho laboratorial, e pelo excelente suporte técnico e fotográfico.*

*Professores Doutores Claude e Anna Laurent, pela hospitalidade encantadora com que me receberam em sua casa durante várias estadias em Umeå.*

*A todos os elementos do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de S. João, por assegurarem o serviço extra no decurso dos meus estágios no estrangeiro e pelo bom ambiente de trabalho diário. Ao corpo clínico do Departamento de Otorrinolaringologia da Universidade de Umeå, pela forma carinhosa como sempre me trataram.*

*A toda a minha família, muito especialmente à minha mulher Maria Pia e aos meus filhos Pia e Jorge, pela força que continuamente me transmitiram e pela compreensão que demonstraram ao longo destes anos. Sem o vosso apoio esta caminhada não teria feito sentido.*

*A presente investigação foi financiada em parte por:*

*NIH Grant #P01-DC-00133 do National Institute of Deafness and Other Communicative Disorders; International Hearing Foundation; Swedish Medical Research Council (No.K200073X-6578-18C); Swedish Society for Medical Research; Medical Faculty of Umeå University; Spjutspetsmedel Västerbotten County Council; Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde do Ministério da Saúde (Proj. 109/99).*

## ABREVIATURAS UTILIZADAS NA INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO GLOBAL

<b>dB</b>	Decibel
<b><i>H. influenzae</i></b>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<b>kHz</b>	KiloHertz
<b><i>M. catarrhalis</i></b>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<b>MJR</b>	Membrana da janela redonda
<b>MT</b>	Membrana timpânica
<b>OMA</b>	Otite média aguda
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> / Reacção em cadeia da polimerase
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b><i>S. pneumoniae</i></b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b><i>S. pyogenes</i></b>	<i>Streptococcus pyogenes</i>

*Ilustração da Capa:* Otoendoscopia da membrana timpânica de criança com otite média aguda

## ÍNDICE

<b>PREÂMBULO .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
<b>I. O OUVIDO .....</b>	<b>7</b>
1. O Ouvido e a Audição .....	7
2. O Ouvido Médio .....	9
2.1. Aspectos Morfofuncionais .....	11
2.1.1. A membrana timpânica .....	11
2.1.2. A membrana da janela redonda .....	17
2.2. A Otite Média Aguda .....	22
2.2.1. Definição e prevalência .....	22
2.2.2. Etiologia .....	25
i) Agentes infecciosos .....	25
ii) Factores de risco .....	28
2.2.3. Diagnóstico .....	29
2.2.4. Tratamento .....	31
i) Antimicrobianos .....	31
ii) Miringotomia .....	33
2.2.5. Profilaxia .....	35
2.2.6. Complicações e sequelas .....	37
i) Miringosclerose .....	38
<b>II. OBJECTIVOS .....</b>	<b>41</b>
Bibliografia .....	45
<b>PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>75</b>
<i>Audiometric thresholds in acute otitis media .....</i>	<i>77</i>
<i>Histopathologic study of serous labyrinthitis in human temporal bones .....</i>	<i>83</i>

<i>Miringotomia na otite média aguda da criança. Estudo clínico e microbiológico pelo método PCR</i> .....	93
<i>Myringotomy delays the tympanic membrane recovery in acute otitis media. A study in a rat model</i> .....	109
<i>Early structural tympanic membrane reactions to myringotomy. A study in an acute otitis media model</i> .....	119
<i>Topical ascorbic acid reduces the myringosclerosis in perforated tympanic membranes: A study in the rat</i> .....	131
<b>DISCUSSÃO GLOBAL</b> .....	141
<b>I. INTERACÇÕES ENTRE O OUVIDO MÉDIO E O OUVIDO INTERNO</b> .....	143
1. Labirintite Serosa .....	143
2. Repercussões Auditivas .....	151
<b>II. A MIRINGOTOMIA NA OTITE MÉDIA AGUDA</b> .....	156
1. O Rato como modelo da miringotomia na otite média aguda .....	156
2. A miringotomia como abordagem para o diagnóstico microbiológico da otite média aguda .....	158
3. Miringotomia na otite média aguda não-complicada? .....	164
4. Fenómenos precoces da cicatrização da membrana timpânica ....	168
<b>III. MIRINGOSCLEROSE. OCORRÊNCIA APÓS MIRINGOTOMIA E SUA PREVENÇÃO</b> .....	174
Bibliografia .....	180
<b>RESUMO E CONCLUSÕES</b> .....	205
<b>SUMMARY AND CONCLUSIONS</b> .....	211
<b>RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS</b> .....	217

# **Preâmbulo**

---

---

O teor da presente dissertação, centrado na temática da otite média aguda (OMA), insere-se numa trajectória profissional e de investigação dedicada à Otorrinolaringologia e muito particularmente à Otologia.

O interesse do candidato pela Otologia despertou logo no início da sua formação como Interno da Especialidade de Otorrinolaringologia. Impulsionado pelo Prof. Doutor Pais Clemente, cedo se envolveu na investigação histopatológica do ouvido. Recorda com muito agrado os tempos em que frequentou o Instituto de Anatomia onde o Prof. Doutor Manuel Paula Barbosa gentilmente lhe cedia ossos temporais de ratos, os quais posteriormente processava laboratorialmente e estudava no microscópio electrónico do Instituto de Histologia e Embriologia, sob a supervisão do Prof. Doutor António Coimbra e posteriormente do saudoso Prof. Doutor Miranda Magalhães. Nesta fase, em que produziu a sua primeira publicação científica (Spratley & Pais-Clemente 1989), foi construindo as bases necessárias para enfrentar os sucessivos desafios com que se tem deparado ao longo da sua carreira.

Alguns anos mais tarde, movido pelo interesse do estudo da histopatologia do ouvido, teve oportunidade de estagiar no Laboratório de Histopatologia do Osso Temporal do Departamento de Otorrinolaringologia da Universidade de Minnesota, E.U.A., sob a orientação do Prof. Doutor Michael Paparella. Neste Laboratório encontrou uma das maiores colecções mundiais de ossos temporais humanos, devidamente seccionados e preparados para estudo histopatológico. Foram momentos muito profícuos, pois através da discussão com vários investigadores vindos de



todos os continentes, contactou com novos conceitos de Otologia, como: o "continuum" da otite média, otite média silenciosa, ou ainda a noção de interações entre o ouvido médio e ouvido interno.

Entretanto, no Serviço de Otorrinolaringologia, prosseguiu com projectos de investigação clínica no domínio da otite média. A sua ligação, desde o início, à criação do Sector de Otorrinolaringologia Pediátrica do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de S. João, por decisão conjunta do Prof. Doutor Pais Clemente e do Prof. Doutor Norberto Santos, encargo que manteve sucessivamente durante a direcção do Prof. Doutor Mário Queirós e actualmente do Prof. Doutor Álvaro Aguiar, possibilitou o exercício de uma prática clínica diária em contacto com crianças sofrendo de otite média e avaliar as complicações e sequelas desta doença tão prevalente nessa faixa etária.

Mais recentemente, a oportunidade de trabalhar sob a supervisão extraordinária do Prof. Doutor Sten Hellström, no Laboratório de Otologia do Departamento de Otorrinolaringologia da Universidade de Umeå, permitiu-lhe desenhar e executar todo o componente de investigação no modelo animal que constitui um dos pilares da presente dissertação.

# Introdução

---

---

# I. O OUVIDO

## 1. O OUVIDO E A AUDIÇÃO

As diferentes estruturas anatómicas que compõe o ouvido formam um todo na transmissão sonora e, em última análise, na transdução do som em estímulo auditivo discriminável ao nível cerebral. O **ouvido externo**, com o pavilhão auricular e o canal auditivo externo, participa na localização da fonte sonora e desenvolve ressonâncias que intensificam a pressão sonora sobre a membrana timpânica (MT) na gama das frequências entre 2-7 kHz, no humano (Shaw 1974). As vibrações provocadas na MT apresentam um padrão complexo, que dependem da frequência sonora e das condições do ouvido médio (von Békésy 1941; Khanna & Tonndorf 1972; von Unge *et al.* 1994; Stasche *et al.* 1994). A participação do **ouvido médio** nos mecanismos de transmissão acústica pode considerar-se como um transformador de impedância (Pickles 1987), no qual as vibrações da MT em harmonia com a cadeia ossicular – martelo, bigorna e estribo – efectuam um processo de transferência da energia sonora pneumática aos fluidos cocleares. Sumariamente, este mecanismo de amplificação inclui os seguintes fenómenos (Pickles 1992): (a) a relação hidráulica que advém da área da MT ser substancialmente maior que a da platina do estribo, originando que a energia mecânica seja concentrada numa pequena área, (b) o efeito de alavanca dos ossículos que potenciam a força que o estribo exerce na janela oval, (c) o formato

cónico da membrana timpânica que faz com que o martelo se mova menos que a periferia da membrana timpânica, resultando num incremento do vigor do movimento do martelo. Na cóclea do **ouvido interno**, a oscilação do fluido perilinfático coclear origina movimentos ondulatórios da membrana basilar, e deste modo estimula as células ciliadas do neuroepitélio do órgão de Corti onde se efectua a transdução dos impulsos vibratórios em sinais bio-eléctricos. Este fenómeno é apenas possível devido às características singulares do micro-ambiente electrofisiológico proporcionado pelos fluidos do ouvido interno, nomeadamente a endolinfa produzida na estria vascular da cóclea. Estudos histopatológicos e electrofisiológicos indicam que, nas duas espiras e meia que compõe a estrutura coclear, a região basal é responsável pelo processamento dos sons agudos e a região apical pelos sons graves (Koenig 1949; Schucknecht 1953). Em resposta ao movimento da membrana basilar da cóclea, as células ciliadas libertam um neurotransmissor que despoleta um potencial de acção nas células nervosas do gânglio espiral localizado no modíolo coclear (Eybalin 1993; Trigueiros-Cunha *et al.* 2003). Daqui, os impulsos nervosos passam para o sistema nervoso central, através do nervo auditivo. No seu trajecto pela via acústica cerebral, os sinais são modificados e processados em várias etapas até atingirem o cortex auditivo no lobo temporal onde se dá a integração sensorial auditiva (Osen 1970; Paula-Barbosa & Sousa-Pinto 1973; Sousa Pinto 1974; Paula-Barbosa *et al.* 1975; Pontes *et al.* 1975; Brugge & Geisler 1978). Em todos os níveis da via auditiva há determinados neurónios que respondem a notas compreendidas numa gama limitada de frequências e intensidades sonoras, o denominado ordenamento tonotópico, que permite que uma determinada região coclear possua uma representação específica no sistema nervoso central (Rose *et al.* 1960; Kiang 1980).

## 2. O OUVIDO MÉDIO

O ouvido médio, ou caixa do tímpano, consiste numa câmara gasosa de contornos irregulares localizada no interior do osso temporal (Figura 1). As suas paredes ósseas, que actuam como uma blindagem, são revestidas por uma camada mucosa composta por um epitélio respiratório modificado, com células ciliadas e secretoras tipo *goblet*, assente numa camada subepitelial de tecido conjuntivo denominada mucoperiósseo (Sadé 1966; Tos & Pedersen 1976; Hentzer 1984; Albiin *et al.* 1986; Tos & Thomasen 2002).

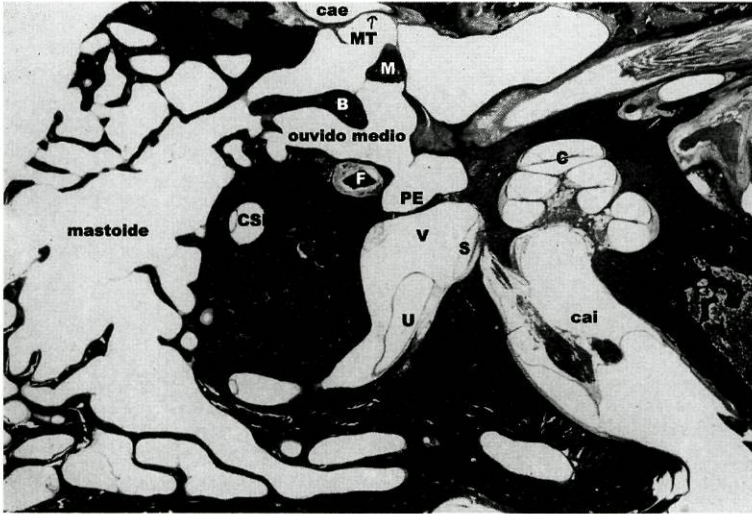


Fig. 1. Microfotografia óptica de secção horizontal de osso temporal humano normal no plano mediomodiolar (B – bigorna; C – cóclea; CAE – canal auditivo externo; CAI – canal auditivo interno; CSL – canal semicircular lateral; F – nervo facial; M – martelo; MT – membrana timpânica; PE – platina do estribo; S – sáculo; U – utrículo; V – vestíbulo. Ampliação original x20).

No interior desta cavidade, estão localizados os ossículos auditivos juntamente com os músculos e ligamentos suspensores correspondentes. As estruturas, de natureza vascular e nervosa que atravessam este compartimento dispõem-se ao longo das suas paredes.

As duas únicas aberturas do compartimento do ouvido médio correspondem às seguintes estruturas (Legent *et al.* 1986): anteriormente, no protímpano, o orifício da trompa auditiva que estabelece a comunicação com a nasofaringe e, posteriormente, na região do epitémpano ou ático, encontra-se o *aditus ad antrum* que constitui a passagem para o antro da mastóide, uma cavidade fechada cuja mucosa está em continuidade com o ouvido médio. Medialmente, no mesotímpano, encontram-se a janela oval selada pela platina do estribo e pelo resistente ligamento anular que fazem fronteira com o vestíbulo do ouvido interno, enquanto que, inferiormente a esta, a janela redonda e a respectiva membrana que encerra o ouvido médio da perilinfá que banha a espira basal da escala timpânica da cóclea (Figura 2). Salienta-se, por último, que a quase totalidade da parede lateral do ouvido médio é composta pela MT, verdadeira fronteira com o canal auditivo externo e, portanto, com o meio ambiente que rodeia o indivíduo.

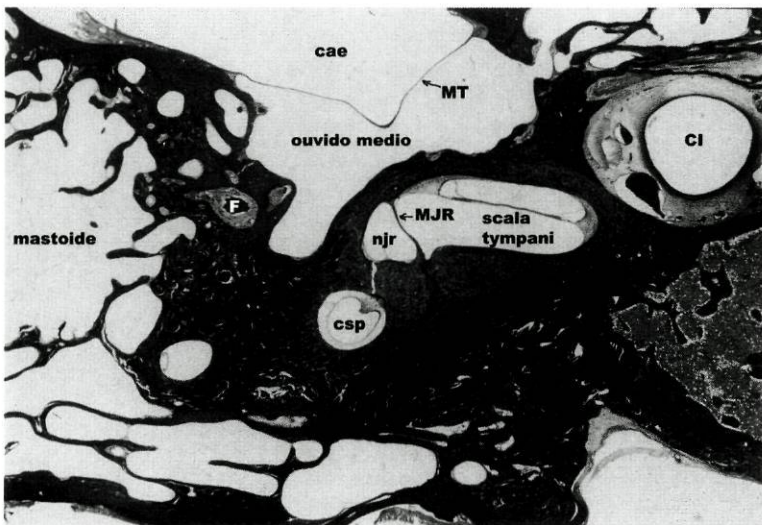


Fig. 2. Microfotografia óptica de secção horizontal de osso temporal humano normal no plano da rampa basal da cóclea (CAE – canal auditivo externo; CI – carótida interna; CSP – canal semicircular posterior; F – nervo facial; MJR – membrana da janela redonda; MT – membrana timpânica; NJR – nicho da janela redonda; Scala tympani – rampa timpânica coclear. Ampliação original x20).

Refira-se que a estrutura do ouvido médio em algumas espécies de roedores, como o Rato e o Chinchila, apresenta uma grande correspondência com a do Homem (Browning & Granich 1978; Hellström *et al.* 1982). Nestes animais, o ouvido médio e a mastóide encontram-se reunidos numa cavidade única, denominada *bulla temporalis*, que é facilmente acessível à abordagem externa. Estas características contribuem para transformar estas espécies em bons modelos experimentais da otite média.

Das estruturas anteriormente referidas, a MT e a membrana da janela redonda (MJR) merecem especial destaque no âmbito da presente dissertação.

## **2.1. Aspectos Morfofuncionais**

### **2.1.1. A membrana timpânica**

A MT, *membrana tympani* ou *tympano primario*, é uma estrutura anatómica peculiar que separa o fundo do canal auditivo externo do ouvido médio. Segundo Saunders & Paparella (1968), a sua descrição inicial remonta a Hipócrates, *circa* 400 a.C.. Devido à sua localização e estrutura delicada, como se disse a MT desempenha uma missão importante nos mecanismos da audição, através da recepção, ampliação e transmissão das ondas sonoras aos ossículos do ouvido médio (Pickles 1987) constituindo em simultâneo um fácil alvo das agressões externas, e.g. infecções ou traumatismos. A MT humana é habitualmente descrita como ligeiramente elíptica, com o diâmetro vertical ao longo do manúbrio do martelo entre 9-10.2 mm e o diâmetro horizontal, menor, entre 8.2-9mm (Politzer 1898; Lim 1970; Paço 2003), a que corresponde uma área que varia entre 50-73 mm<sup>2</sup> segundo diversos autores (Kirikae 1960; Ars 1977; Paço 2003). Outros autores discordam e atribuem maiores dimensões ao diâmetro horizontal (Kirikae 1960; Wajnberg 1987), o que

poderá resultar de métodos diferentes de medição ou de variantes antropológicas (Ars 1977). A espessura da MT humana, ao nível dos quadrantes inferiores, oscila entre 64-95  $\mu\text{m}$  (Schmidt & Hellström 1991). Segundo estudos de Ruah (1992) e Ruah e colaboradores (1991; 1992a), a espessura tem tendência a diminuir com a idade, enquanto que a posição da MT em relação ao pavimento do canal auditivo externo forma um ângulo mais agudo no recém-nascido que no adulto. No adulto, este ângulo é de aproximadamente  $55^\circ$  (Wright 1987).

A sua participação activa nos diversos processos patológicos que afectam o ouvido médio é reconhecida (Hellström *et al.* 1988; Gröte *et al.* 1989; Ruah *et al.* 1995; Eriksson *et al.* 2003). No indivíduo normal, fruto da sua reduzida espessura e semi-transparência, a MT age como uma janela virada para o ouvido médio, que permite ao observador experiente uma apreciação do seu conteúdo. Em contrapartida, em situações patológicas, tais como nas várias formas de otite média, as variações da sua cor, transparência, posição, integridade e mobilidade constituem auxiliares preciosos para o diagnóstico. A importância da determinação da impedância da MT por timpanometria, como auxiliar diagnóstico de patologia do ouvido médio como a otite média com efusão, é igualmente reconhecida (Jerger *et al.* 1974; Szucs *et al.* 1995).

A MT compõe-se de duas partes: a *pars tensa* ou porção tensa e a *pars flaccida* ou porção flácida, que diferem do ponto de vista histológico e funcional. A descrição da sua estrutura, composta por três camadas fundamentais – a externa de epitélio queratinizante virada para o canal auditivo externo, a *lamina propria* ou camada média de tecido conjuntivo e, a interna de epitélio mucoso não queratinizante – está bem documentada, desde há várias décadas, em estudos de microscopia de luz (Fumagalli 1942; Filogamo 1949; Secondi 1951; Kirikae 1960; Alm *et al.* 1983a; Chole & Kodama 1989; Gröte *et al.* 1989; Schmidt & Hellström 1991), e de microscopia electrónica (Johnson *et al.* 1968; Lim 1968a, 1968b, 1970, 1995; Hentzer 1969; Shimada & Lim 1971; Kawabata & Ishii 1971; Igarashi & Kawabata 1993).



A *pars tensa* constitui a maior porção da superfície da MT e desempenha as funções acústicas. A sua forma é ligeiramente cônica com o vértice, o *umbo* ou umbigo, dirigido medialmente para o ouvido médio. O cabo do martelo insere-se no seu lado medial, desde o *umbo* até ao bordo superior, na transição com a *pars flaccida*. À periferia, em todo o seu redor, a *pars tensa* insere-se firmemente no osso timpânico através de um reforço de fibras conjuntivas designado por *annulus tympanicus* ou anel timpânico fibrocartilaginoso (Ars 1977; Paço 2003). No Rato, a espessura da *pars tensa* oscila entre 5-10  $\mu\text{m}$  (Schmidt & Hellström 1991) e a área é de aproximadamente 5.5  $\text{mm}^2$ , o que representa cerca de 10% da humana. Não obstante as diferenças de dimensões, a estrutura da MT é na generalidade idêntica nas duas espécies (Chole & Kodama 1989; Schmidt & Hellström 1991) (Figura 3).

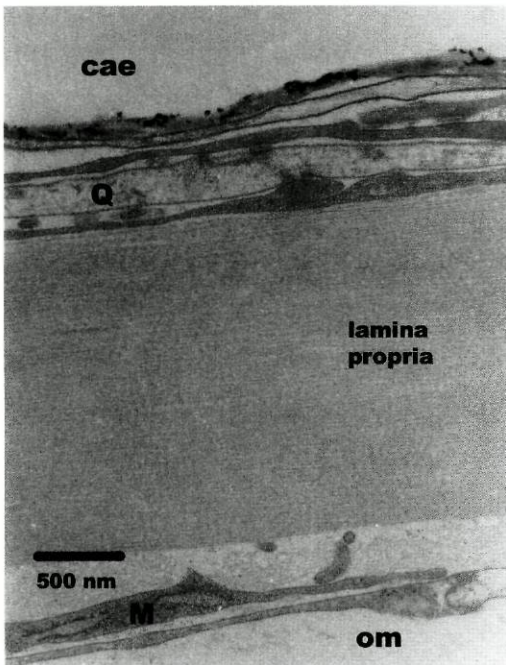


Fig. 3. *Pars tensa* da membrana timpânica do Rato observada em microscopia electrónica de transmissão. Note-se o aspecto denso do tecido conjuntivo da *lamina propria* (CAE – canal auditivo externo; M – mucosa; OM – ouvido médio; Q – queratinócito. Barra = 500 nanómetros).

Histologicamente, a camada externa da *pars tensa* é composta por um epitélio queratinizante estratificado com três a cinco camadas no Homem (Lim 1995), e duas a três no Rato (Schmidt & Hellström 1991). Os estratos mais superficiais desta camada, sofrem uma migração centrífuga a partir do *umbo* (Burnett 1877; Blake 1882; Stinson 1936; Boedts 1978; Kakoi *et al.* 1996), à razão de 0.05-0.07 mm por dia (Litton 1963; Alberti 1964). Segundo Kakoi e colaboradores (1996), o padrão de migração é idêntico no Homem e no Rato. Alguns estudos com marcadores celulares defendem a existência de centros germinativos epiteliais com alto índice mitótico, ao nível do *umbo* e também do *annulus* timpânico, os quais estariam implicados no fenómeno migratório (Litton 1963, 1968; Clawson & Litton 1971; Boedts & Kuipers 1978; Koba 1995; Kakoi *et al.* 1997a,b). Aparentemente, estes mesmos centros assumem uma elevada importância nos fenómenos regenerativos da MT após agressão, como na reparação de perfurações. Contudo, os eventos que regulam o ciclo e a migração celular ainda não se encontram totalmente elucidados. Sabe-se, todavia, que as células epiteliais expressam receptores para diversos factores de crescimento (Ma *et al.* 2002). Assim o atestam diversos estudos da cicatrização de perfurações timpânicas após aplicação tópica de: *epidermal growth factor* (EGF) (Amoils *et al.* 1992), *keratinocyte growth factor* (KGF) e *transforming growth factor-alpha* (TGF-alpha) (Ishimoto *et al.* 2002), *basic fibroblastic growth factor* (bFGF) (Mondain & Ryan 1994), e *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Yeo *et al.* 2000).

A camada média conjuntiva da *pars tensa*, denominada *lamina propria*, consiste predominantemente em fibras de colagénio dispostas tipicamente em dois estratos principais, um externo radial e um interno circular. O estrato de fibras radiais insere-se ao longo do cabo do martelo e abre-se em leque até à sua inserção periférica no sulco ósseo do aro timpânico (*sulcus tympanicus*), através do *annulus* (Ars 1977; Paço 2003). O estrato de fibras circulares é mais exuberante na periferia da

*pars tensa*, onde existem algumas interligações por fibrilhas com os feixes das fibras radiais e também com outros tipos de fibras mais escassas denominadas parabólicas e transversas (Shimada & Lim 1971; Kawabata & Ishii 1971; Schmidt & Hellström 1991; Paço 2003). Adjacente às camadas epiteliais o tecido conjuntivo é menos denso. Na região submucosa da *lamina propria* existem abundantes fibroblastos, uma rede de fibras nervosas predominantemente amielínicas, e vasos sanguíneos. Estes últimos são mais exuberantes nas zonas próximas do cabo do martelo e do *annulus* (Schmidt & Hellström 1991). No Rato, a escassez de vasos na região intermédia da *pars tensa* normal, localizada entre o martelo e a periferia da MT, permite especular que a nutrição dessa zona se processe de modo indirecto, provavelmente através de mecanismos de difusão (Albiin *et al.* 1985; Hellström *et al.* 2003).

Por último, a camada interna mucosa, em continuidade com o restante revestimento do ouvido médio, compõe-se por um epitélio simples de células não-queratinizantes, com numerosas microvilosidades.

A *pars flaccida*, a porção mais pequena da MT, foi inicialmente descrita macroscopicamente por Schrapnell (1832), que relatou detalhadamente a elevada elasticidade desta estrutura anatómica. No Homem, tem uma área de 7.9 mm<sup>2</sup>, cerca de 1/9 da *pars tensa* (Widemar *et al.* 1986). A sua espessura varia entre 30-230 µm (Lim 1968b). No Rato, a área de 1.1 mm<sup>2</sup> corresponde a 1/5 da *pars tensa*, e a espessura varia entre 30-70 µm (Alm *et al.* 1983a; Magnuson *et al.* 1997). Nesta parte da TM também se distinguem três camadas: queratinizante, *lamina propria* e mucosa (Lim 1968b, 1970) (Figura 4.).

As principais dissemelhanças morfológicas da *pars flaccida* em relação à *pars tensa* residem na estrutura da *lamina propria* e na ausência de *annulus* ao nível da sua inserção na incisura óssea de Rivinus, no pólo superior do aro timpânico (Paço 2003).

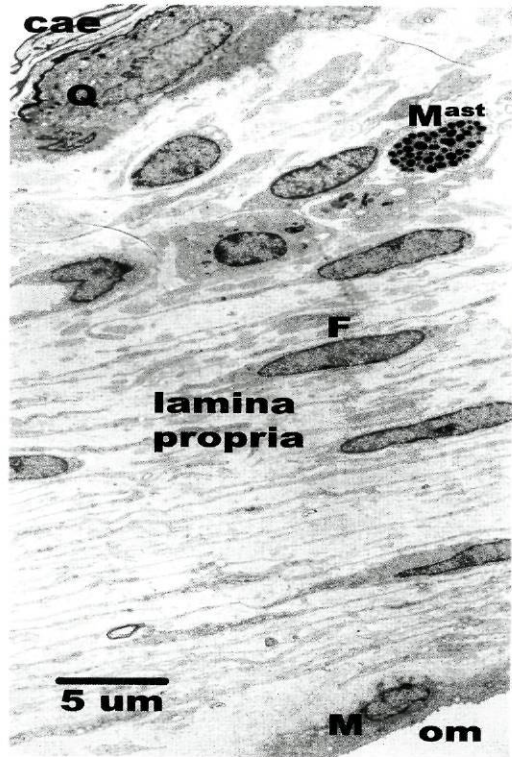


Fig. 4. *Pars flaccida* da membrana timpânica do Rato observada em microscopia electrónica de transmissão. Note-se o aspecto laxo do tecido conjuntivo da *lamina propria* (CAE – canal auditivo externo; F- fibroblasto; M – mucosa; Mast – mastócito; OM – ouvido médio; Q – queratinócito. Barra = 5 micrometros).

A natureza flácida desta parte da MT é favorecida pelas características laxas da camada média conjuntiva, composta por fibroblastos envoltos por uma matriz intercelular rica em ácido hialurónico e outros proteoglicanos (Laurent *et al.* 1989), e por pequenos feixes de colagénio e fibras elásticas dispostos de uma forma não sistematizada (Lim 1970; 1995). Disperso no estroma conjuntivo, predominantemente no espaço sob o epitélio queratinizante, existe um intrincado plexo capilar vascular e de feixes nervosos, maioritariamente mielínicos, que revelam imunorreactividade para diversos peptídeos como: neuroquinina-A, substância-P, *calcitonin gene related peptide* (CGRP), *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP), encefalina, tirosina hidroxilase e neuropeptídeo-Y (Uddman *et al.* 1988; Goldie *et al.* 1989).

Na proximidade das estruturas vasculo-nervosas, são observáveis numerosos mastócitos (Alm *et al.* 1983a; Widemar 1985), que contrastam com a escassez destas células na *pars tensa*. Estudos precedentes têm revelado que os mastócitos, após estimulação, podem desgranular-se, libertando uma elevada variedade de substâncias extraordinariamente activas que incluem histamina, serotonina, proteoglicanos, proteases, hidrolases, leucotrienos, prostaglandinas, *platelet activating factor* (PAF), e alguns tipos de cito- e quemoquinas (Ruah *et al.* 1995; Metcalfe *et al.* 1997; Malaviya & Abraham 1998). Considerando a localização estratégica dos mastócitos adjacente às estruturas vasculo-nervosas da *pars flaccida* e do ambiente exterior, é possível especular que sirvam de sentinelas prontas a despoletar a resposta inflamatória contra a agressão. Neste contexto, a *pars flaccida* tem conhecido um interesse crescente como uma área que se envolve precocemente nos fenómenos inflamatórios do ouvido médio (Alm *et al.* 1983b; Magnuson *et al.* 1994; Eriksson & Hellström 2003; Eriksson *et al.* 2003).

Pelo exposto anteriormente, e ressaltando alguns limites óbvios, as semelhanças anatómicas, histológicas e fisiológicas entre a MT do Homem e a do Rato, permitem extrapolar muitos dos achados experimentais para a prática clínica.

### 2.1.2. A membrana da janela redonda

A MJR constitui a única estrutura membranosa que, no indivíduo normal, separa o ouvido médio do ouvido interno. Localizada anatomicamente no extremo basal da rampa timpânica da cóclea, esta fina membrana representa potencialmente a porta de entrada mais acessível à passagem de substâncias tóxicas da cavidade do ouvido médio para o labirinto (Goycoolea *et al.* 1980a).

O primeiro cientista a descrever detalhadamente a membrana da janela redonda humana foi Scarpa (1772), que a denominou de *tympano secundario*. Muitas das observações deste autor são ainda válidas à luz

dos conhecimentos actuais da estrutura e função da MJR (Nomura 1984). O diâmetro médio da MJR humana é de 1.65 mm e a área média calculada de aproximadamente 2 mm<sup>2</sup> (Su *et al.* 1982), para uma espessura que varia entre 40-70 µm no indivíduo normal (Dean & Wolff 1934; Goycoolea *et al.* 1988), sem variações significativas com a idade (Sahni *et al.* 1987). Contrariamente a algumas espécies, como o Chinchila (Schachern *et al.* 1982) e o Gato (Miriszlai & Benedeczy 1978), em que a MJR é muito superficial e verticalizada, a MJR humana dispõe-se horizontalmente e insere-se na profundidade do nicho da janela redonda, situado na zona posterior e inferior da parede medial da caixa do tímpano (Stewart & Belal 1981). Num estudo anatómico em ossos temporais humanos, a MJR apresentava-se recoberta parcial ou totalmente por pregas mucosas em 55% dos espécimes (Stewart & Belal 1981). É possível que estas diferenças anatómicas possam implicar alguma variabilidade entre espécies na exposição da MJR às agressões provenientes do ouvido médio.

Os estudos ultraestruturais sobre a MJR foram efectuados em diferentes animais como o Chinchila (Iurato & Recchia 1968), Gato (Kawabata & Paparella 1971; Goycoolea *et al.* 1987), Rato (Hellström *et al.* 1988b) e também no Homem (Frank 1977; Miriszlai *et al.* 1983; Schachern *et al.* 1984). Basicamente, esta membrana compõe-se de três camadas (Figura 5).

O epitélio externo ou lateral, orientado para o ouvido médio, é composto por uma ou duas fiadas de células epiteliais em continuidade com o revestimento da mucosa do ouvido médio. Junto à superfície existem “tight-junctions”, enquanto uma membrana basal bem definida separa esta camada do tecido conjuntivo subjacente. No seu conjunto, a camada epitelial externa é considerada como a região determinante do grau de permeabilidade da MJR (Goycoolea *et al.* 1988). A camada média conjuntiva contém fibroblastos, colagénio e fibras elásticas, vasos sanguíneos e linfáticos. A camada epitelial interna ou medial voltada para o espaço perilinfático é composta por células mesoteliais ligeiramente

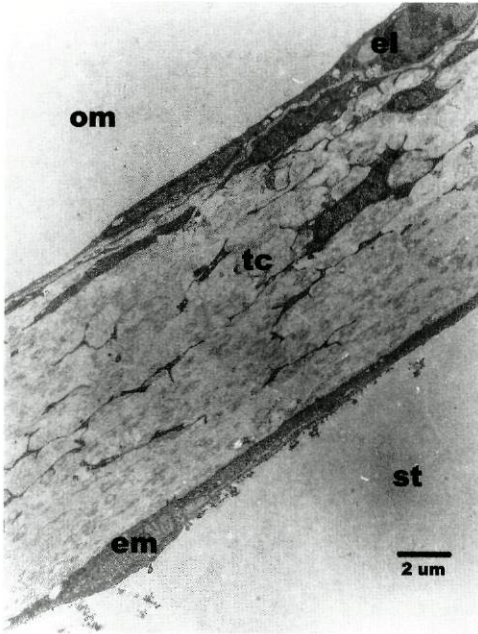


Fig. 5. Membrana da janela redonda do Rato observada em microscopia eletrônica de transmissão (EL - epitélio lateral; EM - epitélio medial; OM - ouvido médio; ST - *scala tympani* ou rampa timpânica coclear; TC - tecido conjuntivo; Barra = 2 micrometros).

sobrepostas e unidas por “gap-junctions”. Não existe membrana basal a separar as camadas média e interna.

O desempenho da MJR nos mecanismos fisiológicos da audição, participando no diferencial de fase que permite a oscilação dos fluidos labirínticos sob a influência do estribo, vulgarmente denominado por “jogo das janelas”, é aceite na generalidade (Pohlman 1938; von Békésy 1980). Constitui igualmente uma via alternativa para a energia sonora entrar na cóclea.

Em contrapartida, os aspectos relativos à sua permeabilidade e ao papel que desempenha na patogénese de possíveis interações entre o ouvido médio e o ouvido interno, têm atraído o interesse da comunidade científica há várias décadas. Nesse âmbito, a permeabilidade da MJR tem sido demonstrada experimentalmente para diversas substâncias. Assim, moléculas de baixo peso tais como, a exotoxina estafilocócica, os iões de

sódio<sup>22</sup> e iodo<sup>131</sup>, e outros que não ultrapassam as dimensões da peroxidase do rábano (45.000 Daltons) atravessam facilmente a MJR intacta (Stecker & Cody 1966; Brady *et al.* 1976; Goycoolea *et al.* 1980b; Nomura 1984), enquanto que a albumina (67.000 Daltons) já não a atravessa em condições normais (Brady *et al.* 1976). Todavia, na presença de inflamação, a dinâmica da permeabilidade parece estar alterada, sendo possível detectar-se albumina e outras substâncias de elevado peso molecular como a ferritina (400.000 Daltons) na perilinfa após a sua aplicação no ouvido médio (Goldberg *et al.* 1981; Nomura 1984; Goycoolea *et al.* 1987). Outros trabalhos, demonstraram que após a perfusão do nicho da janela redonda com antibióticos (Proud *et al.* 1968; Wersäll *et al.* 1969; Smith & Myers, 1979; Chen *et al.* 1999), antisépticos (Morizono & Sikora 1982), anestésicos (Rahm *et al.* 1959; Anniko *et al.* 1988), e algumas toxinas (Goycoolea *et al.* 1980c; Kawauchi *et al.* 1988; Lundman *et al.* 1992), era possível recolher estes produtos na perilinfa e detectar lesões secundárias nas células ciliadas cocleares.

Ao mesmo tempo que se levantavam questões importantes sobre a potencial ototoxicidade da aplicação de gotas otológicas ou antisépticos tópicos em ouvidos com perfuração timpânica, foi-se reforçando o conceito de que a passagem de produtos tóxicos decorrentes da otite média pode provocar hipoacusia neurosensorial (Paparella *et al.* 1970a, 1972, 1980; English *et al.* 1973; Morizono *et al.* 1985), e eventualmente hidropisia endolinfática (Kimura 1968; Paparella *et al.* 1979; Meyerhoff *et al.* 1980; Kawauchi *et al.* 1988).

O substrato histopatológico desta interacção entre o ouvido médio e o ouvido interno, nas fases iniciais da passagem de toxinas através da MJR, residiria na forma de labirintite serosa ou tóxica, que resulta numa irritação do labirinto provocada pela degradação dos fluidos do ouvido interno (Paparella *et al.* 1981; Schucknecht 1993). Segundo Schucknecht (1993), a labirintite serosa caracteriza-se histopatologicamente por um precipitado fibrilar ou granular da perilinfa indicativo de alto teor



proteico, e pela presença de hidropisia endolinfática. Distingue-se da forma mais grave, denominada labirintite purulenta, por não existir permeação celular ou bacteriana para o compartimento labiríntico e como tal haver possibilidade de recuperação funcional auditiva (Paparella & Sugiura 1967). Os diferentes tipos de labirintite podem ocorrer na sequência de otite média aguda ou crônica e também após meningite.

De acordo com Paparella e colaboradores (1972) nas situações de labirintite serosa localizada à perilinfa da rampa basal da cóclea, o resultado funcional auditivo traduz-se em variações temporárias dos limiars auditivos, nas frequências altas. A disfunção das células ciliadas da rampa basal pode ocorrer de forma silenciosa numa fase inicial e apenas mais tarde ser reconhecível na audiometria (Paparella 1981). Contudo, estas oscilações temporárias dos limiars auditivos podem, em situações mais graves de labirintite serosa, evoluir para formas de hipoacusia neurossensorial definitiva (Paparella *et al.* 1988).

A partir do reconhecimento da permeabilidade da MJR aos aminoglicosídeos e da sua consequente ototoxicidade (Wersäll *et al.* 1969; Smith & Meyers, 1979), passou-se a questionar o uso indiscriminado deste tipo de antibióticos na forma de gotas em situações de otite média e perfuração timpânica. Em contrapartida, aproveitou-se esta mesma ototoxicidade para abrir novos horizontes no tratamento das crises vertiginosas incapacitantes da doença de Ménière, através da sua administração no ouvido médio e consequente efeito vestibulotóxico terapêutico (Schucknecht 1957; Lange 1976; Beck & Schmidt 1978; Ödkvist 1988; Silverstein 1999). Aliás, mais recentemente e com resultados variáveis, têm sido testados diferentes modelos de terapêutica do ouvido interno via perfusão da janela redonda com diversas substâncias que incluem corticosteróides (Lefebvre & Staecker 2002), antioxidantes (Korver *et al.* 2002) e imunossupressores (Yang *et al.* 2000). Do mesmo modo, a distribuição através da MJR intacta de diferentes tipos de factores de

crescimento (Lefebvre *et al.* 2002; Witte & Kasperbauer 2000) e de genes cocleares (Jero *et al.* 2001; Lalwani *et al.* 2002), é actualmente considerada como muito prometedora para uma futura resolução de lesões cocleares até hoje consideradas irreversíveis.

Resumidamente, a passagem de substâncias através da MJR é um fenómeno susceptível de ser afectado por vários factores como a integridade da própria membrana, a presença e duração de inflamação, o peso molecular e concentração das substâncias no ouvido médio (Juhn 1988). A juntar a estes factores, quando as substâncias tóxicas cruzam a MJR e penetram no ouvido interno, é necessário que o façam em concentrações suficientes para causar reacções imuno e bioquímicas que originem disfunção das células neurosensoriais cocleovestibulares. A complexidade destes mecanismos explicará, pelo menos parcialmente, porque nem todos os doentes com otite média manifestam hipoacusia neurosensorial ou outro tipo de alterações do ouvido interno.

Sublinhe-se, contudo, que a passagem de substâncias tóxicas do ouvido médio infectado para o ouvido interno não deve ser entendida como uma função normal da MJR. Poder-se-á dizer, de modo especulativo, estar-se perante uma disfunção morfofuncional inerente à membrana, como resultado das suas características estruturais, da sua localização e da elevada prevalência da patologia do ouvido médio (Goycoolea 2001).

## **2.2. Otite Média Aguda**

### **2.2.1. Definição e prevalência**

A OMA, anteriormente denominada por otite média purulenta ou supurativa, consiste numa inflamação do ouvido médio de etiologia infecciosa, com um exsudato purulento, caracterizada pela instalação rápida de otalgia, e por vezes febre, mal-estar geral ou otorreia (Bluestone *et al.* 2002a). Uma descarga purulenta aguda através de um tubo de

ventilação trans-timpânica também se inclui na definição de OMA (Rosenfeld & Bluestone 2003). Habitualmente a infecção tem uma duração auto-limitada, com uma resolução em cerca de 8-10 dias.

As alterações histopatológicas da OMA caracterizam-se por um espessamento da camada mucosa provocado por edema, vasodilatação e infiltração por células características de situações de inflamação aguda (Michaels 1987). Se, ao contrário do curso habitual da OMA, a infecção aguda se prolonga por vários dias, a mucosa pode evoluir para um aspecto ulcerado ou polipoide, em simultâneo com o desenvolvimento subjacente de fenómenos de remodelação óssea que incluem osteólise e osteoneogénese (Schucknecht 1993; Cayé-Thomasen *et al.* 1999, 2002).

A OMA é a segunda doença infecciosa mais comum na criança, logo a seguir à vulgar constipação de origem vírica (Jung & Hanson 1999), pelo que representa uma das causas mais frequentes de consulta médica nesta faixa etária (Schappert 1992). A maioria das crianças padece de pelo menos um episódio de OMA na sua infância e, segundo informação actualizada (Jokki-Erkkila *et al.* 1998), a incidência desta infecção nas sociedades industrializadas tem vindo a crescer nas décadas mais recentes. A sua incidência é considerada máxima dos seis aos 12 meses de idade (Sipilä *et al.* 1987; Alho *et al.* 1993). Em vários estudos, a incidência cumulativa para o primeiro episódio de OMA foi respectivamente de 19-62% no primeiro ano de vida e de 50-84% até aos três anos de idade (Klein 1981; Pukander *et al.* 1982, 1984; Ingvarsson *et al.* 1985, 1990; Teele *et al.* 1989; Alho *et al.* 1991). No estudo denominado *Greater Boston Otitis Media Study*, em que Teele e colaboradores (1989) seguiram prospectivamente 498 crianças desde o seu nascimento até aos sete anos de idade, 93% dos indivíduos apresentaram pelo menos um episódio de OMA, enquanto 74% tiveram três ou mais episódios.

Algumas crianças são particularmente propensas a otites, “otitis-prone” para os anglo-saxónicos, com episódios recorrentes de OMA. Uma definição válida de OMA recorrente consiste num registo de três ou mais episódios separados e bem documentados de OMA nos seis meses precedentes ou num total de quatro ou mais episódios ao longo de um ano (Dowell *et al.* 1998). A classificação de criança propensa a otites não é unânime, embora grande número de autores a inclua na descrição precedente (Klein 1984; Kalm *et al.* 1986; Harsten *et al.* 1989; Paradise 1992; Casselbrandt *et al.* 1992). Cerca de 15% das crianças até aos dois anos de idade sofrem de OMA recorrente (Alho 1997).

Embora a maioria das crianças com OMA recuperem sem sequelas clínicas significativas em poucos dias ou semanas, 5-25% dos casos evoluem para otite média com efusão persistente, também denominada otite média secretora (Shurin *et al.* 1979; Schwartz *et al.* 1984; Iino *et al.* 1993; Alho *et al.* 1995), caracterizada pela acumulação de fluido não-purulento de consistência e viscoelasticidade variáveis, durante meses ou anos. Clinicamente a otite média com efusão consiste numa inflamação com fluido no ouvido médio, sem perfuração da MT e que evolui sem os sintomas ou sinais agudos típicos da OMA (Rosenfeld & Bluestone 2003). Em concordância com estes dados, tem sido sustentado que a OMA representa a vertente supurativa aguda de uma entidade mais vasta denominada otite média, na qual os fenómenos inflamatórios associados à presença de efusão serosa, mucóide ou purulenta se podem sobrepor ou evoluir entre si (Paparella & Schachern 1994). Esta dinâmica contínua da otite média pode evoluir para a resolução e cura, para otite média crónica manifesta ou silenciosa, ou ainda para situações de complicações e sequelas.

Para além da sua elevada morbidade (Karma *et al.* 1989; Stool & Field 1989), o impacto sócio-económico da OMA é muito elevado (Schappert 1992; Zimmerman *et al.* 1998). Os custos totais estimados por cada caso diagnosticado nos E.U.A. variam entre \$233 – \$1330 dólares

americanos (Alsarraf *et al.* 1999). No total, estes valores representam um custo anual que pode atingir os 18 biliões de dólares americanos, somente nos E.U.A. (Alsarraf & Gates 1999). Por aqui se pode extrapolar que as dimensões deste problema ao nível da saúde pública são, portanto, enormes e preocupantes em todo o mundo.

### 2.2.2. Etiologia

#### *i) Agentes infecciosos*

Os mecanismos patogénicos da OMA resultam duma interacção entre factores do hospedeiro, a virulência do agente infectante e condicionantes ambientais. O agente infectante, antes de invadir o ouvido médio, necessita por norma de colonizar o epitélio da nasofaringe e subsequentemente invadir a mucosa da trompa auditiva (Murphy *et al.* 1987).

Com frequência, as infecções do tracto respiratório superior de origem vírica precedem os episódios de OMA (Henderson *et al.* 1982; Sarkkinen *et al.* 1985; Pitkäranta *et al.* 1998; Heikinen 2000), constituindo uma das possíveis razões para a maior incidência da OMA nos meses de Inverno. Estudos virológicos de fluídos do ouvido médio recolhidos no decurso da OMA, têm permitido detectar diversos agentes víricos como o vírus sincial respiratório, rinovírus, adenovírus e coronavírus (Chonmaitree *et al.* 1986, 2000; Arola *et al.* 1988; Pitkäranta *et al.* 1998; Monobe *et al.* 2003). Os mecanismos da acção vírica facilitadores da OMA resultam aparentemente da agressão das células epiteliais tubares e do ouvido médio com facilitação da adesividade bacteriana, lesão ciliar e interferência com o próprio sistema de defesa imunitário. Sabe-se ainda que, em modelos animais, a presença de vírus respiratórios desempenha uma acção sinérgica com as bactérias patogénicas no desenvolvimento da OMA (Tong *et al.* 2000).

As três bactérias mais frequentemente isoladas, responsáveis por 80% dos casos de OMA, são por ordem decrescente o *Streptococcus pneumoniae* (35-60%), o *Haemophilus influenzae* (15-40%), e a *Moraxella catarrhalis* (5-23%), enquanto que, tanto o *Streptococcus pyogenes* (estreptococo beta-hemolítico grupo A) como o *Staphylococcus aureus* têm sido considerados nas últimas décadas muito raros na OMA da criança (Luotonen *et al.* 1981; Lundgren & Ingvarsson 1986; Del Beccaro *et al.* 1992; Bluestone & Klein 1996; Gehanno *et al.* 2001). Segundo um estudo multinacional efectuado por Hausdorff e co-autores (2002) os serotipos pneumococócicos mais frequentemente envolvidos na OMA pediátrica incluíam os 19F e 23F, respectivamente com 13% e 25% cada; serotipos 14 e 6B com 6% a 18%; e, serotipos 6A, 19A, e 9V compreendendo 5% a 10%. Merecem uma nota à parte os recém-nascidos e os lactentes internados em unidade de cuidados intensivos, onde a prevalência bacteriana da OMA tem características específicas. Com efeito, nestes casos, existe um maior risco de infecção por bacilos entéricos Gram negativos, pelo *S. aureus* e pelos estreptococos do grupo B (Karma *et al.* 1987a; Bluestone & Klein 1996; Turner *et al.* 2002).

Nas últimas décadas, a emergência crescente de bactérias resistentes aos antimicrobianos na OMA, tem constituído uma fonte de preocupações a nível mundial (Baquero *et al.* 1997; Manninen *et al.* 1997; Jacobs *et al.* 1998). A difusão intercontinental de estirpes bacterianas resistentes tem sido documentada (Muñoz *et al.* 1991) pelo que o problema deve ser encarado numa escala global (Appelbaum 1994). Contudo, sabe-se hoje que a prevalência dos diferentes agentes infectantes e as respectivas sensibilidades aos antimicrobianos dependem de vários factores, entre os quais a diversidade geográfica da população desempenha um papel relevante (Baquero *et al.* 1997; Le Bideau *et al.* 1997; Jacobs *et al.* 1998; Klein 1999; Sahm *et al.* 2000). Neste contexto, em crianças com idade inferior a três anos residentes na região francesa de Paris, as incidências

de *H. influenzae* produtores de beta-lactamase na OMA aumentaram de 20% para 70% e as do *S. pneumoniae* resistentes à penicilina subiram de 7% para 70%, respectivamente entre 1987 e 1997 (Gehanno *et al.* 2001). Nos E.U.A., num estudo multicêntrico englobando 1,531 colheitas positivas para *S. pneumoniae*, Doern e colaboradores (2001) registaram que as taxas de multi-resistência deste agente subiram 13.3% entre 1995 e 2000, sendo os maiores índices de resistência provenientes dos aspirados do ouvido médio e dos seios perinasais, de crianças entre os 0-5 anos de idade e nas amostras provenientes da região sudoeste do país. Mais de 80% dos casos de OMA por *S. pneumoniae* penicilino-resistentes devem-se a quatro serotipos: 23F, 19F, 14 e 6B (Hausdorff *et al.* 2002). Sahm *et al.* (2000) também encontraram uma taxa superior de patógenos resistentes em isolados provenientes de doentes pertencentes a estratos etários mais baixos. Também recentemente (Yagupsky *et al.* 1998; Felmingham *et al.* 2000) se verificou existirem regiões onde ocorre uma relação próxima entre a elevada prevalência de *H. influenzae* produtores de beta-lactamase e a taxa elevada de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina, o que sugere a possibilidade de um “síndrome de resistência” regional. Uma das razões apontadas para as diferenças geográficas nas susceptibilidades bacterianas aos antibióticos parece assentar no tipo de prática clínica seguida no tratamento da OMA. A título de exemplo diga-se que nos países onde o uso de antibióticos é mais liberal e ministrados por vezes com finalidade duvidosa, as taxas de resistência bacteriana são maiores (Seppälä *et al.* 1997; Orden *et al.* 1998; Felmingham *et al.* 2002).

O diagnóstico microbiológico da OMA é classicamente baseado na cultura bacteriana do fluido aspirado do ouvido médio. Nos últimos anos, a utilização de métodos de biologia molecular, como a ampliação de genes através da *Polymerase Chain Reaction* (PCR), tem conhecido um grande desenvolvimento no diagnóstico etiológico da infecção em geral (Ibrahim *et al.* 1996; Tarkin *et al.* 2003; Numazaki *et al.* 2003). No âmbito

da otite média, a sua aplicação tem sido descrita essencialmente em casos de otite média com efusão (Post *et al.* 1995; Jero *et al.* 1996; Hendolin *et al.* 1997; Gok *et al.* 2001) e só mais raramente na OMA (Virolainen *et al.* 1994; Saukkoriipi *et al.* 2002). Através deste método, torna-se possível detectar sequências específicas do genoma bacteriano em amostras diminutas de fluido aspirado do ouvido médio.

Em Portugal, há uma elevada carência de estudos sobre a microbiologia da OMA. Numa pesquisa bibliográfica sobre o assunto, apenas foi encontrado um artigo que descreve a microbiologia da OMA refractária numa amostra de crianças da região de Lisboa (Monteiro *et al.* 1999). Das particularidades mais relevantes deste estudo são de realçar a reduzida taxa de culturas positivas para *M. catarrhalis* e as taxas significativas de resistências bacterianas encontradas.

Do exposto pode concluir-se que o panorama bacteriológico da OMA está em permanente mutação, pelo que é prioritário o conhecimento permanentemente actualizado sobre as incidências das diferentes estirpes bacterianas e respectivas resistências ajustadas à realidade geográfica local, no sentido de melhor enquadrar o tratamento da OMA. Como tal, será previsível que a realização de miringotomias e de estudos microbiológicos venham a aumentar futuramente.

## ii) *Factores de risco*

Os factores de risco associados à ocorrência, recorrência e persistência da OMA podem-se dividir em intrínsecos e extrínsecos. Para revisão consultar Casselbrandt & Mandel (1999).

Os factores de risco intrínsecos, dependentes do próprio hospedeiro, incluem: (a) a idade inferior a dois anos, (b) o sexo masculino, (c) a raça caucasiana, (d) a alergia, (e) as imunodeficiências, (f) as malformações craniofaciais, e (g) a predisposição genética. É ainda um assunto contro-



verso o papel desempenhado pela raça (Teele *et al.* 1980; Casselbrant *et al.* 1995), prematuridade (van Cauwenberge 1984; Alho *et al.* 1990) e antecedentes de alergia (Kraemer *et al.* 1983; Pukander *et al.* 1984, 1985; Alho *et al.* 1990; Juntti *et al.* 1999; Doyle 2002) como factores predisponentes da OMA.

Quanto aos factores extrínsecos ou ambientais, incluem-se: (a) as infecções do tracto respiratório superior, (b) a sazonalidade (Outono-Inverno), (c) a frequência de infantário, (d) um agregado familiar grande, (e) a exposição ao fumo de tabaco, (f) o aleitamento exclusivo com leite artificial e em particular se ministrado na posição de decúbito, (g) o uso de chupeta, e (h) as condições de alojamento e socio-económicas deficientes.

Refira-se que num estudo recente de Silveira e colaboradores (2003), os factores de risco mais importantes para a ocorrência de OMA em crianças com idade inferior a 18 meses, na região do Porto, incluíam: história de OMA nos primeiros seis meses de vida, exposição ao fumo de tabaco, ausência de aleitamento materno, proveniência de um estrato sócio-económico mais desfavorecido e história familiar de alergias.

A maioria dos factores de risco citados são causa, directa ou indirecta, de disfunção da trompa auditiva que como se sabe está intimamente envolvida na génese da otite média (Bluestone 1999).

### 2.2.3. Diagnóstico

Para além dos aspectos sintomáticos já mencionados que caracterizam a OMA como a otalgia e por vezes febre, mal-estar geral ou otorreia, as manifestações clínicas no lactente podem evidenciar-se através de irritabilidade, alterações do sono, pelo gesto de agarrar o ouvido afectado e em alguns casos por diarreia ou vômitos (Bluestone *et al.* 2002a). A criança mais crescida pode mencionar pressão no ouvido e diminuição da acuidade auditiva.

O diagnóstico da OMA é essencialmente realizado de acordo com os achados da otoscopia. Nas fases iniciais da infecção, ao desenvolver-se edema e eritema da mucosa do ouvido médio, evidencia-se uma ruborização ou um tom amarelo opaco da MT. Note-se que, para alguns autores o rubor timpânico é actualmente considerado um sinal pouco consistente de OMA (Karma *et al.* 1993; Bluestone *et al.* 2002a), enquanto para outros a ruborização aumenta a probabilidade do diagnóstico de OMA estar correcto (Rothman *et al.* 2003). Com a evolução do processo infeccioso, dá-se a acumulação de exsudato purulento no ouvido médio, que se traduz por uma membrana timpânica opaca, tensa e abaulada. A mobilidade timpânica fica fortemente reduzida, como pode ser comprovado pela otoscopia pneumática ou através da timpanometria. Realce-se que o recurso a estes dois exames pode permitir a redução dos diagnósticos de OMA falso-positivos em mais de 30% dos casos (Blomgren & Pitkaranta 2003). Em alguns doentes o processo infeccioso pode conduzir à perfuração espontânea da MT com drenagem do conteúdo purulento. A punção da MT através de timpanocentese ou miringotomia revela uma efusão purulenta ou mucopurulenta em cerca de 80-90% dos casos de OMA.

Refira-se a propósito que, os estudos histopatológicos realizados em ossos temporais humanos por Ruah e colaboradores (1991) revelaram que a MT sofre naturalmente variações com a idade na sua espessura, celularidade, vascularização, conteúdo de colagénio e elastina. Esta particularidade evolutiva da estrutura da MT é mais evidente durante os primeiros três anos de vida, e tem uma correlação muito próxima com as características específicas, por vezes confusas, que a MT apresenta à otoscopia nessa faixa etária (Ruah *et al.* 1992a). Por isso o exame otoscópico exige uma aprendizagem apropriada, para se evitarem erros de diagnóstico, tanto por defeito como por excesso (Garbutt *et al.* 2003). Note-se que num estudo muito recente, em que se avaliou uma série de

especialistas oriundos de diversos países relativamente à acuidade diagnóstica da OMA e da otite média com efusão, concluiu-se que o diagnóstico de otite média com efusão era frequentemente confundido como OMA (Pichichero 2003).

#### **2.2.4. Tratamento**

A abordagem terapêutica da OMA tem sido largamente debatida por várias razões, onde avultam a utilização e tipo de antibiótico, a duração de tratamento e o recurso à miringotomia (van Buchem *et al.* 1981; Giebink 1992; Paradise 1995; Bluestone *et al.* 2002b; Hoberman *et al.* 2002). Segundo Garbutt e colegas (2003), o problema coloca-se logo ao nível mais básico do diagnóstico otoscópico, pois sendo este um exame com um carácter eminentemente subjectivo, limita o estabelecimento de um consenso definitivo em relação aos critérios clínicos para o diagnóstico desta infecção.

##### **i) Antimicrobianos**

Desde o advento dos antimicrobianos na década de 1940 que a sua utilização no tratamento da OMA se popularizou rapidamente. Estudos dessa época revelam que este tipo de medicação veio permitir uma redução drástica da incidência de complicações supuradas da OMA (House 1946; Davison 1955). Como reflexo desse sucesso, a OMA constitui actualmente o diagnóstico que mais frequentemente se associa à prescrição de antibióticos na criança nos E.U.A. (Gehanno *et al.* 1994; Dagan, 1998). A utilização da amoxicilina como antibiótico de primeira escolha no tratamento da OMA, ou do cotrimoxazol no caso do doente alérgico à penicilina, tem sido questionada recentemente em áreas geográficas onde a taxa de bactérias resistentes é elevada (Fairbanks 2003). Nestas situações tem sido sugerido como opção inicial um antimicrobiano resistente às beta-lactamases, de que são exemplos a

associação amoxicilina-ácido clavulânico ou as cefalosporinas como a cefuroxime axetil ou equivalentes (Jacobs *et al.* 1998). O recurso ao ceftriaxone intramuscular deverá ser reservado para situações graves ou quando se suspeitar de uma falta de cumprimento da medicação oral (Aronovitz 2000). Recentemente, Fairbanks (2003) advogou o uso das novas quinolonas, gati-, levo- e moxifloxacina em situações comprovadas de OMA com elevada resistência, mediante consentimento informado no caso de se tratar de uma criança.

A duração recomendada da medicação varia segundo múltiplos factores de acordo com as preferências locais, sendo prática clínica corrente um período de sete a dez dias (Jung & Hanson 1999). Contudo, dados recentes favorecem esquemas posológicos de tratamento cada vez mais curtos (Pichichero & Casey 2002).

A atitude de prescrever um tratamento antibiótico em casos “suspeitos” de OMA, apenas com sintomas ligeiros ou pouco específicos, e em algumas situações de otite média com efusão, resulta num receituário desnecessário (Del Mar *et al.* 1997; Froom *et al.* 1997, 2001; Dagan 1998). Um dos efeitos adversos deste tipo de medicação, para além dos custos, parece consistir, como se assinalou anteriormente, no risco de indução de estirpes bacterianas com resistência crescente (Leibovitz *et al.* 1998; Jacobs, 2000). O fenómeno subjacente consistirá num ciclo vicioso em que as falências de um determinado tratamento conduzem ao uso de antibióticos com espectro progressivamente mais amplo e estes, por sua vez, determinam novos tipos de resistências. Com fundamento neste pressuposto e em concordância com evidência consubstanciada por estudos clínicos “randomizados” e controlados, nos quais o efeito da antibioterapia na OMA apresentaria um efeito praticamente marginal em grande parte dos doentes (van Buchem 1987; Rosenfeld 1996; Damoiseaux *et al.* 2000), alguns países do Norte da Europa, por consenso, têm advogado o uso muito selectivo de antibióticos. São exemplos desta atitude terapêutica países como a Holanda e a Suécia, nos quais as

recomendações para o tratamento inicial da OMA não-complicada em crianças maiores que dois anos de idade consistem apenas em analgésicos e vigilância expectante (Appelman *et al.* 1990; Molstad *et al.* 2000). Esta atitude contrasta com a prática corrente em países como os E.U.A., onde virtualmente 100% dos médicos tratam todos os casos de OMA com antibióticos (Froom *et al.* 1997), o que em parte reflecte o elevado envolvimento jurídico que o acto médico implica nessa sociedade. Não obstante os resultados de várias meta-análises indicando que apenas uma em cada 7 a 17 das crianças com OMA retirariam vantagens do tratamento com antibióticos (Rosenfeld *et al.* 1994; Del Mar *et al.* 1997), em vários centros ainda prevalece o sentimento de que muitos dos estudos incluídos neste tipo de análise sofrem de falhas metodológicas, que limitariam a extracção de conclusões precisas (Claessen *et al.* 1992; Steele & Suskind-Liu 2000). Por outro lado, embora se reconheçam vantagens da utilização restritiva de antibióticos na OMA - como a redução de custos, menores efeitos secundários dos medicamentos e diminuição dos índices de resistências bacterianas - tal estratégia terapêutica parece estar associada a uma maior incidência de complicações da OMA, nomeadamente de mastoidites agudas como as descritas por van Zuijlen e co-autores (2001).

## ii) *Miringotomia*

A miringotomia, ou incisão da MT, foi possivelmente o primeiro tratamento eficaz da OMA. Segundo uma carta de von Haller (1760), terá sido Eli a efectuar em Paris, em 1760, o procedimento cirúrgico pioneiro que hoje se identifica como timpanocentese, ou miringotomia. Contudo, terá sido apenas após a sua descrição por Cooper, no início do século dezanove (Cooper 1802) que este procedimento foi divulgado em larga escala. Subsequentemente, e até à descoberta dos antimicrobianos cerca de 130 anos mais tarde, a OMA foi considerada uma doença eminentemente cirúrgica. Durante esse período, a miringotomia foi um procedi-

mento realizado com frequência por otorrinolaringologistas, pediatras e até por clínicos gerais experimentados, para aliviar a otalgia intensa da OMA através da drenagem do exsudato purulento sob pressão no ouvido médio (Himly 1808; Meyer 1893). No entanto, perante a elevada eficácia que os antibióticos demonstraram no tratamento da OMA, o recurso à miringotomia por rotina tornou-se mais discutível. Nesta matéria, trabalhos contemplando o impacto da miringotomia no tratamento da OMA, têm defendido posições antagónicas, com defensores das vantagens da miringotomia (Puhakka *et al.* 1979; Qvarnberg 1981; Karma *et al.* 1987b) e detractores da sua utilização sistemática (van Buchem *et al.* 1981; Engelhard *et al.* 1989; Kaleida *et al.* 1991).

Não obstante esta discussão, a miringotomia na OMA mantém indicações indiscutíveis na actualidade. Segundo Bluestone & Klein (1996), a sua realização deve ser considerada sempre que se torna necessário obter um aspirado do ouvido médio para cultura, devido a resposta insuficiente ao tratamento, em doentes suspeitos ou com complicações supuradas confirmadas, ou ainda para proporcionar um alívio imediato da otalgia em casos de empiema do ouvido médio e distensão da MT.

Recorde-se, por outro lado, que as indicações para miringotomia não se esgotam no tratamento de um episódio de OMA. Pelo contrário, a miringotomia com ou sem colocação de tubos de ventilação transtimpânicos é utilizada actualmente em larga escala, sendo um dos procedimentos cirúrgicos mais frequentes no estrato etário pediátrico, tanto no tratamento de situações de otite média com efusão persistente (Gates *et al.* 1987; Mandel *et al.* 1992) como na profilaxia da OMA recorrente (Gebhart, 1981; Casselbrant *et al.* 1992; Debryne & Degroote 1993). Como tal, a investigação sobre este tema é desejável. Aliás, com a emergência progressiva de bactérias com baixa susceptibilidade aos antimicrobianos na OMA, condicionando quadros clínicos mais complexos e uma conseqüente necessidade da tipificação microbiológica correc-

ta, é previsível que a necessidade de execução de miringotomias nos doentes com OMA venha a crescer em paralelo (Bitnum & Allen 1998; Negri *et al.* 1994; Aronovitz 2000).

É curioso que, face ao panorama actual de multi-resistências bacterianas na OMA, a inerente motivação para um uso restritivo de antibióticos e a consideração de alternativas terapêuticas, o tema da miringotomia na OMA não tenha sido merecedor de maior atenção por parte dos investigadores durante a última década.

### 2.2.5. Profilaxia

Várias medidas tem sido advogadas para prevenir os episódios de OMA, contudo com taxas de sucesso muito variável. A cirurgia através da miringotomia com colocação de tubos de ventilação contribui para uma diminuição da recorrência da OMA em mais de 50% dos doentes (Debruyne & Degroote 1993). Este tipo de intervenção, embora altamente eficaz, comporta alguns riscos nos quais se incluem a própria anestesia geral, a perfuração timpânica residual, a infecção, a miringosclerose, a atrofia da membrana timpânica e muito excepcionalmente a indução de colesteatoma iatrogénico (Gundersen *et al.* 1984). A adenoidectomia também constitui uma medida válida para diminuir a frequência dos episódios de OMA, possivelmente como resultado de uma melhoria da ventilação nasal e da redução da sobrecarga bacteriana da nasofaringe (Paradise *et al.* 1990).

A profilaxia prolongada com antibióticos, embora descrita como eficaz na redução em 50% na frequência dos episódios de OMA (Giebink 1994), deve ser reservada apenas para casos muito específicos. O risco de selecção de estirpes bacterianas resistentes após o recurso a esta prática clínica deve ser considerado (Paradise 1995). Além disso, um estudo de Roark & Berman (1997) mostra que o uso profilático de amoxicilina em dose única ou dupla diária não oferece mais protecção do que o placebo, o que torna o seu uso questionável.

O papel da imunização no tratamento profilático da OMA é, todavia, ainda pouco convincente. Observações clínicas sobre a imunização passiva com imunoglobulinas por via intramuscular ou endovenosa, ou por administração intranasal, não se mostraram convincentes na prevenção da OMA (Kalm *et al.* 1986; Jorgensen *et al.* 1992; Heikkinen *et al.* 1998). Igualmente, a taxa de sucesso das vacinas específicas, como a recentemente comercializada vacina conjugada heptavalente contra os serotipos do *S. pneumoniae* mais comuns na OMA, tem conhecido um impacto modesto representado por uma redução dos episódios de OMA em apenas 6-7% (Eskola 2000; Black *et al.* 2000). Parte da limitação destes resultados parece resultar do aumento de otites por serotipos não incluídos na vacina e de infecções por agentes como o *H. influenzae* não-típavel e *M. catarrhalis* para os quais não há ainda vacinação efectiva (Russel & Mulholland 2002). Ainda no respeitante à imunização activa, a vacina anti-gripal parece ser a que apresenta resultados mais favoráveis em crianças até à presente data com uma redução em 30% dos episódios febris de OMA durante os surtos de gripe (Belshe *et al.* 1998).

Estudos recentes (Fujimori *et al.* 1996; Tano *et al.* 2002) apresentaram resultados prometedores com a utilização de estirpes de estreptococos alfa-hemolíticos, um tipo de bactéria comensal habitual da nasofaringe, na interferência *in vitro* com o crescimento e adesividade de bactérias patogénicas da OMA. Falta, contudo, comprovar a eficácia deste tipo de profilaxia em estudos *in vivo*. Por outro lado, a utilização de pastilhas elásticas impregnadas com o adoçante xilitol, um carboidrato natural com propriedades inibidoras da aderência e proliferação bacterianas, foi descrita em estudos clínicos como responsável pela redução de 30-40% dos episódios de OMA (Huari *et al.* 1996), mas sem efeito significativo nas crianças com passado clínico de OMA recorrente (Huari *et al.* 2000). É ainda importante salientar a importância da evicção dos factores de risco ambientais que se associam à OMA, embora nem sempre seja fácil a sua execução plena bem como avaliar a sua eficácia com clareza, atendendo ao carácter multifactorial desta doença.



### 2.2.6. Complicações e Sequelas

Um dos motivos principais pelo qual a OMA assume uma elevada relevância clínica reside no seu potencial para originar complicações e sequelas. Uma complicação inicia-se no preciso momento em que o processo infeccioso do ouvido médio se expande para além dos limites do mucoperiósteo e invade as estruturas vizinhas (Goycoolea & Jung 1991). É necessário um tratamento imediato. As complicações dividem-se habitualmente em: (a) intratemporais, que incluem a mastoidite aguda, a paralisia facial, a labirintite e a petrosite, e (b) extratemporais, que incluem a meningite, a tromboflebite do seio lateral, a hidrocefalia óptica e diversos tipos de abscessos intra e extracranianos (Spratley & Pais-Clemente 2003 no prelo).

Embora as complicações da OMA sejam actualmente consideradas raras nas sociedades desenvolvidas, a sua importância mantêm-se inalterada pela elevada morbilidade e pelo risco de serem potencialmente fatais (Kangsanarak *et al.* 1993; Goldstein *et al.* 1998; Spratley *et al.* 2003 no prelo). É todavia significativo que em vários estudos recentemente publicados, a taxa de alguns tipos de complicações da OMA, nomeadamente da mastoidite aguda, tenha vindo a crescer nos últimos anos. (Spratley *et al.* 2000; Bahadori *et al.* 2000; Ghaffar *et al.* 2001; Ruiz-Diaz *et al.* 2002).

Em contraste, o termo sequela aplica-se a um processo que representa uma consequência da doença, mas que não constitui uma emergência médica ou cirúrgica (Dew & Shelton 1998). Entre as sequelas da otite média salientam-se a perfuração da MT, a miringosclerose e a timpanosclerose, a atelectasia timpânica, a fixação ou descontinuidade da cadeia ossicular, o granuloma de colesterol, o desenvolvimento de colesteatoma, a hipoacusia de condução e neurosensorial, e atrasos no desenvolvimento cognitivo ou comportamental.

### i) *Miringosclerose*

Falando-se de otite média aguda e particularmente de miringotomia, justifica-se uma abordagem discriminada da miringosclerose. Concretamente, a miringosclerose consiste numa condição patológica que afecta a lâmina própria da MT, com espessamento, hialinização e eventual calcificação da camada de tecido conjuntivo (House & Sheehy 1960; Igarashi *et al.* 1970; Morgan 1977; Ferlito 1979). Num contexto mais vasto, em que as lesões escleróticas afectam a MT e também as estruturas do ouvido médio, o termo timpanosclerose é usado correntemente.

A primeira descrição desta entidade clínica foi efectuada por Cassebohm (1734), a que se seguiram várias descrições de diversos otorrinolaringologistas como von Trölsch (1869) e Politzer (1883). Já no século vinte, os adventos da timpanoplastia (Zöllner 1956) e da inserção de tubos de ventilação transtimpânicos no tratamento da otite média (Armstrong 1954) vieram reavivar o interesse por esta patologia.

Clinicamente, as lesões de miringosclerose são visíveis como manchas esbranquiçadas na MT que surgem como sequela da OMA, da otite média com efusão e da otite média crónica (Slack *et al.* 1984; Pichichero *et al.* 1989; Schucknecht 1993). Como já mencionado, o seu aparecimento tem sido particularmente relacionado com a miringotomia e colocação de tubos de ventilação transtimpânicos. Assim, as taxas de miringosclerose na otite média variam respectivamente entre 33-70% após a miringotomia com tubos de ventilação, 8-13% após a miringotomia simples ou entre 0.9-15% em ouvidos não miringotomizados (MacKinnon 1971; Lildholt 1983; Tos *et al.* 1983; Slack *et al.* 1984; Lesser *et al.* 1988; Maw 1991; Tos & Stangerup 1989).

A localização preferencial das lesões de miringosclerose ocorre nos quadrantes inferiores da *pars tensa* (Möller 1981a; Lesser *et al.* 1988; Parker *et al.* 1990), embora em casos mais avançados possa atingir os

outros quadrantes, assumindo uma forma em ferradura em volta do cabo do martelo (Tos 1983; Lesser *et al.* 1988). Möller (1981b), num estudo de microscopia electrónica, observou que a *pars flaccida* também pode ser alvo de fenómenos de miringosclerose. Mais recentemente Mattsson e colaboradores (1999) verificaram que no ratinho as primeiras lesões escleróticas surgem na *pars flaccida*, nove horas após a realização de miringotomia. A lesão miringosclerótica madura assume uma configuração de “placa”, com uma estrutura microscópica laminar em que alternam bandas claras e escuras, que resulta da confluência de várias lesões menores. As lesões escleróticas apresentam-se geralmente rodeadas de células inflamatórias e vasos (Sörensen & True 1971).

Chang (1969) e Sörensen & True (1971) sugeriram que a histopatogénese do fenómeno se inicia por uma invasão fibroblástica da lâmina própria, seguida pelo espessamento e fusão das fibras de colagénio numa massa homogénea, e finalmente pela deposição difusa intra e extracelular de cristais de cálcio e fosfato. Aparentemente, o processo de calcificação que ocorre na lâmina própria da MT é precedido pela degenerescência e hialinização do tecido conjuntivo causada pela deposição de substâncias proteicas resultantes da lesão celular (House & Sheehy 1960; Igarashi *et al.* 1970; Hussl & Lim 1984). Ultraestruturalmente, ao nível dos fibroblastos, a lesão celular traduz-se por fenómenos de tipo necrótico com uma alteração da densidade e distorção da forma do núcleo e das mitocôndrias (Chang 1969; Möller 1981b). Segundo Friedman e colaboradores (1980), a lise dos fibroblastos e de células inflamatórias libertaria vesículas da matriz provenientes da membrana celular as quais, depositando-se entre as fibras de colagénio, iriam catalizar a calcificação e deste modo originar as denominadas calculo-esfêrulas. Para Mann e co-autores (1980), estas vesículas da matriz seriam antes lisossomas ricos em fosfatase ácida. Uma hipótese distinta foi avançada por Hussl & Lim (1984) que, ao encontraram vesículas da matriz em zonas sem esclerose

e grânulos simples de fosfato de cálcio em MTs com miringosclerose, defendem ser os componentes degenerados do colagénio que geram a calcificação. Outros investigadores, ainda, verificaram que a mineralização também é passível de se desencadear no interior das próprias mitocôndrias degeneradas (Chang 1969; Schiff *et al.* 1980).

Recentemente, Mattsson (1997) defendeu uma tese inovadora que associa a formação de miringosclerose à produção de radicais livres de oxigénio. Os pressupostos desta teoria basearam-se em estudos experimentais que, por um lado demonstravam uma maior abundância de miringosclerose em MTs miringotomizadas e expostas a ambientes pró-oxidantes que denominou por “hiperóxicos” (Hellström *et al.* 1993; Mattsson *et al.* 1995), e por outro a aplicação de antioxidantes reduzia a formação de miringosclerose (Mattsson & Hellström 1997; Mattsson *et al.* 1997).

Resumidamente, um radical livre consiste numa molécula ou átomo com um electrão desemparelhado na sua órbita mais externa, capazes de captarem um electrão de outra molécula ou átomo (Halliwell & Gutteridge 1989). São exemplos destas espécies químicas o radical superóxido ( $O_2^{\circ}$ ), o radical hidroxil ( $OH^{\circ}$ ) e o radical óxido nítrico ( $NO^{\circ}$ ). Os radicais livres de oxigénio formam-se primariamente durante os processos oxidativos biológicos, resultantes do metabolismo aeróbico. A sua concentração aumenta na inflamação através da produção pelas células fagocitárias, que se servem destes radicais tóxicos no combate contra os microorganismos e outros tipos de agressão (Rossi *et al.* 1985). Entre os vários efeitos ao nível dos compostos orgânicos, os radicais livres são capazes de iniciar a peroxidação lipídica, que se traduz na oxidação de ácidos gordos polinsaturados das membranas celulares, na desnaturação de proteínas, em reacções com o ADN causando ruptura da sua sequência e mutações, e ainda em lesão dos componentes mitocondriais (Farber *et al.* 1990; Evelson 2002). Uma reacção com um radical livre origina um

novo radical intermédio numa sequência que tende à auto-alimentação, como uma reacção em cadeia. Para combater os danos causados pelos radicais livres, existem várias substâncias de defesa com potencial de neutralização ou atenuação desta reacção em cadeia, os denominados antioxidantes. Estes dividem-se basicamente em enzimáticos e não-enzimáticos, conforme a estrutura do agente antioxidante. No sistema enzimático destacam-se a dismutase do superóxido (Freeman & Crapo, 1982; Marklund 1984), a catalase e a peroxidase do glutatião (Takahashi *et al.* 1987; Chu *et al.* 1993). Como antioxidantes não-enzimáticos, incluem-se: compostos com o grupo sulfidril como a metionina e a N-acetilcisteína (Zafarullah *et al.* 2003); proteínas do plasma como a haptoglobina, a ceruloplasmina e a albumina (Guttridge & Wilkins 1983); oligoelementos como o molibedénio, o cobre, o selénio e o zinco (Chan *et al.* 1998); polifenóis como o resveratrol, as catequinas e as proantocianidinas (Lemos 2002; Howitz *et al.* 2003; McKenzie *et al.* 2003; Losa 2003); e várias vitaminas como o Beta-caroteno (vitamina A), o ácido ascórbico (vitamina C) e o Alfa-tocoferol (vitamina E) (Burton *et al.* 1982; Bendich *et al.* 1986). Os efeitos dos diversos antioxidantes no organismo humano foram descritos de forma abrangente por Basu, Temple & Garg (1999). No campo da Otologia, em particular, tem-se desenvolvido um interesse crescente sobre o efeito dos antioxidantes na prevenção da lesão coclear secundária à exposição ao ruído ou aos ototóxicos (Kopke *et al.* 1997; Seidman *et al.* 2003).

## II. OBJECTIVOS

Na presente dissertação, centrada no vastíssimo âmbito da OMA, tentou-se compreender melhor alguns aspectos das suas repercussões ao nível coclear, avaliar com diferentes métodos laboratoriais qual a sua prevalência microbiológica na região do Porto, assim como investigar

aspectos relacionados com a cicatrização timpânica e prevenção de sequelas pós-miringotomia, para procurar responder a uma série de questões até agora em aberto ou ainda alvo de controvérsia.

- 1) Assim, com fundamento nas observações precedentes, parece plausível que no decurso da otite média se verifiquem fenómenos de disfunção coclear manifestados por hipoacusia neurossensorial. A maioria dos estudos publicados sobre este tema, até à presente data, versam essencialmente sobre as sequelas auditivas no decurso da otite média crónica ou da otite média com efusão. Os escassos trabalhos clínicos sobre a hipoacusia neurossensorial subsequente à OMA, têm sido dedicados às sequelas auditivas a longo prazo ou então à descrição de casos clínicos esporádicos. De acordo com a revisão bibliográfica efectuada, nenhum estudo avaliou de modo controlado os limiares auditivos nas vias aérea e óssea no momento do diagnóstico da OMA e sua reavaliação sistemática aos 15 e 30 dias. Na presente dissertação (*Publicação I*) procurou-se contribuir para um maior aprofundamento dos conhecimentos nesta área, através de uma análise clínica prospectiva e controlada dos limiares auditivos obtidos por audiometria tonal, nas vias aérea e óssea, numa amostra de crianças com diagnóstico de OMA unilateral.
  
- 2) Assumindo-se que o componente de disfunção coclear associado à otite média tem uma das suas representações histopatológicas na forma de labirintite serosa, procedeu-se ao estudo microscópico de um extenso número de secções de ossos temporais humanos (*Publicação II*) em busca de sinais indicativos de interacção entre o ouvido médio e o ouvido interno, que contribuíssem para a interpretação dos resultados clínicos registados durante a OMA. Mais, sabendo-se que a labirintite serosa tem potencialmente uma origem multifactorial, procurou-se identificar os casos com patologia

específica do ouvido médio e ao mesmo tempo tentou-se quantificar a presença de sinais de hidropisia endolinfática associada à labirintite serosa.

- 3) Tentou-se avaliar clínica e histopatologicamente os efeitos da miringotomia na OMA e em particular os fenómenos decorrentes da cicatrização da MT. A crescente emergência, a nível mundial, de estirpes bacterianas com baixa susceptibilidade aos antimicrobianos na OMA, tem motivado uma reavaliação das atitudes terapêuticas nesta infecção, com uma tendência para o uso mais conservador de antibióticos, que poderia proporcionar o ressurgimento de uma polémica antiga respeitante à realização mais frequente de miringotomia na OMA. Por outro lado, tal panorama microbiológico tornou exigível um conhecimento actualizado da prevalência das diversas estirpes bacterianas nas crianças com OMA no nosso País, e mais especificamente na região do Porto. Com a finalidade referida, estudou-se prospectivamente (*Publicação III*) a evolução clínica, pneumatoscópica e timpanométrica numa amostra de crianças com diagnóstico de OMA, “randomizada” em dois grupos: respectivamente com e sem miringotomia. Os aspirados do ouvido médio provenientes dos ouvidos miringotomizados foram duplamente submetidos a análise microbiológica através de exames culturais clássicos e pelo método recentemente introduzido de PCR.
  
- 4) Sendo reduzida a informação publicada em volta da miringotomia na OMA ao nível investigacional básico, quando comparada com a obtida a nível clínico, recorreu-se a este paradigma experimental. Assim, como a literatura é omissa relativamente à investigação das fases precoces da cicatrização, i.e. horas após a miringotomia, tanto para tímpanos normais como no decurso da OMA, procedeu-se ao

estudo histopatológico da cicatrização da MT em diversos tipos de condições inflamatórias. O interesse desta abordagem é grande se considerarmos que a MT tem sido descrita como possuidora de mecanismos rápidos de resposta à agressão, como a representada pela inoculação de bactérias no ouvido médio. Para tal, provocou-se uma infecção unilateral do ouvido médio mediante a inoculação da *bulla temporalis* de ratos Sprague-Dawley com uma suspensão de *S. pneumoniae*, seguida da observação sequencial otomicroscópica *in vivo* e posterior estudo por microscopia de luz e electrónica das MTs devidamente seccionadas. Num dos trabalhos (*Publicação IV*), procurou-se avaliar quais os efeitos que a miringotomia induz a curto prazo na estrutura da MT durante o curso natural da OMA, através de uma análise comparativa seriada, qualitativa e quantitativa, de dois grupos “randomizados” de animais com ouvidos infectados, respectivamente com e sem miringotomia.

- 5) Na mesma linha, outro dos objectivos da presente dissertação consistiu na monitorização experimental dos eventos precoces que ocorrem a partir das três horas após miringotomia em MTs infectadas, comparando estas reacções com as observadas num grupo controle com miringotomia mas sem infecção (*Publicação V*).
- 6) Por último, procurou-se avaliar o efeito da aplicação tópica do ácido ascórbico, um antioxidante potente que também desempenha um papel fulcral na síntese do tecido conjuntivo, no desenvolvimento de depósitos de miringosclerose em MTs submetidas a miringotomia (*Publicação VI*).



## BIBLIOGRAFIA

- Albiin N, Hellström S, Salén B, Stenfors LE, Wirell S (1985) The vascular supply of the rat tympanic membrane. *Anat Rec* 212: 17-22.
- Albiin N, Hellström S, Stenfors LE, Cerne A (1986) Middle ear mucosa in rats and humans. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 126: S2-S15.
- Alho OP, Koivu M, Sorri M, Rantakallio P (1990) Risk factors for recurrent acute otitis media and respiratory infections in infancy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 19: 151-161.
- Alho OP, Koivu M, Sorri, Rantakallio P (1991) The occurrence of acute otitis media in infants. A life-table analysis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 21: 7-14.
- Alho OP, Kilkku O, Oja H, Koivu M, Sorri M (1993) Control of the temporal aspect when considering risk factors for acute otitis media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 119: 444-449.
- Alho OP, Oja H, Koivu M, Sorri M (1995) Risk factors for chronic otitis media with effusion in infancy. Each acute otitis media episode induces a high but transient risk. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121: 839-843.
- Alho OP (1997) How common is recurrent acute otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 529: S8-S10.
- Alm P, Bloom G, Hellström S, Stenfors L-E, Widemar L (1983a) Mast cells in the pars flaccida of the tympanic membrane. A quantitative morphological and biochemical study in the rat. *Experientia* 39: 287-289.
- Alm PE, Bloom GD, Hellström S, Stenfors LE, Widemar L (1983b) Middle ear effusion caused by mechanical stimulation of the external auditory canal. An experimental study in the rat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 96: 91-98.
- Alsarraf R, Gates GA (1999) Economic costs and consequences. In: Rosenfeld RM and Bluestone CD (Eds.) *Evidence-Based Otitis Media*. B.C. Decker Inc, Hamilton, Ontario, p. 285-292.
- Alsarraf R, Jung CJ, Perkins J, Alsarraf NW, Gates GA (1999) Measuring the indirect and direct costs of acute otitis media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125: 12-18.
- Amoils CP, Jackler RK, Lustig LR (1992) Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor. *Otolaryngol Head Neck Surg* 107: 669-683.

- Anniko M, Hellström S, Schmidt SH, Spandow O (1989) Toxic effects on inner ear of noxious agents passing through the round window membrane. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 457: 49-56.
- Appelbaum PC (1994) Antibiotic-resistant *pneumococci* – facts and fiction. *J Chemother Suppl* 4: S7-S15.
- Appelman CL, Bossen PC, Dunk JH, Lisdonk EH, deMelker RA, vanWeert HC (1990) NHG standard Otitis Media Acuta. *Huisarts Wet* 33: 242-245.
- Armstrong BW (1954) A new treatment for chronic secretory otitis media. *Arch Otolaryngol* 59: 653-657.
- Arola M, Ziegler T, Ruuskanen O, Mertsola J, Nanto-Salonen K, Halonen P (1988) Rhinovirus in acute otitis media. *J Pediatr* 113: 693-695.
- Aronovitz GH (2000) Antimicrobial therapy of acute otitis media: review of treatment recommendations. *Clin Ther* 22: 29-39.
- Ars B (1977) Système timpano-ossiculaire de l'homme. Contribution à l'anatomie chirurgicale. *Cahiers ORL* 12: 845-861.
- Bahadori RS, Schwartz RH, Ziai M (2000) Acute mastoiditis in children: an increase in frequency in Northern Virginia. *Pediatr Infect Dis J* 19: 212-215.
- 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.
- Basu TK, Temple NJ, Garg ML (1999) Antioxidants in Human Health and Disease. CABI Publishing, Wallington, UK.
- Beck C, Schmidt CL (1978) 10 years of experience with intratympanically applied streptomycin (gentamycin) in the therapy of morbus Ménière. *Arch Oto-Rhino-Laryngol* 221: 149-152.
- Belshe RB, Mendelman PM, Treanor J, King J, Gruber WC, Piedra P, *et al.* (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children. *N Engl J Med* 338: 1405-1412.
- Bendich A, Machlin L, Scandurra O, Burton G, Wayner D (1986) The antioxidant role of vitamin C. *Adv Free Radical Biol Med* 2: 419-44.
- Bitnum A, Allen UD (1998) Medical therapy of otitis media: use, abuse, efficacy, and morbidity. *J Otolaryngol Suppl* 2: S26-S36.

- Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, *et al.* (2000) Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J* 19: 187-195.
- Blake CJ (1882) The progressive growth of the dermoid coat of the membrana tympani. *Am J Otol* 4: 226-228.
- Blomgren K, Pitkaranta A (2003) Is it possible to diagnose acute otitis media accurately in primary health care? *Fam Pract* 20: 524-527.
- 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. 446-457.
- Bluestone CD (1999) Eustachian tube function and dysfunction. In: Rosenfeld RM and Bluestone CD (Eds.) *Evidence-Based Otitis Media*. B.C. Decker Inc, Hamilton, Ontario, p. 137-156.
- Bluestone CD, Gates GA, Klein JO, Lim DJ, Mogi G, Ogra PL, *et al.* (2002a) Recent advances in otitis media. Definitions, terminology and classification of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 139: S8-S18.
- Bluestone CD, Klein JO, Rosenfeld RM, Berman S, Casselbrant ML, Chonmaitree T, Giebink GS, Gröte I, *et al.* (2002b) Recent advances in otitis media. Treatment, complications and sequelae. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 139: S102-S124.
- Boedts D (1978) Epithelial migration on the tympanic membrane. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 32: 309-327.
- Boedts D, Kuijpers W (1978) Epithelial migration on the tympanic membrane. An experimental study. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 85: 248-252.
- Brady DR, Pearch JP, Juhn SK (1976) Permeability of the round window membrane to Na<sup>22</sup> or RISA. *Arch Otolaryngol* 214: 184-185.
- Browning GG, Granich MS (1978) Surgical anatomy of the temporal bone in the chinchilla. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 87: 875-882.
- Brugge JF, Geisler CD (1978) Auditory mechanisms of the lower brainstem. *Ann Rev Neurosci* 1: 363-394.
- Burnett CH (1877) *The Ear, Its Anatomy, Physiology and Diseases*. Henry C Lea & Son, Philadelphia, PN, U.S.A.

- Burton GW, Joyce A, Ingold KU (1982) First proof that vitamin E is a major lipid-soluble, chain breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 8293: 327.
- Cassebohm IF (1734) *Tratactus quatuor anatomici de aure humana*.
- Casselbrandt ML, Kaleida PH, Rockette HE, Paradise JL, Bluestone CD, Kurs-Lasky M, Nozza RJ, Wald ER (1992) Efficacy of antimicrobials prophylaxis and of tympanostomy tube insertion for prevention of recurrent acute otitis media: results of a randomized clinical trial. *Pediatr Infect Dis J* 11: 278-286.
- Casselbrandt ML, Mandel EM, Kurs-Lasky M, Rockette HE, Bluestone CD (1995) Otitis media in a population of black American and white American infants, 0-2 years of age. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 33: 1-16.
- Casselbrandt ML, Mandel EM (1999) Epidemiology. In: Rosenfeld RM and Bluestone CD (Eds.) *Evidence-Based Otitis Media*. B.C. Decker Inc, Hamilton, Ontario, p. 117-136.
- Cayé-Thomasen P, Hermansson A, Tos M, Prellner K (1999) Bone modeling dynamics in acute otitis media. *Laryngoscope* 109: 723-729.
- Cayé-Thomasen P, Tos M (2002) Histopathologic differences due to bacterial species in acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 63: 99-110.
- Chan S, Gerson B, Subramaniam S (1998) The role of copper, molybdenum, selenium, and zinc in nutrition and health. *Clin Lab Med* 18: 673-685.
- Chang IW (1969) Tympanosclerosis. Electron microscopic study. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 68: 62-72.
- Chen JM, Kakigi A, Hirakawa H, Mount RJ, Harrison RV (1999) Middle ear instillation of gentamycin and streptomycin in chinchillas: morphologic appraisal and selective ototoxicity. *J Otolaryngol* 28: 121-128.
- Chole RA, Kodama K (1989) Comparative histology of the tympanic membrane and its relationship to cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 98: 761-765.
- Chonmaitree T, Howie VM, Truant AL (1986) Presence of respiratory viruses in middle ear fluids and nasal wash specimens from children with acute otitis media. *Pediatrics* 77: 698-702.
- Chonmaitree T, Henrickson KJ (2000) Detection of respiratory viruses in the middle ear fluids of children with acute otitis media by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Pediatr Infect Dis J* 19: 258-260.

- Chu FF, Doroshov JH, Esworthy S (1993) Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *Biol Chem* 268: 2571-2576.
- Chung MH, Giffith SR, Parl KH, Lim DJ, DeMaria TF (1993) Cytological and histological changes in the middle ear after inoculation of influenza A virus. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 113: 81-87.
- Claessen JQ, Appelman CL, Touw-Otten FW, De Melker RA, Hordijk GJ (1992) A review of clinical trials regarding treatment of acute otitis media. *Clin Otolaryngol* 17: 251-257.
- Clawson JP, Litton WB (1971) The healing process of tympanic membrane perforations. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 75: 1302-1312.
- Cooper AP (1802) In: *Philosophical Transactions, London, Part I*, p. 151-158.
- Dagan R (1998) Can the choice of antibiotics for therapy of acute otitis media be logical? *Eur J Clin Microbiol* 17, 1-5.
- Damoiseaux RA, van Balen FA, Hoes AW, Verheij TJ, de Melker RA (2000) Primary care based randomized, double blind trial of amoxicillin versus placebo for acute otitis media in children aged under 2 years. *BMJ* 320 (7231): 350-354.
- Davison FW (1955) Otitis media: Then and now. *Laryngoscope* 65: 142-51.
- Dean LW, Wolff D (1934) Pathology and routes of infection in labyrinthitis secondary to middle ear otitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 43: 702-717.
- Debruyne F, Degroote M (1993) One-year follow-up after tympanostomy tube insertion for recurrent acute otitis media. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 55: 226-229.
- Del Beccaro M, Mendelman P, Inglis A, Richardson MA, Duncan NO, Clausen CR, *et al.* (1992) Bacteriology of acute otitis media: A new perspective. *J Pediatr* 120: 81-84.
- 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.
- Dew LA, Shelton C (1998) Complications of temporal bone infections. In: Cummings CW (Ed.) *Otolaryngology Head and Neck Surgery* (3<sup>rd</sup> ed), Mosby-Year Book, St. Louis, MO, p. 3047-75.

- Dobbie R, Berlin C (1979) Influence of otitis media on hearing and development. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 88: 48-53.
- Doern GV, Heilmann KP, Huynh HK, Rhomberg PR, Coffman SL, Brueggeman AB (2001) Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999-2000, including a comparison of resistance rates since 1994-1995. *Antimicrob Agent Chemother* 45: 1721-1729.
- Dowell SF, Marcy MS, Phillips WR, Gerber MA, Schwartz B (1998) Otitis media – principles of judicious use of antimicrobials agents. *Pediatrics Suppl* 101: S165-171.
- Doyle WJ (2002) The link between allergic rhinitis and otitis media. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2: 21-25.
- Engelhard D, Strauss N, Jorzak-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.
- English GM, Northern JL, Fria TJ (1973) Chronic otitis media as a cause of sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol* 98: 12-22.
- Eriksson PO, Hellström SO (2003) Acute otitis media develops in the rat after intranasal challenge of *Streptococcus pneumoniae*. *Laryngoscope* 113: 2047-2051.
- Eriksson PO, Mattsson C, Hellström S (2003) First forty-eight hours of developing otitis media: an experimental study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112: 558-566.
- Eskola J (2000) Polysaccharide-based pneumococcal vaccines in the prevention of acute otitis media. *Vaccine Suppl* 19: S78-S82.
- Evelson PA (2002) Estrés oxidativo y apoptosis. In: Marroni NP (Ed.) *Estrés oxidativo e antioxidantes*. Editora Ulbra, Porto Alegre, Brasil p. 153-152.
- Eybalin M (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73: 309-373.
- Fairbanks DN (2003) Microbiology and drug selections for the treatment of infections in the ear, nose, throat, head, and neck. In: Fairbanks DN (Ed.), *Pocket Guide to Antimicrobial Therapy in Otolaryngology - Head and Neck Surgery* (11<sup>th</sup> ed). Am Acad Otolaryngol Head Neck Surg Fdn Inc: Alexandria, VA, p. 26-45.

- Farber JL, Kyle ME, Coleman JB (1990) Biology of disease. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest* 62: 670-679.
- 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.
- Felmingham D, Reinert RR, Hirakata Y, Rodloff A (2002) Increasing prevalence of antimicrobials resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study, and comparative in vitro activity of the ketolide, telithromycin. *J Antimicrob Chemother* 50: 25-37.
- Ferlito A (1979) Histopathogenesis of tympanosclerosis. *J Laryngol Otol* 93: 25-37.
- Filogamo G (1949) Recherches sur la structure de la membrane du tympan chez les différents vertébrés. *Acta Anat* 7: 248-256.
- Franke K (1977) Freeze fracture aspects of the junctional complexes in the round window membrane. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 217: 331-337.
- Freeman BA, Crapo JD (1982) Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-426.
- Friedman I (1955) The comparative pathology of otitis media – experimental and human. *J Laryngol Otol* 69: 588-601.
- Friedman I, Hodges GM, Graham M (1980) Tympanosclerosis. An electron microscopic study of matrix vesicles. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 68: S241-S245.
- Froom J, Culpepper L, Jacobs M, DeMelker RA, Green LA, van Buchem L, *et al.* (1997) Antimicrobials for acute otitis media? A review from the International Primary Care Network. *BMJ* 315: 98-102.
- Froom J, Culpepper L, Green LA, de Melker RA, Grob P, Heeren T, van Balen F (2001) A cross-national study of acute otitis media: risk factors, severity, and treatment at initial visit. Report from the International Primary Care Network (IPCN) and the Ambulatory Sentinel Practice network (ASPN). *J Am Board Fam Pract* 14: 406-417.
- Fujimori I, Hisamatsu K, Kikushima K, Goto R, Murakami Y, Yamada T (1996) The nasopharyngeal bacterial flora in children with otitis media with effusion. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 253: 260-263.

- Fumagalli A (1942) Contributo alla conoscenza della struttura della lamina propria della membrana del timpano umana. *Arch Ital Otol* 54: 211-216.
- Garbutt J, Jeffe DB, Shackelford P (2003) Diagnosis and treatment of acute otitis media: an assessment. *Pediatrics* 112: 143-149.
- Gates GA, Avery CS, Prihoda TJ, Cooper JC (1987) Effectiveness of adenoidectomy and tympanostomy tubes in the treatment of chronic otitis media with effusion. *N Engl J Med* 317: 1444-1451.
- Gebhart DE (1981) Tympanostomy tubes in the otitis media-prone child. *Laryngoscope* 91: 849-866.
- Gehanno P, Berche P, Boucot I, Lambert-Zechovaky N, Bingen E, Gress JJ, Rollin C (1994) Comparative efficacy and safety of cefprozil and amoxicillin/clavulanate in the treatment of acute otitis media in children. *J Antimicrob Chemother* 33: 1209-1218.
- 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.
- Ghaffar FA, Wordemann M, McCracken GH (2001) Acute mastoiditis in children: a seventeen-year experience in Dallas, Texas. *Pediatr Infect Dis J* 20: 376-380.
- Giebink GS (1992) Otitis media update: pathogenesis and treatment. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101: 21-23.
- Giebink GS (1994) Preventing otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 163: S20-S23.
- Gok U, Bulut Y, Keles E, Yalcin S, Doymaz (2001) Bacteriological and PCR analysis of clinical material aspirated from otitis media with effusions. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 60: 49-54.
- Goldberg B, Goycoolea MV, Schlievert PM, Shea D, Schachern P, Paparella MM, *et al.* (1981) Passage of albumin from the middle ear to the inner ear in otitis media in the chinchilla. *Am J Otolaryngol* 2: 211-214.
- Goldie P, Hellström S, Forsgren S (1989) Neuropeptides in intact and denervated tympanic membranes. An immuno-histofluorescence study in the rat. *Arch Otolaryngol* 246: 183-189.



- Goldstein NA, Casselbrandt ML, Bluestone CD, Kurs-Larsky M (1998) Intratemporal complications of acute otitis media in infants and children. *Otolaryngol Head Neck Surg* 119: 444-454.
- Goycoolea MV, Paparella MM, Juhn SK, Carpenter AM (1980a) Oval and round window changes in otitis media: potential pathways between middle ear and inner ear. *Laryngoscope* 90: 1387-1391.
- Goycoolea MV, Paparella MM, Goldberg B, Juhn SK, Carpenter AM (1980b) Permeability of the round window membrane in otitis media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 106: 430-433.
- Goycoolea MV, Paparella MM, Goldberg B, Schlievert PM, Carpenter AM (1980c) Permeability of the middle ear to staphylococcal pyrogenic exotoxin in otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1: 301-308.
- Goycoolea MV, Carpenter A-M, Muchow D (1987) Ultrastructural studies of the round window membrane of the cat. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113: 617-624.
- Goycoolea MV, Muchow D, Schachern PA (1988) Experimental studies on round window structure: function and permeability. *Laryngoscope Suppl.* 44: S1-S20.
- Goycoolea MV, Jung TT (1991) Complications of suppurative otitis media. In: Paparella MM, Shumrick DA, Gluckman JL, Meyerhoff WL (Eds.) *Otolaryngology* (3<sup>rd</sup> ed), WB Saunders, Philadelphia, PN, vol. II, p. 1381-1403.
- Goycoolea MV (2001) Clinical aspects of round window membrane permeability under normal and pathologic conditions. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 121: 437-447.
- 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.
- Gundersen T, Tønning FM, Kveberg KH (1984) Ventilation tubes in the middle ear. Long-term observations. *Arch Otolaryngol* 110: 783-784.
- Gutteridge JM, Wilkins S (1983) Copper salt dependent hydroxyl radical formation. Damage to proteins acting as antioxidants. *Biochem Biophys Acta* 759: 38-41.

- Halliwell B, Gutteridge J (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2<sup>nd</sup> ed., Clarendon Press, Oxford, UK, p. 123-126.
- Harsten G, Prellner K, Heldrup J, Kalm O, Kornfalt R (1989) Recurrent acute otitis media. A prospective study of children during the first three years of life. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 107: 111-119.
- Hausdorff WP, Yothers G, Dagan R, Kilpi T, Pelton SI, Cohen R, *et al.* (2002) Multinational study of pneumococcal serotypes causing acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 21: 1008-1016.
- Heikkinen T (2000) Role of viruses in the pathogenesis of acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J Suppl* 19(5): S17-S23.
- Heikkinen T, Ruohola A, Ruuskanen O, Waris M, Huari M, Hammarstrom L (1998) Intranasally administered immunoglobulin for the prevention of rhinitis in children. *Pediatr Infect Dis J* 17: 367-72.
- Hellström S, Salén B, Stenfors LE (1982) Anatomy of the rat middle ear. A study under the dissection microscope. *Acta Anat* 112: 346-352.
- Hellström S, Hermansson A, Johansson U, Prellner K (1988a) 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.
- Hellström S, Johansson U, Anniko M (1988b) Structure of the round window membrane. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 457: S33-S42.
- Hellström S, Goldie P, Magnuson K, Fall C (1993) Oxygen level influences the middle ear tissue reaction in ears with perforated tympanic membranes. In: Lim DJ, Bluestone CD, Klein JO, Nelson JD, Ogra P (Eds.) *Recent Advances in Otitis Media*, BC Decker Periodicals, Ontario, Canada, p. 334-35.
- 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.
- Henderson FW, Collier AM, Sanyal MA, Watkins JM, Fairclough DL, Clyde WA, Denny FW (1982) A longitudinal study of respiratory viruses and bacteria in the etiology of acute otitis media with effusion. *N Engl J Med* 306: 1379-1383.

- Hendolin PH, Markkanen A, Ylikoski J, Whalfors JJ (1997) Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions. *J Clin Microbiol* 35: 2854-2858.
- Hentzer E (1969) Ultrastructure of the human tympanic membrane. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 63: 376-390.
- Hentzer E (1969) Ultrastructure of the human tympanic membrane. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 68: 376-390.
- Hentzer E (1984) Ultrastructure of the middle ear mucosa. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 414: S19-S27.
- Himly C (1808) De perforatione membranae tympani. *Commentatio Soc Reg Scient Göttingen*, vol. XVI: 107-124.
- Hoberman A, Marchant CD, Kaplan SL, Feldman S (2002) Treatment of acute otitis media consensus recommendations. *Clin Pediatr (Phila)* 41: 373-390.
- House H (1946) Acute otitis media: A comparative study of the results obtained in therapy before and after the introduction of sulfonamide compounds. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 43: 371-8.
- House WF, Sheehy JL (1960) Tympanosclerosis. *Arch Otolaryngol (Chic)* 72: 308-313.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, *et al.* (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425: 191-196.
- Huari M, Kontiokari T, Koskela M, Niemela M (1996) Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double blind randomized trial. *BMJ* 313(7066): 1180-1184.
- Huari M, Tapiainen T, Kontiokari T (2000) Xylitol in preventing acute otitis media. *Vaccine Suppl* 20(1): S144-S147.
- Hussl B, Lim DJ (1984) Fine morphology of tympanosclerosis. In: Lim DJ, Bluestone CD, Klein JO, Nelson JD (Eds.), *Recent Advances in Otitis Media with Effusion*. BC Decker, Philadelphia, PN, p. 384-353.
- Ibrahim A, Gurner-Smidt P, Sjöstedt A (1996) Amplification and restriction endonuclease digestion of a large fragment of genes coding for rRNA as a rapid method for discrimination of closely related pathogenic bacteria. *J Clin Microbiol* 34: 2894-2896.

- Igarashi M, Konishi S, Alford BR, Guilford FR (1970) The pathology of tympanosclerosis. *Laryngoscope* 80: 233-243.
- Igarashi Y, Kawabata S (1993) The fine structure of the guinea pig tympanic membrane with special reference to the fiber arrangement. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 504: S140-S142.
- Iino Y, Nakamura Y, Koizumi T, Toriyama M (1993) Prognostic factors for persistent middle ear effusion after acute otitis media in children. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 113: 761-765.
- Ingvarsson L, Lundgren K, Olofsson B (1985) Epidemiology of acute otitis media in children in an urban population. *Auris Nasus Larynx Suppl* 12 (1): S105-S107.
- Ingvarsson L, Lundgren K, Stenström C (1990) Occurrence of acute otitis media in children: cohort studies in an urban population. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 149: 17-18.
- Ishimoto S, Ishibashi T, Bottaro DP, Kaga K (2002) Direct application of keratinocyte growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  during healing of tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 122: 468-473.
- Iurato S, Recchia V (1968) Structure of the round window membrane of the chinchilla. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> European Regional Conference on Electron Microscopy, Rome, Italy*, p. 565-566.
- Jacobs MR (2000) Increasing antibiotic resistance among otitis media pathogens and their susceptibility to oral agents based in pharmacodynamic parameters. *Pediatr Infect Dis J Suppl* 19: S47-S56.
- 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.
- Jerger J, Anthony L, Jerger S, Mauldin L (1974) Studies in impedance audiometry. 3. Middle ear disorders. *Arch Otolaryngol* 99: 165-171.
- Jero J, Virolainen A, Salo P, Leinonen M, Eskola J, Karma P (1996) PCR assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* in the middle ear of children with otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 116: 288-292.

- Jero J, Mhatre AN, Tseng CJ, Stern RE, Coling DE, Goldstein JA, *et al.* (2001) Cochlear gene delivery through an intact round window membrane in mouse. *Hum Gene Ther* 12: 539-548.
- Johnson F, McMinn R, Atlefield G (1968) Ultrastructural and biochemical observations on the tympanic membrane *J Anat* 103: 297-305.
- Joki-Erkila VP, Laippala P, Pukander J (1998) Increase in paediatric acute otitis media diagnosed by primary care in two Finnish municipalities: 1994-5 versus 1978-9. *Epidemiol Infect* 121: 529-34.
- Jorgensen F, Andersson B, Larsson S, Nylen O (1992) Nasopharyngeal bacterial flora in otitis prone children treated with immunoglobulin. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 112: 530-538.
- Juhn AK, Hamaguchi Y, Goycoolea M (1988) Review of round window permeability *Acta Otolaryngol (Stockh)* 457: 43-48.
- Jung TT, Hanson JB (1999) Classification of otitis media and surgical principles. *Otolaryngol Clin N Am* 32: 369-383.
- Jung TT, Hwang SJ, Poole D (1988) New animal models of otitis media in chinchillas. In: Lim DJ, Bluestone CD, Klein JO, Nelson JD (Eds.) *Recent Advances in Otitis Media*. BC Decker Inc., Ontario, Canada, p. 450-453.
- Juntti H, Tikkanen S, Kokkonen J, Alho OP, Niinimäki A (1999) Cow's milk allergy is associated with recurrent otitis media during childhood. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 119: 867-873.
- Kakoi H, Anniko M, Pettersson CAV (1996) Auditory epithelial migration: I. Macroscopic evidence of migration and pathways in rat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 116: 435-438.
- Kakoi H, Anniko M (1997a) Auditory epithelial migration. III: An immunohistologic study using anti-BrdU antibody on tympanic membrane in mouse. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 106: 414-421.
- Kakoi H, Aniko M, Kinnefors A, Rask-Andersen H (1997b) Auditory epidermal cell migration. VII: Antigen expression of proliferating cell nuclear antigens, PCNA and Ki-67 in human tympanic membrane and external auditory canal. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 117: 100-108.

- Kaleida P, Casselbrant M, Rockette H, Paradise J, Bluestone C, Blatter M, Reisinger K, Wald E, Supance J (1991) Amoxicillin or myringotomy or both for acute otitis media: results of a randomized clinical trial. *Pediatrics* 87: 466-474.
- Kalm O, Prellner K, Christensen P (1986) The effect of intravenous immunoglobulin treatment in recurrent acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 11: 237-246.
- Kangsarak J, Fooanant S, Ruckphaopunt K, Navacharoen N, Teotrakul S (1993) Extracranial and intracranial complications of suppurative otitis media: Report of 102 cases. *J Laryngol Otol* 107: 999-1004.
- Kanna SM, Tonndorf J (1972) Tympanic membrane vibrations in cats studied by time-averaged holography. *J Acoust Soc Am* 51: 1904-1920.
- Karma PH, Pukander JS, Sipilä MM, Vesikari TH, Gronroos PW (1987a) Middle ear fluid bacteriology of acute otitis media in neonates and very young infants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 14: 141-150.
- Karma P, Palva T, Kouvalainen K, Kärjä J, Mäkelä P, Prinsi V-P, *et al.* (1987b) Finnish approach to the treatment of acute otitis media. Report of the Finnish Consensus Conference. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 129: S1-S19.
- Karma P, Perala M, Kuusela AL (1989) Morbidity of very young infants with and without acute otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 107: 460-466.
- Karma PH, Sipilä MM, Kataja MJ, Pentillä MA (1993) Pneumatic otoscopy and otitis media. II. Value of different tympanic membrane findings and their combinations. In: Lim DJ, Bluestone CD, Klein JO, Nelson JD, Ogra PL (Eds.). *Recent Advances in Otitis Media*. BC Decker, Ontario, Canada p. 41-45.
- Kawabata I, Ishii H (1971) Fiber arrangement in the tympanic membrane. Scanning electron microscopic observations. *Acta Otolaryngol* 72: 243-254.
- Kawabata I, Paparella MM (1971) Fine structure of the round window membrane. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 80: 13-26.
- Kawauchi H, DeMaria TF, Lim D (1988) Endotoxin permeability through the round window. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl.* 457: S100-S115.
- Kiang NY (1980) Processing of speech by auditory nervous system. *J Acoust Soc Am* 68: 830-835.

- Kimura RS (1968) Experimental production of endolymphatic hydrops. *Otolaryngol Clin North Am* 1: 457-451.
- Kirikae I (1960) The structure and function of the middle ear. Thesis. University of Tokyo Press, Tokyo, Japão.
- Klein JO (1981) The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. *Rev Infect Dis* 3: 246-253.
- Klein JO (1984) Antimicrobial prophylaxis for recurrent acute otitis media. *Pediatr Ann* 13: 398-403.
- Klein JO (1989) Epidemiology of acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J Suppl* 8: S9.
- Klein J (1999) Bacterial resistance and antimicrobials drug selection. In: Rosenfeld RM and Bluestone CD (Eds.) *Evidence-Based Otitis Media*. BC Decker Inc., Hamilton, Ontario, Canada p. 293-302.
- Koba R (1995) Epidermal cell migration and healing of the tympanic membrane: an immunohistochemical study of cell proliferation using bromodeoxyuridine labeling. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104: 218-225.
- Koenig W (1949) A new frequency scale for acoustic measurements. *Bell Lab Record*, Aug p. 299-301.
- Kopke R, Liu W, Gabaizadech R, Jacono A, Feghali J, Spray D, *et al.* (1997) Use of organotropic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory cells. *Am J Otol* 18: 559-571.
- Korver KD, Rybak LP, Withworth C, Campbell KM (2002) Round window application of D-methionine provides cisplatinum otoprotection. *Otolaryngol Head Neck Surg* 126: 683-689.
- Kraemer MJ, Richardson MA, Weiss NS, Furukawa CT, Shapiro GG, Pierson WE, *et al.* (1983) Risk factors for persistent middle-ear effusions – otitis media, catarrh, cigarette smoke exposure and atopy. *JAMA* 249: 1022-1025.
- Lalwani AK, Jero J, Mhatre AN (2002) Current issues in cochlear gene transfer. *Audiol Neurootol* 7: 146-151.
- Lange G (1976) Ototoxische Antibiotika in der Behandlung des Morbus Ménière. *Therapiewoche* 26: 3366-3368.

- Laurent C, Hellström S, Tengblad A, Lilja K (1989) Hyaluronan in experimental serous and purulent otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 98: 736-740.
- Le Bideau M, Mouzard A, Chamoux C, Richet H, Bordure P, Maugard T (1997) Étude bactériologique au cours de l'otite moyenne aiguë. *Arch Pediatr (Paris)* 4: 213-218.
- Lefebvre PP, Staecker H (2002) Steroid perfusion of the inner ear for sudden sensorineural hearing loss after failure of conventional therapy: a pilot study. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 122: 698-702.
- Legent F, Perlemuter L, Vandenbrouck C. (1986) Cahiers d'anatomie O.R.L., Masson et Cie., Paris, France, p. 19-45.
- Leibovitz E, Raiz S, Piglansky L, Greenberg D, Yagupsky P, Fliss DM, Leiberman A, Dagan R (1998) Resistance pattern of middle ear fluid isolates in acute otitis media recently treated with antibiotics. *Pediatr Infect Dis J* 17: 463-469.
- Lemos AH (2002) Alimentos funcionais. *Rev Oxitol (Jan/Mar)*: 8-11.
- Lesser T, Williams K, Skinner D (1988) Tympanosclerosis, grommets and shear stresses. *Clin Otolaryngol* 13: 375-80.
- Lildholdt T (1983) Ventilating tubes in secretory otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 398: S5-S28.
- Lim DJ (1968a) Tympanic membrane. Electron microscopic observation. Part I: pars tensa. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 66: 181-198.
- Lim DJ (1968b) Tympanic membrane. Part II: pars flaccida. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 66: 515-532.
- Lim DJ (1970) Human tympanic membrane. An ultrastructural observation. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 70: 176-86.
- Lim DJ (1995) Structure and function of the tympanic membrane: a review. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 49: 101-115.
- Litton WB (1963) Epithelial migration over the tympanic membrane and external ear canal. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 77: 254.
- Litton WB (1968) Epidermal migration in the ear: the location and characteristics of the generation center revealed by utilizing a radioactive desoxyribose nucleic acid precursor. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 240: S1-S39.
- Losa GA (2003) Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur J Clin Invest* 33: 818-823.



- Lundgren K, Ingvarsson L (1986) Microbiology in acute otitis media. In: Sadé J (Ed.) Acute and secretory otitis media. Kugler publications, Amsterdam, The Netherlands p. 175-179.
- Lundman L, Juhn SK, Bagger-Sjöback D, Svanborg C (1992) Permeability of the normal round window membrane to *Haemophilus influenzae* type b endotoxin. Acta Otolaryngol (Stockh) 112: 524-529.
- Luotonen J, Reva E, Karma P, Timonen M, Leinonen M, Makela PH (1981) The bacteriology of acute otitis media in children with special reference to *Streptococcus pneumoniae* as studied by bacteriological and antigen detection methods. Scand J Infect Dis 13: 177-183.
- Ma Y, Zhao H, Zhou X (2002) Topical treatment with growth factors for tympanic membrane perforations: progress towards clinical application. Acta Otolaryngol (Stockh) 122: 586-599.
- MacKinnon DM (1971) The sequelae to myringotomy for exsudative otitis media. J Laryngol Otol 85: 773-793.
- Magnuson K, Hellström S (1994) Early structural changes in the rat tympanic membrane during pneumococcal otitis media. Eur Arch Otorhinolaryngol 251: 393-398.
- 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.
- Malaviya R, Abraham SN (1998) Clinical implications of mast cell – bacteria interaction. J Mol Med 76: 617-623.
- Mandel EM, Rockette HE, Bluestone CD, Paradise JL, Nozza RJ (1992) Myringotomy with and without tympanostomy tubes for chronic otitis media with effusion. Pediatr Infect Dis J 11: 270-277.
- Mann W, Riede UN, Jonas I, Beck C (1980) The role of matrix vesicles in the pathogenesis of tympanosclerosis. Acta Otolaryngol (Stockh) 89: 43-52.
- Manninen R, Huovinen P, Nissinen A (1997) Increasing antimicrobials resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in Finland. J Antimicrob Chemother 40: 387-392.
- Marklund SL (1984) Extracellular-superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. J Clin Invest 74: 1398-1403.

- Mattsson C, Magnuson K, Hellström S (1995) Myringosclerosis caused by increased oxygen concentration in traumatized tympanic membranes. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104: 625-632.
- Mattsson C (1997) Myringosclerosis. An experimental basis for a theory of its etiology. Medical Dissertation, Umeå University, Umeå, Sweden, p. 34-51.
- Mattsson C, Hellström S (1997) Inhibition of the development of myringosclerosis by local administration of fenspiride, an anti-inflammatory drug. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254: 425-429.
- Mattsson C, Marklund S, Hellström S (1997) Application of oxygen free radical scavengers to diminish the occurrence of myringosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 106: 513-518.
- Mattsson C, Johansson C, Hellström S (1999) Myringosclerosis develops within 9 h of myringotomy. *ORL* 61: 31-36.
- Maw AR (1991) Development of tympanosclerosis in children with otitis media with effusion and ventilation tubes. *J Laryngol Otol* 105: 614-617.
- McKenzie GG, Carrasquedo F, Delfino JM, Keen CI, Fraga CG, Oteiza PI (2003) Epicatechin, catechin and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB Nov 20* (Epub).
- Metcalf DD, Baram D, Mekori YA (1997) Mast cells. *Physiol Rev* 77: 1033-1079.
- Meyer W (1893) Geschichte der Ohrenheilkunde. In: Schwartze H (Ed.) *Handbuch der Ohrenheilkunde*, FCW Vogel, Leipzig, Germany, p. 67-68.
- Meyerhoff WL, Shea DA, Giebink GS (1980) Experimental pneumococcal otitis media. A histopathologic study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 88: 606-612.
- Michaels L (1987) Ear, nose and throat histopathology. Springer Verlag Berlin Heidelberg, Germany p. 41-42.
- Mirislizai E, Benedeczkzy I (1978) The ultrastructure of the round-window membrane of the cat. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 40: 111-119.
- Möller P (1981a) Tympanosclerosis of the eardrum in cleft palate patients. A prospective clinical study. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 91: 91-94.
- Möller P (1981b) Tympanosclerosis of the ear drum. A scanning electronmicroscopic study. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 91: 215-221.

- Molstad S, Eriksson M, Asplund R, Holm S, Hellström S, Prellner *et al.* (2000) Behandling av akutöroninflammation hos barn—Konsensusuttalande. In: Landstingsförbundet, Medicinska forskningsrådet och Socialstyrelsen i samverkan, AB C O Ekblad & Co, Västervick, Sweden (ISSN: 021-6881) p. 1-24.
- Mondain M, Ryan A (1994) Effect of fibroblast growth factor on normal tympanic membrane. *Am J Otolaryngol* 15: 344-350.
- Monobe H, Ishibashi T, Nomura Y, Shinogami M, Yano J (2003) Role of respiratory viruses in children with acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 67: 801-806.
- Monteiro L, Acosta L, Calado V (1999) Contribuição para o estudo da prevalência bacteriana da otite média aguda da criança em Portugal. *Rev Port ORL* 37: 193-200.
- Morgan WC (1977) Tympanosclerosis. *Laryngoscope* 87; 1821-1825.
- Morizono T, Giebink S, Paparella MM, Sikora MA, Shea D (1985) Sensorineural hearing loss in experimental purulent otitis media due to *Streptococcus pneumoniae*. *Arch Otolaryngol* 111: 794-8.
- Morizono T, Sikora MA (1982) The ototoxicity of topically applied povidone-iodine preparations. *Arch Otolaryngol* 108: 210-213.
- Munker G (1981) Inner ear hearing loss in acute and chronic otitis media. *Adv Otorhinolaryngol* 27: 138-143.
- Muñoz R, Coffey TJ, Daniels CG, Dowson G, Laible G, Casal R, *et al.* (1991) Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 164: 302-306.
- Murphy TF, Bernstein JM, Dryja DM, Campagnari AA, Apicella MA (1987) Outer membrane protein and lipooligosaccharide analysis of paired nasopharyngeal and middle ear isolates in otitis media due to non-typable *Haemophilus influenzae*: pathogenetic and epidemiological observations. *J Infect Dis* 156: 723-731.
- Negri MC, Morosini MI, Loza E, Baquero F (1994) In vitro selective antibiotic concentrations of beta-lactams for penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* populations. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 12-125.

- Nomura Y (1984) Otological significance of the round window. *Adv ORL* 33: 1-162.
- Numazaki K, Umetsu M, Adachi N (2003) *Mycoplasma pneumoniae* infection and its genotypical characterization in children of Hokkaido, Japan. *In Vivo* 17: 421-424.
- Ödqvist LM (1988) Middle ear ototoxic treatment for inner ear disease. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl.* 457: S83-S86.
- Orden B, Perez-Trallero E, Montes M, Martinez R (1998) Erythromycin resistance of *Streptococcus pyogenes* in Madrid. *Pediatr Infect Dis J* 17: 470-473.
- Osen KK (1970) Course and termination of the primary afferents in the cochlear nuclei of the cat. An experimental anatomical study. *Arch Ital Biol* 108: 21-29.
- Paço J (2003) Doenças do tímpano. Lidel – Edições Técnicas, Lda., Lisboa, Portugal, p. 11-114.
- Paparella MM, Sugiura S (1967) The pathology of suppurative labyrinthitis. *Ann Otolaryngol* 67: 554-586.
- Paparella MM, Brady DR, Hoel R (1970) Sensorineural hearing loss in chronic otitis media and mastoiditis. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 74: 108-115.
- Paparella MM, Oda M, Hiraide F, Brady D (1972) Pathology of sensorineural hearing loss in otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 81: 632-47.
- Paparella MM, Goycoolea MV, Meyerhoff WL, Shea D (1979) Endolymphatic hydrops and otitis media. *Laryngoscope* 89: 43-54.
- Paparella MM, Goycoolea MV, Meyerhoff WL (1980) Inner ear pathology and otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 89: S249-S253.
- Paparella MM (1981) Insidious labyrinthine changes in otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 92: 413-520.
- Paparella MM, Schachern PA, Yoon TH (1988) Survey of interactions between middle ear and inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 457: S9-S24.
- Paparella MM, Schachern PA (1994) New developments in treating otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 163: S7-S12.

- Paradise JL, Bluestone CD, Rogers KD, Taylor FH, Colborn DK, Bachman RH *et al.* (1990) Efficacy of adenoidectomy for recurrent otitis media in children previously treated with tympanostomy-tube placement. Results of parallel randomized and nonrandomized trials. *JAMA* 263: 2066-2073.
- Paradise JL (1992) Antimicrobial prophylaxis for recurrent acute otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 155: S33-S36.
- Paradise JL (1995) Mannaging otitis media. A time for change. *Pediatrics* 96: 712-715.
- Parker AJ, Maw AR, Powell JE (1990) Intra-tympanic membrane bleeding after grommet insertion and tympanosclerosis. *Clin Otolaryngol* 15: 203-207.
- Paula-Barbosa MM, Sousa-Pinto A (1973) Auditory cortical projections to the superior colliculus in the cat. *Brain Res* 50: 47-61.
- Paula-Barbosa MM, Foyo PB, Sousa-Pinto A (1975) The association connexions of the suprasylvian fringe (SF) and other areas of the cat auditory cortex. *Exp Brain Res* 23: 535-554.
- Pichichero ME, Berghash LR, Hengerer AS (1989) Anatomic and audiologic sequelae after tympanostomy tube insertion or prolonged antibiotic therapy for otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 8: 780-787.
- Pichichero ME, Casey JR (2002) Otitis media. *Expert Opin Pharmacother* 3: 1073-1090.
- Pichichero ME (2003) Diagnosis accuracy of otitis media and tympanocentesis skills assessment among pediatricians. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 519-524.
- Pickles JO (1987) Physiology of the ear. In: Kerr A, Groves J, Wright D (Eds.) *Scott-Brown's Otolaryngology* 5<sup>th</sup> Ed., Butterworth Intl. Ed., London, U.K., p. 47-80.
- Pickles JO (1992) *An Introduction to the Physiology of Hearing*. 2<sup>nd</sup> ed., Harcourt-Brace-Jovanovich Publishers, New York, NY, p. 12-25.
- Pitkäranta A, Virolainen A, Jero J, Arruda E, Hayden FG (1998) Detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus infections in acute otitis media by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Pediatrics* 102: 291-295.

- Pohlman AG (1938) Objections to the accepted interpretation of cochlear mechanics. *Acta Otolaryngol* 26: 162-168.
- Politzer A (1883) A textbook of the disease of the ear and adjacent organs. Lea & Brothers, Philadelphia, PN.
- Politzer A (1898) *La Dissection Anatomique et Histologique de l'Organe Auditif de l'Homme*. Octave Doin Éditeurs, Paris, France.
- Pontes C, Reis FF, Sousa-Pinto A (1975) The auditory cortical projections onto the medial geniculate body of the cat. An experimental anatomic study with silver and autoradiographic methods. *Brain Res* 101: 345-363.
- Post J, Preston M, Aul J, Larkins-Pettigrew M, Rydquist-White J, Anderson KW *et al.* (1995) Molecular analysis of bacterial pathogens in otitis media with effusion. *JAMA* 273: 1598-1604.
- Proud GO, Mittlebaum H, Siden GD (1968) Ototoxicity of topically applied chloranfenicol. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 87: 580-587.
- 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.
- Pukander J, Luotonen J, Sipila M (1982) Incidence of acute otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 93: 447-453.
- Pukander J, Sipilä M, Karma P (1984) Occurrence and risk factors in acute otitis media. In: Lim DJ, Bluestone CD, Klein JO, Nelson JD (Eds.) *Proceedings of the Third International Symposium on Recent Advances in Otitis Media with Effusion*. B.C. Decker, Philadelphia, PN, p. 9-12.
- Pukander J, Luotonen J, Timonen, Karma P (1985) Risk factors affecting the occurrence of acute otitis media among 2-3-year-old urban children. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 100: 260-265.
- Qvarnberg Y (1981) Acute otitis media. A prospective clinical study of myringotomy and antimicrobial treatment. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 375:1-75.
- Rahm We, Stother WF, Gullick WL (1959) The effects of topical anesthetics upon the ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 68: 1037-1046.
- Roark R, Berman S (1997) Continuous twice daily or once daily amoxicillin prophylaxis compared with placebo for children with recurrent acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 16: 376-381.

- Rose JE, Galambos R, Hughes J (1960) Organization of frequency sensitive neurons in the cochlear nuclear complex of the cat. In: Rasmussen GL, Windle WF (Eds.) Neural mechanisms of the auditory and vestibular systems. Charles C. Thomas Publishers, Springfield, IL, p. 45-67.
- Rosenfeld RA (1996) An evidence-based approach to treating otitis media. *Pediatr Clin N Am* 43: 1165-1181.
- Rosenfeld RM, Bluestone CD (2003) Evidence-Based Otitis Media. 2<sup>nd</sup> ed. B.C. Decker Inc, Hamilton, Ontario, p. 85-103
- Rosenfeld RM, Vertrees JE, Carr J, Cipolle RJ, Uden DL, Giebink, *et al.* (1994) Clinical efficacy of antimicrobials drugs for acute otitis media: metaanalysis of 5400 children from thirty-three randomized trials. *J Pediatr* 1994; 124: 355-367.
- Rossi F, Bellavite P, Berton G, Grzeskowiak M, Papini E (1985) Mechanism of production of toxic oxygen radicals by granulocytes and macrophages and their function in the inflammatory process. *Path Res Pract* 180: 136-142.
- Rothman R, Owens T, Simel DL (2003) Does this child have acute otitis media? *JAMA* 290: 1633-1640.
- Ruah C, Penha R, Schachern P, Paparella M (1995) Tympanic membrane and otitis media. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 49: 173-80.
- Ruah CB, Barros E, Ruah SB, Penha RS, Schachern PA, Paparella MM (1992) Paediatric otoscopy – clinical and histological correlation. *J. Laryngol Otol* 106: 307-312.
- Ruah CB, Schachern PA, Zeltermann D, Paparella MM, Yoon TH (1991) Age-related morphologic changes in the human tympanic membrane. A light and electron microscopic study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117: 627-634.
- Ruah MC (1992) Evolução pós-natal da membrana do tímpano humana normal e patológica. Implicações clínicas e epidemiológicas. Tese. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Ruiz-Diaz AI, Martín F, Garitagoitia AB, Román CD, Miguel MJ, Andrés CB (2002) Mastoiditis aguda: una entidade emergente. *An Esp Pediatr* 57: 427-431.
- Russel F, Mulholland K (2002) Prevention of otitis media by vaccination. *Drugs* 62: 1441-1445.

- Sadé J (1966) Middle ear mucosa. Arch Otolaryngol 84: 137-143.
- Sahm DF, Jones ME, Hickey ML, Diakun DR, Mani S, Thornsberry C (2000) Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated in Asia and Europe, 1997-1998. J Antimicrob Chemother 45: 457-466.
- Sahni RS, Paparella MM, Schachern PA, Goycoolea MV, Le CT (1987) Thickness of the human round window membrane. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 113: 630-634.
- Sarkkinen H, Ruuskanen O, Meurman O, Puhakka H, Virolainen E, Eskola J (1985) Identification of respiratory virus antigens in middle ear fluids of children with acute otitis media J Infect Dis 151: 444-448.
- Sato K (1997) Experimental otitis media induced by nonviable *Moraxella catarrhalis* in guinea pig model. Auris Nasus Larynx 24: 233-238.
- Saukkoriipi A, Palmu A, Kilpi T, Leinonen M (2002) Real-time quantitative PCR for detection of *Streptococcus pneumoniae* in the middle ear fluid of children with acute otitis media. Mol Cell Probes 16: 385-390.
- Saunders WH, Paparella MM (1968) Atlas of Ear Surgery. Mosby Co., St. Louis, MO, p. 1.
- Scarpa A (1772) De structura fenestra rotunda auris, et de tympano secundario anatomicae observations. Apud Societatum Typographicam, Mutinae (traduzido e editado por Sellers LM & Anson BJ) Arch Otolaryngol 1962; 75: 2-45.
- Schachern PA, Paparella MM, Duvall AJ (1982) The normal chinchilla round-window membrane. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 108: 550-554.
- Schachern PA, Paparella MM, Duvall AJ, Choo YB (1984) The human round window membrane. Arch Otolaryngol 110: 15-21.
- Schachern PA, Paparella MM, Goycoolea MV, Duvall AJ, Choo YT (1987) The permeability of the round window membrane during otitis media. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 113: 625-629.
- Schappert S (1992) Office visits for otitis media: United States, 1975-90. Adv Data 214: 1-19.
- Schiff M, Poliquin JF, Cantazaro A, Ryan AF (1980) Tympanosclerosis. A theory of pathogenesis. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl 89: S1-S16.



- Schmidt SE, Hellström SO (1991) Tympanic membrane structure – new views. A comparative study. *ORL* 53: 32-36.
- Schrapnell HJ (1832) On the form and structure of the membrana tympani. *London Med Gazzette* 10: 120-124.
- Schuknecht H (1953) Techniques for study of cochlear function and pathology in experimental animals. Development of the anatomical frequency scale for the cat. *Arch Otolaryngol* 58: 377-397.
- Schuknecht H (1957) Ablation therapy in the management of Ménière's disease. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl.* 132: S1-S62.
- Schuknecht HF (1993) *Pathology of the Ear*, 2<sup>a</sup> ed., Lea & Febiger, Malvern, PN, p. 191-253.
- Schwartz R, Rodriguez W, Grundfast K (1984) Duration of middle ear effusion after acute otitis media. *Pediatr Infect Dis* 3: 204-207.
- Secondi U (1951) Structure and function of the lamina propria of the tympanic membrane in various animals. *Arch Otolaryngol (Chicago)* 53: 170-177.
- Seidman M, Babu S, Tang W, Naem E, Quirk WS (2003) Effects of resveratrol on acoustic trauma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 129: 463-470.
- Seppälä H, Klaukka T, Vuopi-Varkila J, Muotiala A, Helenius H, Lager K, *et al.* (1997) The effects of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A *Streptococci* in Finland. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. *New Engl J Med* 337: 441-446.
- Shaw EA (1974) The external ear. In: Keidel WD, Neff WD (Eds.) *Handbook of Sensory Physiology*, vol. 5, Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 455-490.
- Shimada T, Lim DJ (1971) The fiber arrangement of the human tympanic membrane. A scanning electron microscopic observation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 80: 210-217.
- Shurin PA, Pelton SI, Donner A, Klein JO (1979) Persistence of middle ear effusion after acute otitis media in children. *N Engl J Med* 300: 1121-1123.
- Silveira H, Spratley JE, Lunet N, Pais-Clemente M (2003) Epidemiologia da otite média aguda nos primeiros 18 meses de vida. *Acta Pediatr Port* 34: 327-332.
- Silverstein H (1999) Use of a new device, the MicroWick, to deliver medication to the inner ear. *Ear Nose Throat J* 78: 595-600.

- Sipilä M, Pukander J, Karma P (1987) Incidence of acute otitis media up to the age of 1<sup>1/2</sup> years in urban infants. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 104: 138-145.
- Slack RWT, Maw AR, Capper JWR, Kelly S (1984) Prospective study of tympanosclerosis-developing after grommets. *J Laryngol Otol* 98: 771-774.
- Smith BM, Meyers MG (1975) The penetration of gentamycin and neomycin into perilymph across the round window membrane. *Otolaryngol Head Neck Surg* 87: 888-891.
- Sörensen H, True O (1971) Histology of tympanosclerosis. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 73: 18-26.
- Sousa-Pinto A (1974) Cortical projections of the medial geniculate body of the cat. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 48: 81-89.
- Spratley J, Pais-Clemente M. (1989) Estudo ultraestrutural da crista ampular do rato. *Rev Port ORL* 27: 347-356.
- Spratley J, Silveira H, Alvarez I, Pais-Clemente M (2000) Acute mastoiditis in children: review of the current status. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 56: 33-40.
- Spratley J, Pais-Clemente M (2003) Intra- and Extra-Temporal Bone Complications of Otitis Media. In: Paparella M, DeSouza C, Sperling N (Eds.) *Atlas of Otitis Media*, Bhalani Publishing House, Mumbai, India (no prelo).
- Stasche N, Foth HJ, Hörmann K, Baker A, Huthoff C (1994) Middle ear transmission disorders – tympanic membrane vibration analysis by laser-doppler-vibrometry. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 114: 59-53.
- Stecker RH, Cody DT (1966) Iontophoresis of Na<sup>22</sup> and I<sup>131</sup> into the inner ear. *Arch Otolaryngol* 83: 45-49.
- Steele R, Suskind-Liu D (2000) Withholding antibiotics, short-course therapy and delayed therapy. In: Steele R and Suskind-Liu D (Eds.) *Contemporary Diagnosis and Management of Otitis Media*, Handbooks and Health Care Co., Newtown, PN, p. 105-119.
- Stewart TJ, Belal A (1981) Surgical anatomy and pathology of the round window. *Clin Otolaryngol* 6: 45-62.
- Stinson WD (1936) Reparative process in the membrana tympani. *Arch Otolaryngol* 24: 600-606.
- Stool SE, Field MJ (1989) The impact of otitis media. *Pediatr Infect Dis J* Suppl.1: S11-S14.

- Su W-Y, Marion MS, Hinojosa R, Matz GJ (1982) Anatomical measurements of the cochlear aqueduct, round window membrane, round window niche and facial recess. *Laryngoscope* 92: 483-486.
- Szucs E, Diependaele R, Clement P (1995) The accuracy of tympanometry assessed by its sensitivity and specificity. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 49: 287-292.
- Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H (1987) Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase. A selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 256: 677-686.
- Tano K, Hakansson EG, Holm SE, Hellström S (2002) Bacterial interference between pathogens in otitis media and alpha-haemolytic *Streptococci* analysed in an in vitro model. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 122: 78-85.
- Tarkin IS, Henry TJ, Fey PI, Iwen PC, Hinrichs SH, Garvin KL (2003) PCR rapidly detects methicillin-resistant staphylococci periprosthetic infection. *Clin Orthop* 414: 89-94.
- Teele D, Klein J, Rosner B, Greater Boston Otitis Media Study Group (1989) Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: a prospective, cohort study. *J Infect Dis* 160: 83-94.
- Teele DW, Klein JO, Rosner BA (1980) Epidemiology of otitis media in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 89: S5-S6.
- Tong HH, Fischer LM, Kosunick GM, DeMaria TF (2000) Effect of adenovirus type 1 and influenza A virus on *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal colonization and otitis media in the chinchilla. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109: 1021-1027.
- Tos M, Bak-Pedersen K (1976) Goblet cell population in the normal middle ear and Eustachian tube of children and adults. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 25: S44-S50.
- Tos M, Bonding P, Poulsen G (1983) Tympanosclerosis of the eardrum in secretory otitis media after insertion of grommets. A prospective, comparative study. *J Laryngol Otol* 97: 489-496.
- Tos M (1988) Sensorineural hearing loss in acute and chronic middle ear diseases. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl.* 457: S87-S93.
- Tos M, Stangerup SE (1989) Hearing loss in tympanosclerosis caused by grommets. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 115: 931-935.

- Tos M, Cayé-Thomasen P (2002) Mucous glands in the middle ear – what is known and what is not. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 64: 86-94.
- Trigueiros-Cunha N, Renard N, Humbert G, Tavares MA, Eybalin M (2003) Catecholamine-independent transient expression of tyrosine hydroxylase in primary auditory neurons is coincident with the onset of hearing in the rat cochlea. *Eur J Neurosci* 18: 2653-2662.
- Turner D, Leibovitz E, Aran A, Piglansky L, Raiz S, Leiberman A, *et al.* (2002) Acute otitis media in infants younger than two months of age: microbiology, clinical presentation and therapeutic approach. *Pediatr Infect Dis J* 21: 669-674.
- Uddman R, Grunditz T, Larsson A, Sundler F (1988) Sensory innervation of the eardrum and middle ear mucosa. Retrograde tracing and immunocytochemistry. *Cell Tissue Res* 252: 141-146.
- van Buchem FL (1987) Antibiotics for otitis media? *J R Coll Gen Pract* 37: 367-371.
- van Buchem FL, Dunk JH, van't Hof MA (1981) Therapy of acute otitis media: myringotomy, antibiotics or neither? A double blind study in children. *Lancet* 8252: 883-887.
- van Cauwenberge PB (1984) Relevant and irrelevant predisposing factors in secretory otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 414: 147-153.
- van Zuijlen DA, Schilder AG, van Balen FA, Hoes AW (2001) National differences in incidence of acute mastoiditis: relationship to prescribing patterns of antibiotics of acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 20: 104-44.
- Virolainen A, Salo P, Jero J, Karma P, Eskola J, Leinonen M (1994) Comparison of PCR assay with bacterial culture for detecting *Streptococcus pneumoniae* in middle ear fluid of children with acute otitis media. *J Clin Microbiol* 32: 2667-2670.
- von Békésy G (1941) Über die Messung der Schwingungamplitude der Gehörknöchelchen mittels einer kapazitiven Sonde. *Akutische Zeitschrift* 6: 1-16.
- von Békésy G (1980) Vibration of the cochlear partition in preparations and models. In: Wever EG (Ed.) *Experiments in Hearing*. McGraw-Hill Intl. Book Co., New York, NY, p. 429-446.

- von Haller GE (1760) In: Epistolae ad Hallerum scriptae, Paris, France, vol. IV: p. 320.
- von Trölsch (1869) Handbuch der Ohrenheilkunde. Leipzig, Germany.
- von Unge M (1994) Mechanical properties of the tympanic membrane. An experimental study. Medical Dissertation, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden, paper V, p. 1-11.
- Wajnberg J (1987) The true shape of the tympanic membrane. J Laryngol Otol 101: 538-541.
- Wersäll J, Lundquist PG, Bjorkroth B (1969) Ototoxicity of gentamicin. Infect Dis 119: 410-415.
- Widemar L, Hellström S, Schultzberg M, Stenfors LE (1985) Autonomic innervation of the tympanic membrane. An immunocytochemical and histofluorescence study. Acta Otolaryngol (Stockh) 100: 58-65.
- Widemar L, Hellström SO, Stenfors LE, Bloom GD (1986) An overlooked site of tissue mast cells. The human tympanic membrane. Implications for middle ear affections. Acta Otolaryngol (Stockh) 102: 391-395.
- Witte MC, Kasperbauer JL (2000) Round window membrane permeability to transforming growth factor-alpha: an in vitro study. Otolaryngol Head Neck Surg 123: 91-96.
- Wright A (1987) Anatomy and ultrastructure of the human ear. In: Kerr A, Groves J, Wright D (Eds.) Scott-Brown's Otolaryngology 5<sup>th</sup> Ed., Butterworth Intl. Ed., London, U.K., vol. 1, p. 1-46.
- Yagupsky P, Porat N, Fraser D, Prsjgord F, Merires M, McGee L, *et al.* (1998) Acquisition, carriage, and transmission of *pneumococci* with decreased antibiotic susceptibility in young children attending a day care facility in southern Israel. J Infect Dis 177: 1003-1012.
- Yang GS, Song HT, Keithley WM, Harris JP (2000) Intratympanic immunosuppressives for prevention of immune-mediated sensorineural hearing loss. Am J Otol 21: 499-504.
- Yeo SW, Kim SW, Suh BD, Cho SH (2000) Effects of platelet-derived growth factor-AA on the healing process of tympanic membrane perforation. Am J Otolaryngol 21: 153-60.

Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M (2003) Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60: 6-20.

Zimmerman DR, Allegra JR, Cody RP (1998) The epidemiology of pediatric visits to New Jersey general emergency departments. *Pediatr Emerg Care* 14: 112-115.

Zöllner F (1956) Tympanosclerosis. *J Laryngol Otol* 70: 77-85.

# Publicações

---

---

# Publicação I

---

*Audiometric thresholds in acute otitis media*

In: Recent Advances in Otitis Media, 1997, p. 362-364.



## Audiometric thresholds in acute otitis media

Jorge Spratley, M.D., Carla Moura, M.D., Victor Cardoso, M.D.,

Henrique Barros, M.D., Ph.D., and Manuel Pais-Clemente, M.D., Ph.D.

Otitis media (OM) is one of the commonest illnesses of childhood, accounting for almost half of the antibiotics prescribed for children under 10 years of age.<sup>1</sup> There is controversy regarding the effects of acute otitis media (AOM) on hearing, in relation to both long-term results<sup>2,3</sup> and sensorineural hearing loss (SNHL).<sup>4,5</sup> Several histopathologic<sup>6,7</sup> and electrophysiologic<sup>8</sup> studies suggest the interaction of pathologic events between the middle and inner ear structures in OM.

The present study was undertaken to evaluate pure-tone hearing thresholds (conventional air and bone audiometry), on a selected group of 5- to 15-year-olds with unilateral AOM; to examine bone conduction features as indicators of inner ear function; and to compare clinical findings with audiometric evolution.

### Methods

The study sample was selected from 968 children with AOM treated at the outpatient clinic of the Department of Otolaryngology, Hospital S. João, University of Oporto Medical School, between September 1994 and February 1995. A diagnosis of AOM was considered when the child had suggestive findings on pneumatic otoscopy and at least one of the following acute symptoms or signs: otalgia, hearing loss, fever, irritability, vomiting, diarrhea, or other upper respiratory infection. Positive otoscopic findings consisted of: distinct redness, outward bulging, and decreased mobility of the tympanic membrane.

Only those patients between 5 and 15 years old with unilateral AOM, an intact tympanic membrane, and no previous history of AOM were included in the study. The normal contralateral ear was used as a control. A flat tympanogram (EVE-II Tympanometer) on the affected ear, and a normal tympanogram on the contralateral ear helped to confirm the diagnosis.

On days 0, 15, and 30, all selected patients underwent routine otomicroscopy (Zeiss-Universal S2), pneumatic otoscopy, and conventional pure-tone audiometry (air conduction: 0.125, 0.250, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 kHz; bone conduction: 0.250, 0.5, 1, 4, 6, 8 kHz) performed in a double-walled silent chamber with a Hortmann CA540CD audiometer, calibrated by standard methods (ANSI S3.6, 1989; ANSI S 3.26, 1981). Each patient was treated for a 10-day period with a combination of amoxicillin/clavulanic acid (50 mg/kg t.i.d.), nasal saline washes, and 5 days of ibuprofen (20 mg/kg t.i.d.).

The statistical significance of the results was tested using the chi-square test, and Mann-Whitney (2 groups)

or Kruska-Wallis (more than 2 groups) test for unpaired samples, as appropriate. Means of differences between the AOM ear and the control ear were compared using the Student's t-test for paired samples. Results are presented as the mean  $\pm$  standard deviation.

### Results

From a total of 968 observed cases, 39 (4%) fulfilled the selection criteria. Seven patients discontinued the follow-up program without notice, and were considered drop outs, leaving 32 patients that completed the study. There was a slight predominance of males (56.3%). The age distribution (Fig. 1) shows that 25 (81.3%) cases fell into the 5- to 9-year-old range. The average was  $7.7 \pm 2.7$  years. Left ear cases were slightly more common (56.2%).

All patients presented with otalgia that subsided after  $1.3 (\pm 0.5)$  days. Complaints of hearing loss persisted for a mean of 8.3 days (minimum 3 days, maximum 16 days). No patients presented vestibular symptoms. Four cases exhibited minor adverse effects from the medication (vomiting 2, loose stools 2), that did not justify discontinuance of therapy. Two patients needed extra observation on day 2 due to the appearance of otorrhea. The subsequent otoscopy on day 15 showed healed tympanic membranes. During scheduled follow up examinations, 11 ears (34%) presented with otitis media with effusion (OME) on day 15, and 2 ears (6%) on day 30.

The audiometric analysis revealed a continuous improvement on all three observation days, using both air conduction (AC) and bone conduction (BC) on the af-

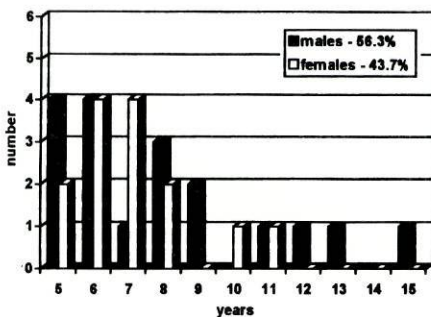


Figure 1 Age and sex distribution (n = 32).

**Table 1** Mean and SD of air and bone conduction hearing thresholds (dB hearing loss) on the AOM ear

	Frequency kHz							
	0.125	0.250	0.5	1	2	4	6	8
<b>Air</b>								
Day 0	28 ± 9.4	27.3 ± 9.6	26.7 ± 9.4	26.4 ± 9.7	20.9 ± 5.5	26.7 ± 10.9	29.4 ± 10.6	30.6 ± 12.4
Day 15	18.8 ± 4.6	18.0 ± 4.9	18.0 ± 5.1	18.0 ± 6.3	14.5 ± 5.3	17.2 ± 7.3	19.2 ± 6.7	21.1 ± 7.4
Day 30	14.8 ± 4.3	14.2 ± 4.6	14.1 ± 6.1	13.0 ± 5.1	9.7 ± 5.2	11.3 ± 5.1	13.3 ± 4.7	14.5 ± 5.6
<b>Bone</b>								
Day 0	—	3.1 ± 5.4	3.6 ± 5.9	4.5 ± 6.1	7.1 ± 6.1	12.8 ± 9.5	15.3 ± 10.3	15.3 ± 10.3
Day 15	—	2.3 ± 4.2	3.1 ± 4.9	3.4 ± 6.3	5.1 ± 6.0	8.4 ± 6.3	8.9 ± 6.3	8.9 ± 6.3
Day 30	—	1.7 ± 3.0	1.7 ± 3.9	1.4 ± 4.4	3.2 ± 4.9	5.0 ± 3.8	5.9 ± 4.1	5.8 ± 4.6

fectured ear. A downward slope of the mean BC was noticed above 4 kHz (Table 1). On the first audiogram, all the patients showed poorer thresholds in the AOM ear than in the control ear, with a few exhibiting a pronounced difference. Although the magnitude of the interaural difference between the threshold means was variable, its presence was consistent and therefore statistically significant throughout the studied frequency ranges (0.125 to 8 kHz). The difference was, however, less evident at 2 kHz. This was still true on day 15 and on day 30 for some frequencies. The interaural difference of the mean BC thresholds was more prominent at frequencies 4, 6, and 8 kHz (Table 2). When considering the interaural AC differences, 41.8 percent of the patients had a value between 10 and 20 dB, in at least one frequency, and 38 percent had a difference greater than 20 dB. On day 15, the gap between the mean BC and AC thresholds was considerably reduced. However, 11 patients (34%) presented with otitis media with effusion (OME). On day 30, only 2 patients (6%) persisted with effusion. As a rule,

the mean AC threshold was worse on the first and subsequent examinations in those cases that showed OME on day 15 (Table 3).

### Discussion

Selecting unilateral AOM cases made it possible to use the normal contralateral ear as a control, thus reducing interindividual variables such as genetics, sex, ototoxic effects of medication, and environmental factors.

Children 5 to 15 years old have a relatively high prevalence of AOM,<sup>9</sup> and are at the same time able to cooperate in behavioral examinations such as pure-tone audiometry. The test-retest variability of this examination is generally considered to be ± 5 dB at any frequency.<sup>10</sup> The reliability of the test could increase the difficulty to obtain significant differences when studying a small sample. However, the use of the contralateral ear as a control added power to the statistical analysis performed.

The therapeutic regimen selected for this study was justified by the reported good results for AOM (including

**Table 2** Mean, SD and statistical significance (*p*, Student's *t*-test for paired samples) of the interaural differences in air and bone conduction thresholds (dB hearing loss) between OM and non-OM ears

	Frequency kHz							
	0.125	0.250	0.5	1	2	4	6	8
<b>Air</b>								
Day 0	15.3 ± 8.8 ( <i>p</i> < .00001)	14.8 ± 9.1 ( <i>p</i> < .00001)	15.8 ± 9.1 ( <i>p</i> < .00001)	17.2 ± 7.8 ( <i>p</i> < .00001)	11.3 ± 6.6 ( <i>p</i> < .00001)	16.7 ± 10.8 ( <i>p</i> < .00001)	17.0 ± 10.8 ( <i>p</i> < .00001)	18.0 ± 12.2 ( <i>p</i> < .00001)
Day 15	6.4 ± 6.4 ( <i>p</i> < .00001)	6.3 ± 5.4 ( <i>p</i> < .00001)	6.9 ± 5.0 ( <i>p</i> < .00001)	9.4 ± 5.2 ( <i>p</i> < .00001)	6.4 ± 4.6 ( <i>p</i> < .00001)	9.5 ± 5.9 ( <i>p</i> < .00001)	9.1 ± 5.1 ( <i>p</i> < .00001)	9.2 ± 5.6 ( <i>p</i> < .00001)
Day 30	3.9 ± 5.0 ( <i>p</i> = .0003)	3.8 ± 4.8 ( <i>p</i> = .0002)	4.5 ± 5.1 ( <i>p</i> = .0001)	6.9 ± 4.5 ( <i>p</i> < .00001)	2.1 ± 3.4 ( <i>p</i> = .01)	3.6 ± 3.2 ( <i>p</i> < .00001)	5.2 ± 4.1 ( <i>p</i> < .00001)	4.8 ± 4.1 ( <i>p</i> < .00001)
<b>Bone</b>								
Day 0	—	2.3 ± 4.4 ( <i>p</i> = .005)	1.3 ± 4.4 ( <i>p</i> = .115)	2.7 ± 4.4 ( <i>p</i> = .002)	3.8 ± 4.6 ( <i>p</i> = .0002)	9.5 ± 8.3 ( <i>p</i> < .00001)	10.6 ± 9.2 ( <i>p</i> < .00001)	10.6 ± 9.2 ( <i>p</i> < .00001)
Day 15	—	1.1 ± 3.0 ( <i>p</i> = .047)	1.4 ± 4.3 ( <i>p</i> = .068)	1.1 ± 5.0 ( <i>p</i> = .227)	1.7 ± 3.9 ( <i>p</i> = .018)	5.5 ± 3.9 ( <i>p</i> < .00001)	5.3 ± 4.6 ( <i>p</i> < .00001)	5.3 ± 4.6 ( <i>p</i> < .00001)
Day 30	—	1.4 ± 2.6 ( <i>p</i> = .005)	0.6 ± 4.0 ( <i>p</i> = .617)	1.4 ± 3.6 ( <i>p</i> = .035)	2.4 ± 3.4 ( <i>p</i> = .0007)	2.5 ± 2.5 ( <i>p</i> < .00001)	2.7 ± 2.5 ( <i>p</i> < .00001)	2.5 ± 2.8 ( <i>p</i> < .00001)

Table 3 Mean and SD for air conduction hearing thresholds on ears presenting OM with effusion (OME) on day 15 and those without OME (non-OME) on the same day

		Frequency kHz							
		0.125	0.250	0.5	1	2	4	6	8
Air									
Day 0	non-OME	24.8 ± 6.4	23.6 ± 6.4	22.6 ± 6.0	21.9 ± 6.0	18.8 ± 4.7	23.1 ± 9.4	26.2 ± 10.0	26.9 ± 12.2
	OME	34.1 ± 11.4 (p = .013)	34.5 ± 10.8 (p = .002)	34.5 ± 9.9 (p = .0003)	35.0 ± 9.7 (p = .0002)	25.0 ± 4.5 (p = .003)	33.6 ± 10.5 (p = .006)	35.5 ± 9.3 (p = .007)	37.7 ± 9.6 (p = .003)
Day 15	non-OME	17.1 ± 4.1	16.2 ± 4.4	15.7 ± 3.6	15.0 ± 4.5	13.1 ± 4.9	15.2 ± 6.8	16.7 ± 6.0	18.3 ± 6.8
	OME	21.8 ± 4.0 (p = .006)	21.4 ± 3.9 (p = .002)	22.3 ± 4.7 (p = .0006)	23.6 ± 5.5 (p = .0003)	17.3 ± 5.2 (p = .037)	20.9 ± 7.0 (p = .038)	24.1 ± 5.4 (p = .003)	26.4 ± 5.5 (p = .0004)
Day 30	non-OME	13.3 ± 3.7	12.4 ± 3.4	11.2 ± 4.2	11.0 ± 3.7	7.7 ± 4.1	9.5 ± 5.0	11.7 ± 4.8	12.4 ± 4.6
	OME	17.7 ± 4.1 (p = .007)	17.7 ± 4.7 (p = .002)	19.5 ± 5.7 (p = .0004)	16.8 ± 5.1 (p = .002)	13.6 ± 5.0 (p = .002)	14.5 ± 3.5 (p = .006)	16.4 ± 2.3 (p = .004)	18.6 ± 5.0 (p = .002)

those with involvement of beta-lactamase-producing bacteria). It also permitted us to standardize the possible adverse effects of medication. Although this was not the main objective of the study, the present results confirmed the effectiveness of the therapy used, with a quick recovery from symptoms.

The proportion of cases with residual OME on day 30 (6%) is close to that observed in other studies.<sup>4</sup> The patients evidencing OME on day 15 had significantly poorer mean thresholds at all frequencies on day 0, compared with those ears without OME on day 15. Although the present data were obtained in a small cohort of patients, this fact could have clinical importance in that it might predict a higher risk of OME in patients with a poorer audiogram on day 0. In contrast to others,<sup>3,4</sup> this study revealed poorer thresholds using high frequency BC (4, 6, and 8 kHz) when considering either the interaural differences, or the means of the AOM ears. The present findings are consistent with other studies that found evidence of SNHL in different types of AOM.<sup>2,12,13</sup>

The deterioration in BC above 4 kHz may be attributed to the effect of Carhart's notch<sup>14</sup> or to the short term levels of concentration in younger children. However, one cannot ignore the fact that this temporary threshold shift may also correspond to SNHL due to reversible inner ear dysfunction. This hypothesis seems very attractive since the hook of the cochlea (responsible for high frequency range) is separated from the middle ear space by the semipermeable round window membrane.

The present study might have had broader clinical relevance if extended high frequency audiometry could have been used.<sup>5</sup>

The authors thank Margarida Tavares for her invaluable help in statistical processing and M. Angelo Amorim for audiologic assistance.

## References

1. Nelson WL, Kuritsky JN, Kennedy DI, Lao CS. Out-patient pediatric antibiotic use in the US: trends and therapy for otitis media (1977-1986) (abstract 455). In: Abstracts of the 27th

Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987.

2. Neil JF, Harrison SH, Morbey RD, Robinson GA, Tate GM, Tate HT. Deafness in acute otitis media. *Brit Med J* 1966; 1: 75-79.
3. Karma P, Sipilä M, Rahko T. Hearing and hearing loss in 5-year-old children: pure-tone thresholds and the effect of acute otitis media. *Scand Audiol* 1989; 18:199-203.
4. Jeppson PH, Nylén O, Lidén G. Audiological aspects of acute otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1973; 75:439-442.
5. Margolis RH, Hunter LI, Rykken JR, Giebink GS. Effects of otitis media on extended high-frequency hearing in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993; 102:1-5.
6. Paparella MM, Oda M, Hiraide F, et al. Pathology of sensorineural hearing loss in otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1972; 81:632-647.
7. Spratley J, Schachern P, Paparella M, Yoon T, Le C. A human histopathological study on serous labyrinthitis. Personal communication at 5th International Symposium on Interactions Between the Middle Ear and the Inner Ear. Umea Sweden, 1994. *Acta Otolaryngol* (In press).
8. Morizono T, Giebink SG, Paparella MM, Sikora M, Shea D. Sensorineural hearing loss in experimental purulent otitis media due to *Streptococcus pneumoniae*. *Arch Otolaryngol* 1985; 111:794-798.
9. Pukander J, Luotonen J, Sipilä M, Timonen M, Karma P. Incidence of acute otitis media. *Acta Otolaryngol* 1982; 93:447-453.
10. Newby HA, Popelka GR. *Audiology*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall 1985.
11. Odio CM, Kusmiesz S, Nelson J. Comparative treatment trial of augmentin versus cefaclor for acute otitis media with effusion. *Pediatrics* 1985; 75(5):819-826.
12. Aviel A, Ostfeld E. Acquired irreversible sensorineural hearing loss associated with otitis media with effusion. *Am J Otolaryngol* 1982; 3:217-222.
13. Paparella MM, Brady DR, Hoel R. Sensorineural hearing loss in chronic otitis media and mastoiditis. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1970; 74:108-115.
14. Carhart RC, Hayes C. The clinical reliability of bone conduction audiometry. *Laryngoscope* 1949; 59:1084-1101.

# Publicação II

---

*Histopathologic study of serous labyrinthitis  
in human temporal bones*

Folia ORL 2000; 6: 39-46.

## HISTOPATHOLOGIC STUDY OF SEROUS LABYRINTHITIS IN HUMAN TEMPORAL BONES

Jorge E. Spratley, M.D.<sup>1,5</sup>, Patricia A. Schachern, B.S.<sup>1</sup>, Michael M. Paparella, M.D.<sup>1,3</sup>,  
Tae Yoon, M.D.<sup>4</sup>, Chap T. Le, Ph.D.<sup>2</sup>

From the University of Minnesota Otitis Media Research Center, <sup>1</sup>Department of Otolaryngology, University of Minnesota Medical School, the <sup>2</sup>Division of Biostatistics, University of Minnesota School of Public Health, the <sup>3</sup>Minnesota Ear, Head and Neck Clinic, Minneapolis, MN, and the <sup>4</sup>Asan Medical Center, Seoul, Korea and the <sup>5</sup>Department of Otolaryngology, University of Porto, Medical School, Porto, Portugal

Supported in part by NIH Grant #P01-DC-00133 from the National Institute of Deafness and Other Communicative Disorders and the International Hearing Foundation.

### ABSTRACT

Sections from 1500 human temporal bones (TB), were analyzed for a nonspecific histologic indicator, eosinophilic staining, correlations with diverse pathologic findings in the inner ear and for suggested etiopathogenesis. Excluding temporal bones with undocumented periods between death and fixation, purulent labyrinthitis or hemorrhage, or artifactual lesions, 1151 were selected. These were screened for serous labyrinthine fluid that stained eosinophilic, grouped according to presence (343 TB) or absence (808 TB) of otitis media, then subgrouped by types of otitis media, or by normality (692 TB) or presence of other conditions (116 TB) for those without otitis media. Neurosensory epithelia in inner ears was graded good, fair, poor, or bad. Two observers noted locations of endolymphatic hydrops. Serous labyrinthine fluid was evaluated in 96 TB, and also pathologic findings in the round window membrane, oval window, cochlear aqueduct, internal auditory canal, and modiolus.

Chi-square test showed no progression in serous precipitate over post-mortem time before fixation, but statistically significant degeneration in the organ of Corti. In bones with otitis media, 17.2% showed serous labyrinthine fluid, while 3.9% bones with normal middle ears showed serous fluid. Labyrinthine fluids in 60 TB stained lightly eosinophilic, 95% of that only in the basal turn. The scala tympani was the most frequent location for serous fluid in the cochlea.

Serous labyrinthitis was found to be most common in the presence of otitis media, especially in children. The 59 TB with otitis media showed 27 pathologic RWM, mostly thickened, hypervascular, and inflamed; 52 of these 59 showed eosinophilic staining in the first turn of scala tympani.

(Key words: Labyrinthitis, serous, hydrops)

### INTRODUCTION

Labyrinthine fluids can be subjected to biochemical changes in a sequence of toxic-infectious events occurring in the middle ear and meninges. Potential pathways to the inner ear have been discussed in several studies, which have described evidence of otogenic contamination through the round window membrane (RWM)<sup>1-4</sup> or the oval window (OW),<sup>5</sup> and bony erosion of the otic capsule.<sup>5</sup>

Meningogenic routes have been suggested as affecting labyrinthine fluids through the cochlear aqueduct (CA)<sup>6-10</sup> or the internal auditory canal and modiolus (IAC).<sup>7-10</sup> The endolymphatic sac and duct and the subarcuate fossa have been proposed<sup>7</sup> as passage ways, as has direct effect from the bloodstream,<sup>11</sup> but these mechanisms are not yet well explained.

When toxins reach the labyrinthine spaces without associated inflammatory cellular invasion, a diagnosis of serous (toxic) labyrinthitis can be established. The severity and possible recovery of

cochlear and/or vestibular symptoms varies, according to the extent of the pathologic event.<sup>12</sup> This is not the case in purulent labyrinthitis, where no recovery of function is usually possible.

The histopathologic hallmarks of serous labyrinthitis have been described<sup>9-13</sup> as: non-progressive endolymphatic hydrops, eosinophilic labyrinthine fluids (considered to indicate increased proteinaceous content), and serofibrinous strands in the labyrinthine spaces.

Biochemical changes in labyrinthine fluids, however, as indicated by eosin affinity, do not occur only in pathologic sequences that follow toxic infection. They have also been suggested to appear following subarachnoid hemorrhage,<sup>14</sup> with tumors that occlude the internal auditory canal,<sup>15,16</sup> transiently in fetal temporal bones maturation,<sup>17</sup> in otherwise normal temporal bones,<sup>16</sup> and consequent to post-mortem cellular autolysis and artifactual manipulation.<sup>18</sup>

The main purpose of the present histopathologic analysis of human temporal bones (TB) is to correlate findings in the inner ear with diverse pathologic conditions, in order to hypothesize possible etiopathogeneses for the appearance of eosinophilic staining in the labyrinth.

### MATERIALS AND METHODS

1500 TB fixed in 10% formalin, were embedded in celloidin, and sectioned at thicknesses of 20 $\mu$ . Every tenth section was stained with hematoxylin and eosin in the usual fashion and observed under light microscopy. TB were excluded from the study if there was an absence of data for the period between death and fixation of the bone, if features of purulent labyrinthitis or labyrinthine hemorrhage were seen, if there were labyrinthine lesions resulting from harvesting of the TB during autopsy or if there were products of hazards encountered during processing of bone, such as fractures or bubbles. The selected 1151 TB were carefully screened to detect cases with serous fluid in the labyrinth that showed eosinophilic staining.

Age, sex, cause of death, length of time between death and autopsy, pathologic conditions in the middle ear, and presence or absence of hydrops were noted for each of these 1151 TB. Groups of bones with pathologic conditions in the middle ear were divided into a group of 343 TB with otitis media (OM) and a group of 808 TB without OM. The group with OM included all cases showing evidence of inflammation in the middle ear. It was subdivided into 181 TB with acute purulent otitis media (POM) that showed effusion with polymorphonuclear neutrophils and mucosal hyperplasia, 17 TB with serous otitis media (SOM) that showed effusion without inflammatory cells, and 145 TB with chronic otitis media (COM) that showed thickened middle ear mucosa with a subepithelial layer with increased fibrous tissue and mononuclear leucocytic infiltration. The group without OM included 116 TB cases in which other conditions such as hemotympanum, persistence of embryonic mesenchyme, and neoplastic disease of the middle ear were observed, and 692 TB had normal middle ears.

Preservation of neurosensory epithelia in inner ears was graded as good, fair, poor, or bad, in the four categories of Fernandez.<sup>18</sup> Presence and location of endolymphatic hydrops was noted by at least two observers. No attempt was made to grade the degree of hydrops. The 96 TB positive for serous fluid in the labyrinth were further evaluated according to location, quality, and quantity of fluid. The TB were also evaluated for pathologic findings in the RWM, OW, CA, IAC and otic capsule.

All data were statistically analyzed using a chi-square test.

### RESULTS

From the 1151 TB, 8.3% (96 TB) demonstrated positive eosinophilic labyrinthine fluid. The remaining 1055 TB were used as controls. The 96 TB came from 77 donors, what implies 19 of these donors with bilateral positivity. There was, however, no correlation between an increase in incidence of bilateral serous fluid and increases in post-mortem time before fixation of the bone. Distribution by sex showed 65 TB from males and 31 TB from females; males predominated to a corresponding degree in this collection of TB. Concerning distribution by age, serous labyrinthine fluid was present in 33% of all fetal bones (6 TB), 21% from children below 10 years (36 TB), 7% from 11 to 20 years (6 TB), 10% from 21 to 30 years (8 TB), 11% from 31 to 40 years (8 TB), 5% from 41 to 50 years (5

TB), 4% from 51 to 60 years (10 TB), and 3% from donors above 60 years of age (17 TB).

Statistical analysis to see whether there was an increasing trend in serous precipitate correlated with increases in post-mortem time before fixation of the bone was undertaken in two ways. First, all 1151 TB were divided into hourly post-mortem intervals from one to 48 hours; this proved there was no consistent pattern of progressive increase in serous precipitate correlated with this parameter. Second, all 1151 TB were divided into roughly equal groups, those fixed before ten hours had elapsed post-mortem (590 TB), and those fixed after ten hours or more (561 TB). Although a small increase (7% to 10%) was seen in the second group over the first group, the chi-square test proved this difference to be not statistically significant ( $p > 0.05$ ). The degree of preservation of the organ of Corti in the 96 TB was statistically analyzed to detect any difference in groups fixed before (40 TB) or after ten hours post-mortem (56 TB). The status of organs of Corti under 10 hours included 6 classified as good, 16 as fair, 4 as poor, and 14 as bad. Organs of Corti harvested over 10 hours were classified as 1 good, 14 fair, 15 poor and 26 bad. The differences on the organ of Corti's degeneration associated with increase in post-mortem time was shown by the chi-square test to be statistically significant ( $p < 0.05$ ).

The incidence of TB with OM presenting serous fluid in the labyrinth was 59 (17,2%). They were distributed as follows: 37 (20,4%) showed POM, 19 (13,1%) showed COM, three (17,6%) showed SOM. Of the group with pathologic conditions other than OM, eight showed hemorrhage in the middle ear (17,3% of those presenting blood in the middle ear), two exhibited primary carcinoma in the middle ear (66% of all middle ear carcinoma) and 27 (3,9%) showed normal histologic characteristics in the middle ear and serous labyrinthitis (the majority of these subjects had some type of terminal cancer).

When compared with the 27 TB normal middle ear group, the 69 TB with abnormal middle ear findings (OM + other cond.) showed a significant association to serous labyrinthitis ( $p < 0.005$ ;  $4.36 < OR < 7.11$ ). This was also significant when compared subgroups of OM and normals (POM:  $p < 0.005$ ,  $3.62 < OR < 11.09$ ; COM:  $p < 0.005$ ,  $1.92 < OR < 7.17$ ; SOM:  $p < 0.05$ ,  $1.13 < OR < 21.32$ ).

The various types of labyrinthine fluid found were classified into two categories of quantity and three categories of quality. Of the 96 TB with eosinophilic staining of inner ear fluids, 60 TB (63%) showed a film of fluid on surfaces of scalae and 36 TB (37%) showed massive fluid, where scalae were completely filled with fluid. Labyrinthine fluids were also qualified as faint (56 TB, 58%) when fluid appeared as light and pink, reticular (33 TB, 34%) when fluid contained serofibrinous strands, and homogenous (7 TB, 8%) when fluid appeared strongly eosinophilic.

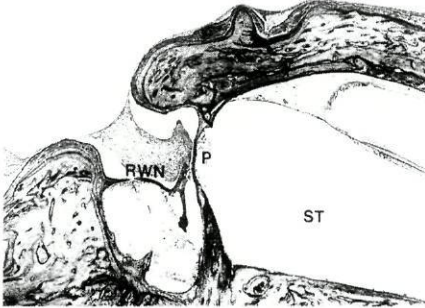
The most frequent location for serous fluid (87 TB, 91%) was the cochlear scala tympani. Of the 66 TB showing predominant fluid in the cochlear hook near the RWM, (33 POM, 16 COM, 3 SOM, 7 other conditions and 7 normals) 28 TB showed fluid exclusively there. One temporal bone showed fluid just in the second turn, 21 in the first and second turns, and 37 in all turns.

The scala vestibuli presented eosinophilic staining in 58 TB, seven with fluid in the first turn, 15 in the first and second, and 36 in all cochlear turns. 39 TB that presented fluid in the scala media, six with fluid in the first turn, one in the first and second turns, one in the third turn, and 31 had fluid in all cochlear turns. The presence of serous fluid could also be elicited in the vestibular division of the inner ear, with the following distribution: vestibule in 45 TB, saccule in 41 TB, utricle in 21 TB and 15 TB in the perilymph of semicircular canals.

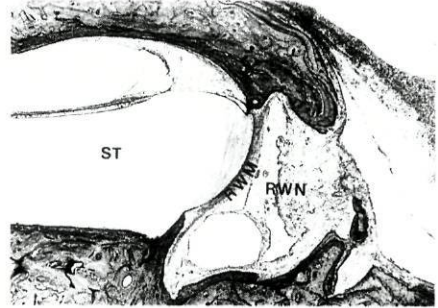
We investigated possible pathways between the middle and inner ears. Under light microscopy, 30 TB presented signs of pathological changes in the RWM, ranging from hyperplasia and metaplasia of the outer cellular layer to thickening of the membrane with increased size of vessels and increased infiltration by inflammatory cells. Only four TB showed evidence that the pathway may have been the OW: three cases had subluxation of the stapedial footplate and one had a microfissure in the annular ligament.

Of the 66 TB that showed predominant eosinophilic staining in the scala tympani near the RWM, 52 had OM (24 with pathologic conditions of the RWM [Fig. 1,2,3], and seven with pathologic conditions of the CA) and 14 had no OM but had other pathologic findings: 12 had pathologic conditions of the CA, and three had pathologic conditions of the RWM, (two had middle ear carcinoma, and

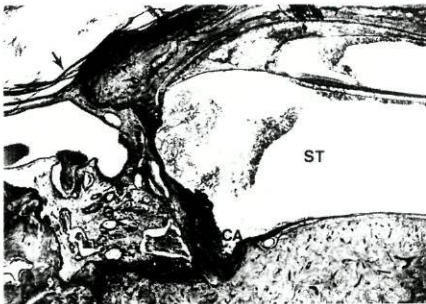
one had hemotympanum. This represents that when compared to normal RWM on light microscopy, the finding of a pathologic RWM is significantly associated with the presence of serous fluid near the RWM ( $p = 0.002, 1.97 < OR < 41.6$ ). Of the few bones with erosion of the lateral semicircular canal, only one showed serous precipitate. In the others, the erosion was sealed with fibrous and/or osseous tissue.



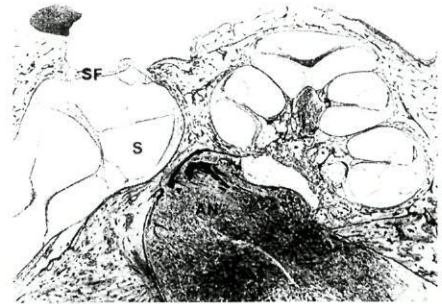
**Fig. 1.** Section through the basal turn of the cochlea with purulent effusion in the round window niche (RWN). Reticular focal precipitate (P) can be seen in the scala tympani (ST) of the cochlea. Magnification 28x.



**Fig. 2.** Section through the basal turn of the cochlea from a patient with chronic otitis media, showing the round window niche (RWN) filled with purulent fluid and granulation tissue, thickened round window membrane (RWM), and faint focal eosinophilic serous precipitate in the scala tympani (ST) of the basal turn. Magnification 28x.



**Fig. 3.** Section passing through the level of the round window membrane, from an 86-year-old patient with cholesteatomatous chronic otitis media. Note the presence of reticular focal eosinophilic serous precipitate in the scala tympani (ST). Chronic inflammatory granulation tissue (G) fills the RWN and covers the RWM. The opening of the cochlear aqueduct (CA) is filled with fluid. Note keratinous lamellae from cholesteatoma in the middle ear (arrow). Magnification 28x.



**Fig. 4.** Midmodiolar horizontal section from the left temporal bone of a patient having a voluminous acoustic neuroma (AN) of the internal auditory canal. Note presence of faint, diffuse, eosinophilic serous fluid filling all the perilymphatic spaces of the cochlea and also of the vestibule. Note evidence of endolymphatic hydrops of the saccule (S), degeneration of ganglion cells (arrows). Magnification 28x.

In the cochlear aqueduct meshwork, two TB contained pus and 17 TB contained red blood cells. 21 TB had very narrow cochlear aqueducts precluding the evaluation of their contents, and 56 TB had normal cochlear aqueducts. 43 TB had pathologic conditions in the IAC, but only 24 TB of



these were definitely intracranial conditions (16 had subarachnoid hemorrhage), three had meningitis, and five had tumors - four neurinomas [Fig. 4] and one metastatic rhabdomyosarcoma). The remaining 19 of these 43 TB were mostly infant bones that had blood in the internal auditory canal, generally considered an irrelevant histopathological finding at that age, with no clinical correlations. Only seven TB of the group with intracranial pathology had modiolary pathological changes such as pus or infiltration of extravascular red blood cells along modiolary spaces. Most TB with serous labyrinthitis showed no clear involvement of the endolymphatic duct or sac in its pathogenesis.

Finally, an investigation was carried out to determine whether those TB with serous fluid also showed significant increases in endolymphatic hydrops. A significant association was found ( $p = 0.005$ ;  $1.55 < OR < 4.40$ ). Cochlear hydrops was found in 25 TB with serous labyrinthitis: 15 apically, two in just the first and second turns, four in the second and third turns, and four in all turns. All but two TB with hydrops showed involvement of the apical turn. Two TB had saccular hydrops. No correlation was shown between specific location of serous fluid within the scalae and specific sites with hydrops.

### DISCUSSION

Serous labyrinthitis has been a controversial subject to deal with histopathologically because of the multiplicity of etiologies and the frequently short course of the clinical event. This makes it difficult to relate clinical findings in TB and also makes it difficult to argue for cause-and-effect relationships. It is easier to find cause-and-effect relationships for purulent labyrinthitis, where inflammatory cells can be detected crossing biological barriers. In serous labyrinthitis, one can only detect disease on the one hand, and serous fluid on the other. The very strict criteria used here in selecting the 96 TB with serous labyrinthitis, in which any bone presenting eosinophilic staining of the labyrinthine spaces had to be evaluated as positive by two different observers before it could be selected, gave a final percentage of 8.3% TB positive for serous labyrinthitis (out of 1151 TB), a number approximating the 7% found by Silverstein et al.<sup>6</sup> In our study there was a decreasing percentage of histological serous labyrinthitis with increase in age, that may just be related to the greater number of older TB donors in the collection. Serous fluid was more prominent in cochlear than vestibular areas, which may signify that vestibular structures are more protected from exogenous aggressions.

The authors were curious about the possibility whether serous fluid in the labyrinth could be correlated with increases in post-mortem time elapsed before fixation of the TB. This proved to be statistically not significant. On the other hand there was a statistically significant correlation between degeneration of the organ of Corti and increases in postmortem time. This led to the conclusion that the presence of serous fluid in opposition with the status of neurosensory epithelia is not dependent on postmortem degeneration. The previous statement precluded our planned evaluation of the influence of such serous fluid on the organ of Corti. The greatest degrees of degeneration of the organ of Corti, however, were confined to the basal turn of the cochlea, the same site where the majority of TB also demonstrated any serous fluid.

The basal turn of the scala tympani was by far the most frequent location with serous fluid. This might be expected because of its proximity to two of the most important pathways to the inner ear, the RWM and the CA.

The significant number of TB with pathologic RWM and serous fluid in the adjacent scala tympani when compared under light microscopy to those with normal RWM, agrees with previous studies<sup>1</sup> that found the RWM to be a primary pathway from middle to inner ear. The oval window appeared to play a role only when its structure was disrupted by traumatic lesions. Because of its anatomic location in the hypotympanum and its structure as a potential semipermeable barrier<sup>19</sup>, the RWM is much more likely to be a passageway. A recent structural study<sup>20</sup>, demonstrated that middle ear inflammatory conditions (SOM and POM) can cause alterations in the RWM ultrastructure, that may interfere with its permeability. These ultrastructural alterations may sometimes be undetectable on light microscopy.

The relatively smaller percentage of TB with COM than with POM that also demonstrated eosinophilic staining may have two explanations. First, as pointed out by Schachern et al.<sup>21</sup> in studies of the permeability of feline RWM to horseradish peroxidase, the permeability of the RWM is reduced in persistent (chronic) otitis media. Second, in very aggressive COM cases, progression of the disease to the inner ear is associated with diapedesis of inflammatory cells, which moves these cases into classification as purulent labyrinthitis (excluded from the present study).

There were fewer temporal bones with both meningitis and serous labyrinthitis than might have been expected according to Nadol<sup>22</sup> or Weidemann et al.<sup>23</sup> In our series, the more frequent complication of meningitis in the inner ear was not serous but purulent labyrinthitis. It is our impression that in meningeal pathologic conditions such as subarachnoid hemorrhage, the main route for the inner ear was the cochlear aqueduct, and only in some cases had the pathway been the internal auditory canal and modiolus. This latter route can not be excluded, however, because human modiolar components are separated from the scalae (tympani and vestibuli) only by areolar tissue and thin bony laminae, very weak barriers to the passage of blood serum in subarachnoid hemorrhagic cases and of extravascular blood into the modiolus. Channels in the osseous spiral laminae, described by Schuknecht and El Seifi,<sup>24</sup> may also be responsible for passage of serum from the modiolus to the scala tympani.

According to Silverstein et al.,<sup>16</sup> obstructions in the IAC, such as acoustic neuromas, can give rise to eosinophilic staining of perilymph attributed to leakage of protein from vessels surrounding perilymphatic spaces, after compression of the internal auditory artery. This hypothesis seems very attractive, but we were unable to confirm it using just histopathological analysis.

So far as we know, this is the first study to present positive statistical correlation between serous labyrinthitis and endolymphatic hydrops. Our findings of predominantly cochlear and apical hydrops agree with the statement by Schuknecht and McNeil<sup>25</sup> that endolymphatic hydrops follows irritation of the inner ear and is more severe in the pars inferior of the labyrinth, possibly because Reissner's membrane and the saccular wall are more yielding than the walls of the utricle and of the semi-circular canals. Also, the pars superior is more protected from access through two of the main portals to the inner ear, the round window and the cochlear aqueduct. The presence of hydrops may be, as some authors have suggested,<sup>13</sup> related to increases in proteinaceous content and other chemical changes in labyrinthine fluids, which alter the osmotic and chemical gradients between endolymph and perilymph across Reissner's membrane. Further, the presence of hydrops may be responsible for the temporary sensorineural threshold shifts during otitis media, verified by some authors<sup>2,26</sup> and attributed to toxins passing through the round window. It was not possible in this study to demonstrate correlation between locations of fluid in scalae and sites that showed hydrops.

Of these 96 carefully selected cases, 69 had middle ear pathology while 27 had pathology elsewhere, especially intracranially. The majority of cases, 59, showed different forms of otitis media. Serous labyrinthitis was much more prevalent in children, especially infants, than in adults. These findings suggest that serous labyrinthitis is most common in the presence of otitis media and especially in young children. The most common location of serous labyrinthitis was the adjacent scala tympani of the lower basal turn, a site not measured by routine audiology. The most important passage of entry was the round window membrane. These findings support the results of other studies in which sensorineural hearing loss (either temporary threshold shift [TTS] or permanent threshold shift [PTS]) has been demonstrated on subjects secondary to otitis media.<sup>2-4</sup>

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are greatly indebted to Sherry Fulton and Noriko Morizono for technical assistance, and to Ginny Hansen for editing.

## REFERENCES

1. Witmaack XX (1904). Cited by Turner AL, Fraser JS: The pathology of labyrinthitis. *J Laryngol Otol* 43: 609-644, 1928.
2. Paparella MM, Goycoolea MV, Schachern PA, et al.: Current clinical and pathological features of round window diseases. *Laryngoscope* 97: 1151-1160, 1987.
3. Paparella MM: Insidious labyrinthine changes in otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 92: 513-520, 1981.
4. Goycoolea MV, Paparella MM, Juhn SK, et al: Oval and round window changes in otitis media: Potential pathways between middle and inner ear. *Laryngoscope* 90: 1387-1391, 1980.
5. Turner AL, Fraser JS: The pathology of labyrinthitis. *J Laryngol Otol* 43: 609-644, 1928.
6. Crowe SJ (1930). Cited by Paparella MM, Sugiura S: The pathology of suppurative labyrinthitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 76: 556-586, 1967.
7. Druss JG: Pathways of infection in labyrinthitis: Report of three different types. *Arch Otolaryngol* 9: 392-403, 1929.
8. Perlman HB, Lindsay JR: Relation of internal ear spaces to the meninges. *Arch Otolaryngol* 29: 12-23, 1939.
9. Schuknecht HF: Pathology of the Ear, Cambridge, MA, Harvard University Press, 1974, p. 240.
10. Asher DL, Sando I: Perilymphatic communication routes in the auditory and vestibular system. *Otolaryngol Head Neck Surg* 89: 822-830, 1981.
11. Lindsay JR: Viral labyrinthitis: Histopathological characteristics. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 63: 138-143, 1967.
12. Paparella MM, Oda M, Hiraide F, et al.: Pathology of sensorineural hearing loss in otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 81: 632-647, 1972.
13. Paparella MM, Sugiura S: The pathology of suppurative labyrinthitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 76: 556-586, 1967.
14. Holden H, Schuknecht HF: Distribution pattern of blood in the inner ear following spontaneous subarachnoid hemorrhage. *J Laryngol Otol* 82: 321-327, 1968.
15. Dix MR, Hallpike CS: Observations on the pathological mechanisms of conductive deafness in certain cases of neuroma of the VIIIth nerve. *Proc R Soc Med* 43: 291-298, 1950.
16. Silverstein M, Naufal P, Belal A: Causes of elevated perilymph protein concentrations. *Laryngoscope* 83: 476-487, 1973.
17. Schuknecht HF: Anatomy of the Temporal Bone with Surgical Implications, Lea and Febiger, Philadelphia, 1986, p. 283-284.
18. Fernandez C: Post-mortem changes and artifacts in human temporal bones. *Laryngoscope* 68(2): 1586-1615, 1958.
19. Goycoolea M : The round window membrane under normal and pathologic condition. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl.* 493:43-55, 1992.
20. Johansson U, Hellstrom S, Anniko M: Round window membrane in serous and purulent otitis media — structural study in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102:227-235, 1993.
21. Schachern PA, Paparella MM, Goycoolea MV, et al.: The permeability of the round window membrane during otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg* 113: 625-629, 1987.
22. Nadol JB: Hearing loss as a sequela of meningitis. *Laryngoscope* 88: 739-755, 1978.

23. Weidemann BL, Hawkins EP, Johnson GS: Pathogenesis of labyrinthitis associated with *Haemophilus influenzae* type B meningitis in infant rats. *J Infect Dis* 153(1): 27-32, 1986.
24. Schuknecht HF, El Seifi A: Experimental observations on the fluid physiology of the inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 72: 687-712, 1963.
25. Schuknecht HF, McNeil RA: Light microscopic observations on the pathology of endolymph. *J Laryngol Otol* 79: 1-10, 1966.
26. Morizono T, Giebink GS, Paparella MM, et al.: Sensorineural hearing loss in experimental purulent otitis media due to *Streptococcus pneumoniae*. *Arch Otolaryngol* 111: 794-798, 1985

# Publicação III

---

*Miringotomia na otite média aguda da criança.  
Estudo clínico e microbiológico pelo método PCR*

Rev Port ORL, 2003; 41: 251-264.

ARTIGO ORIGINAL

# MIRINGOTOMIA NA OTITE MÉDIA AGUDA DA CRIANÇA

## ESTUDO CLÍNICO E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PELO MÉTODO PCR

### MYRINGOTOMY IN ACUTE OTITIS MEDIA IN CHILDREN - CLINICAL AND LABORATORIAL STUDY BY POLYMERASE CHAIN REACTION - PCR

Jorge Spratley\*, Anders Sjöstedt\*\*, Fernanda Cotta\*\*\*, Nuno Lunel\*\*\*\*, Cecília Pereira\*, Telma Feliciano\*, Manuel Pais-Clemente\*

**RESUMO:**

**Objetivos/Hipóteses:**

A otite média aguda (OMA) é uma das patologias mais frequentes da infância. A prevalência dos agentes infectantes apresenta variabilidades geográficas que é importante reconhecer. O interesse da miringotomia, outrora indicada por rotina no tratamento desta afecção, tem sido alvo de controvérsia em casos de OMA não-complicada. Os objetivos deste estudo consistiram na avaliação clínica da associação da miringotomia à antibioterapia no tratamento da OMA e na análise microbiológica dos agentes isolados comparando métodos de cultura clássicos e análise por Polymerase Chain Reaction (PCR).

**Desenho/Local:**

Estudo clínico e laboratorial prospectivo e controlado, realizado em hospital central universitário (Hospital de S. João, Porto).

**Pacientes e Métodos:**

Recrutamento consecutivo de crianças entre 1 e 6 anos de idade com diagnóstico de OMA. Seleção alternada para um dos seguintes grupos terapêuticos: MIR(n=31) - miringotomia associada a amoxicilina/ác.clavulânico x10 dias; Não-MIR(n=29) - amoxicilina/ác.clavulânico x10 dias. Preenchimento de diários domiciliários. Reavaliação clínica e timpanométrica aos 14 e 28 dias. Estudo dos aspirados do ouvido médio por método das culturas e PCR.

**Resultados:**

Amostra com 53% crianças do sexo masculino e média de idades de 33±18 meses. Durante os 14 dias iniciais o grupo MIR registou significativamente menos casos com otalgia/irritabilidade e mais casos com otorreia. Aos 28 dias não se verificaram diferenças significativas entre os dois grupos, não obstante uma tendência do grupo MIR para um maior número de casos com otoscopia e timpanometria normais. Isolaram-se patógenos em 68% das culturas efectuadas: *S. pneumoniae* (32.3%), *H. influenzae* (16.1%), *S. aureus* (16.1%), *S. pyogenes* (12.9%) e *M. catarrhalis* (6.5%). A taxa de identificação bacteriana por PCR foi superior às culturas convencionais.

**Conclusões:**

A miringotomia quando indicada no tratamento da OMA associa-se a um alívio mais precoce da otalgia. Contudo o presente estudo não revelou outras vantagens da associação de miringotomia ao tratamento antibiótico na OMA não-complicada. O *S. pneumoniae* persiste como o agente mais frequentemente isolado na OMA e o método de análise PCR revelou-se altamente sensível na identificação bacteriana.

**PALAVRAS-CHAVE:**

Otite média; Miringotomia; Criança; Microbiologia; PCR.

**ABSTRACT:**

**Aims:**

Acute otitis media (AOM) is one of the most frequent diseases of childhood. Various infectious agents may be involved and their prevalence appears to be dependent from geographic factors. Myringotomy once a common treatment in non-complicated AOM has been questioned after the introduction of effective antimicrobials. The present study aimed to evaluate the clinical effects of associating myringotomy to oral antibiotics in AOM as well as to study the bacterial aspirates by Polymerase Chain Reaction (PCR) against classical microbiological cultures.

**Design/Setting:**

Prospective clinical and laboratorial study undertaken in an academic tertiary referral hospital in Porto, North of Portugal.

**Patients and Methods:**

Children between 1 and 6 years old presenting with AOM were consecutively enrolled. Patients were sequentially selected in an alternate fashion to one of the following treatment groups: MIR (n=31) - myringotomy and oral amoxicillin/clavulanate; Non-MIR (n=29) - oral amoxicillin/clavulanate only. Parents were given diaries for daily completion at home. Check-ups were scheduled at days 14 and 28. Middle ear aspirates were analyzed by PCR and classical cultures.

**Results:**

The mean age of participants was 33±18 months with 53% of boys. During the first 14 days the MIR group reported significantly less cases with otalgia and intake of analgesics but a greater number of reports of otorrhea. At day 28 no significant differences were noticed between groups despite a slight trend towards more normal otoscopic and tympanometric findings in the MIR group. Cultures were positive in 68% of cases: *S. pneumoniae* (32.3%), *H. influenzae* (16.1%), *S. aureus* (16.1%), *S. pyogenes* (12.9%) and *M. catarrhalis* (6.5%). The rates of bacteria identified by PCR were superior to cultures.

**Conclusions:**

The present study indicates that myringotomy reduces the extent of otalgia but appears to give no further advantages to antibiotics alone in the treatment of non-complicated AOM. As such the use of myringotomy should be reserved for specific situations of AOM as complications or whenever the microbiological diagnosis is required. *S. pneumoniae* was the agent most frequently isolated by far and PCR proved to be a very sensitive method for bacterial identification.

**KEY-WORDS:**

Otitis media; Myringotomy; Children; Microbiology; PCR.

\* Serviço de Otorrinolaringologia, Hospital S. João, Faculdade de Medicina do Porto  
 \*\* Department of Clinical Microbiology, University Hospital Umeå, Suécia  
 \*\*\* Laboratório de Patologia Clínica - Microbiologia, Hospital S. João  
 \*\*\*\* Serviço de Higiene e Epidemiologia, Faculdade de Medicina do Porto

## INTRODUÇÃO

A otite média constitui uma das afecções mais frequentes da infância. Indicativos apontam para que cerca de 70% das crianças desenvolvam pelo menos um episódio de otite média aguda (OMA) durante os primeiros dois anos de vida<sup>1</sup>. Os números elevam-se para 84% das crianças se for considerada a faixa etária até aos 3 anos de idade<sup>6</sup>. Os custos financeiros gerados são elevadíssimos, tendo sido gastos nos EUA somente durante 1989 cerca de 3,5 biliões de dólares, em tratamentos médicos e cirúrgicos desta patologia<sup>54</sup>. Estudos epidemiológicos revelaram um aumento na incidência da OMA de aproximadamente 40% entre 1982 e 1990<sup>49</sup>, o que coloca esta infecção como um dos problemas de saúde pública com maior impacto na actualidade.

No passado a realização de miringotomia era recomendada como medida de rotina no tratamento da OMA. Com o advento de antimicrobianos de eficácia crescente, o recurso à miringotomia em casos de OMA não-complicada decaiu, originando controvérsias entre os defensores<sup>29,44</sup> e os detractores da sua utilização<sup>28,57</sup>.

Mais recentemente, a emergência progressiva de estirpes bacterianas resistentes isoladas em aspirados do ouvido médio<sup>3,15,53</sup>, veio alertar para uma utilização mais racional dos antibióticos na OMA<sup>11,31,42</sup>. Assim, desenvolveu-se a necessidade de um conhecimento mais apurado sobre a prevalência regional dos agentes infectantes da OMA, cujas variabilidades geográficas são reconhecidas<sup>3</sup>.

Estariam pois abertas as possibilidades para um eventual ressurgimento da miringotomia no âmbito da OMA<sup>15</sup>.

Estudos actuais, realizados com amostras de fluidos do ouvido médio em crianças portadoras de otite média com efusão (OME), revelaram uma maior sensibilidade e especificidade das técnicas de detecção microbiológica pelo método da *Polymerase Chain Reaction*

(PCR) quando comparadas com a microbiologia convencional<sup>23,43</sup>. Com a metodologia PCR torna-se possível efectuar o reconhecimento bacteriano ao nível molecular, através da identificação de sequências específicas de segmentos do genoma DNA, em amostras de volume diminuto<sup>16</sup>.

Os objectivos do presente estudo consistiram por um lado na análise microbiológica convencional e PCR dos agentes infectantes da OMA numa amostra pediátrica da cidade do Porto e por outro na avaliação dos efeitos clínicos da associação da miringotomia à antibioterapia no tratamento da OMA.

## PACIENTES E MÉTODOS

### Pacientes

Elegeram-se para o presente estudo prospectivo, crianças com idades compreendidas entre os 1 e 6 anos, observadas consecutivamente num período de urgência semanal do Serviço de ORL do Hospital de S. João com diagnóstico de OMA unilateral, entre Janeiro 1999 e Junho 2001. Todas as crianças foram referenciadas a ORL após observação no Serviço de Urgência de Pediatria. Definiu-se OMA na presença de otalgia, irritabilidade e febre associados a evidência otoscópica de abaulamento e rubor ou palidez timpânicos. Excluíram-se crianças com malformações craniofaciais, imunodeficiências, história de antibioterapia nos seis dias precedentes ou presença de otorreia espontânea. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de S. João, Porto (Proj. nº59), e incluiu apenas crianças cujos pais ou representantes legais assinaram um consentimento informado.

### Tratamento

À entrada todas as crianças foram randomizadas através duma selecção consecutiva de forma alternada para uma das seguintes grupos terapêuticos: amoxicilina + ácido clavulânico associado a miringotomia (MIR); ou amoxicilina

MIRINGOTOMIA NA OTITE MÉDIA AGUDA DA CRIANÇA.  
ESTUDO CLÍNICO E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PELO MÉTODO PCR

+ ácido clavulânico (Não-MIR). A dose de anti-biótico prescrita foi de 50mg/Kg/dia divididas 8/8hr, 7 dias. Deixou-se ao critério dos pais o uso de analgésicos/antipiréticos, de acordo com a sintomatologia apresentada pelas crianças. A miringotomia foi realizada com microlanceta radialmente no quadrante antero-inferior da membrana timpânica, sob controle microscópico (Carl Zeiss OPMI 9-FC, Germany). Nas crianças com idade superior a dois anos, efectuou-se anestesia tópica da membrana timpânica com soluto de Bonain (cocaina, mentol e fenol). Procedeu-se à aspiração do fluido do ouvido médio através de aspirador/colector asséptico Juhn Tym-Tap® (Xomed Surgical Products, Jacksonville, FL,USA).

### Bacteriologia

Após a colheita, as amostras foram prontamente transportadas ao Laboratório de Microbiologia do Hospital de S. João. Aí, de forma asséptica em câmara de fluxo laminar:

a) Retirou-se parte do aspirado para estudo Gram e inoculação em agar sangue e agar chocolate com incubação aeróbica a 350C em 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. A identificação das bactérias isoladas seguiu técnicas padronizadas<sup>2</sup> e na pesquisa da sensibilidade aos antimicrobianos usou-se o método de Kirby-Bauer com diluição em disco<sup>40</sup>. Testaram-se os seguintes discos antibióticos (Oxoid, Hampshire, Inglaterra): oxacilina, amoxicilina/ácido clavu-

lânico, eritromicina, cotrimoxazol, tetraciclina e cloranfenicol. A produção de beta-lactamase foi pesquisada pelo método cromogénico com discos de nitrocefina<sup>41</sup> (Oxoid, Hampshire, Inglaterra).

b) Entretanto, o restante fluido de cada amostra foi imediatamente numerado, congelado e preservado a 800C negativos no Serviço de Microbiologia da Faculdade de Medicina do Porto. Posteriormente estes espécimes foram transportados por via aérea, congeladas em gelo seco, para análise PCR no Departamento de Microbiologia Clínica da Universidade de Umeå, Suécia. Os resultados das culturas bacterianas foram vedados ao conhecimento dos responsáveis pela execução técnica da análise PCR. A análise PCR foi orientada apenas para a detecção dos três agentes considerados mais frequentes na OMA<sup>42</sup>: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* (Tab.1).

### MÉTODOS PCR

**Estirpes bacterianas.** Incluíram-se as seguintes estirpes bacterianas e fúngicas, *Candida albicans* (CCUG 35723), *Bordetella parapertussis* (ATCC 15237), *Haemophilus parainfluenzae* (NTCC 7857), *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus intermedius* (ATCC 27335), *Streptococcus const* (CCUG

Primer	Gene	Sequência (5' * 3')	Tamanho do Fragmento
Hi-6F	P6	GCTTGGTCTCCATACTAA	152bp
Hi-6R	P6	TTGAGCAGCACCATTC	
Mc-5F	NadR	GTCGCACGCCAACAC	193bp
Mc-5R	NadR	GTCGTATGAGCGGTAAT	
Sp-ly3	Autolysin	AGCCTAATCGTGACTAAGA	321bp
Sp-ly4	Autolysin	CCCAGGCACCATTATCA	
Hba3	Human β-actin	TGGGCCTCGTCGCCACATA	176bp
Hba5	Human β-actin	ATGGATGATGATATCGCCGCG	

Tabela 1. Primers usados para a detecção PCR de bactérias patogénicas na otite média aguda



9569), *Streptococcus mutans* (CCUG 11877), *Streptococcus agalactiae* (CCUG 4208), *Streptococcus pneumoniae* (CCUG 3114), *Moraxella catarrhalis* (CCUG 18284), *Haemophilus influenzae* (CCUG 23969, CCUG 23946), *Bordetella bronchiseptica* (CCUG 219), *Neisseria sicca* (CCUG 23929) e *Neisseria lactamica* (CCUG 5853). Para testar a especificidade do PCR, preparou-se DNA a partir de 107 bactérias pertencentes a cada estirpe, de acordo com Ibrahim et al<sup>26</sup>. Usou-se o volume de um microlitro para análise PCR. Na avaliação dos índices de detecção, diluíram-se as bactérias em 1/10 e preparou-se o DNA como previamente reportado na literatura<sup>26</sup>. A partir de cada diluição, utilizou-se um microlitro para PCR. O número final de bactérias foi decidido por contagem dos agentes viáveis.

**Extração de DNA.** Seguiu-se o método da sílica anteriormente descrito por Ibrahim et al<sup>25,26</sup>. Adicionou-se 300µl de esputo: NALC a 700µl L6-tampão modificado de modo a aumentar o volume da amostra (120g GuSCN (Tiocianato de Guanidina), 47ml 0,1M Tris-HCL pH 6,4, 22ml 0,27M EDTA pH:8,0, 3,6g Triton-X100)<sup>25</sup>. Juntaram-se 5µl de Glassmilk® (Bio-101, La Jolla, CA, USA) e submeteu-se a amostra a um vórtice e deixou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente centrifugou-se a 14.000x g durante 15 segundos e efectuaram-se duas lavagens em 1 ml de L2-tampão25 (120g GuSCN em 100ml 0,1M Tris-HCL pH 6,4), duas vezes em 1ml de 70% EtOH e finalmente uma vez em 1ml de acetona. Deixou-se secar a gota de DNA-Glassmilk durante 10 minutos a 56°C, suspendeu-se de novo em 30 µl TE-tampão (Tris-EDTA) e eluiu-se durante 10 minutos a 56°C.

Após centrifugação colheu-se o DNA tendo-se usado um microlitro para PCR.

**Optimização do PCR.** O PCR foi optimizado usando o MODDE 3,0 (Umetri, AB, Sweden). A optimização foi efectuada para os cinco parâmetros variáveis dos pares de primers separados, [primer], [MgCl<sub>2</sub>], [Taq], [dNTP] e temperatura.

**PCR.** O procedimento PCR foi realizado num volume total de 25µl. A mistura da reacção continha, na concentração final, 1 unidade Taq DNA-polimerase e 1xTaq tampão (20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 75mM Tris-HCL pH 9,0, 0.01% (w/v) Tween) (Advanced Biotechnologies Inc., London, UK), 0.8µM de cada primer (Tab.1), uma mistura de trifosfatos de deoxinucleosídeo (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) numa concentração de 250µM, e 4mM MgCl<sub>2</sub>.

Procedeu-se à amplificação num *cycler* térmico de DNA (Progene, Techne Ltd., Cambridge, UK), com uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos, cada consistindo em desnaturação a 94°C durante 30 segundos, *annealing* a 62°C durante 30 segundos e extensão 72°C por 60 segundos.

Para os primers Hba/Hba 5 usou-se uma temperatura de *annealing* de 60°C. Após 30 ciclos, e uma extensão final a 72°C durante 7 minutos, submeteu-se 5µl da mistura da reacção PCR a electroforese em 4% agarose gel NuSieve® (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA). Após coloração com brometo de etídio a 1% visualizaram-se os produtos amplificados com luz UV.

## AVALIAÇÃO CLÍNICA

Na admissão ao estudo, os pais preencheram um pequeno questionário, visando a avaliação de história clínica pregressa, nomeadamente no respeitante a antecedentes otológicos. Considerou-se como critério de OMA recorrente toda a criança com historial de pelo menos três episódios de OMA nos seis meses precedentes ou um número igual a quatro ou mais episódios de OMA durante o ano anterior.

Foram também distribuídos dois diários para preenchimento domiciliário relativos aos sintomas da criança (especial detalhe na avaliação da duração de otalgia/irritabilidade, otorreia, febre ou vômitos), adesão ao tratamento, medicação com analgésicos e eventuais

MIRINGOTOMIA NA OTITE MÉDIA AGUDA DA CRIANÇA.  
ESTUDO CLÍNICO E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PELO MÉTODO PCR

reações adversas, e cuja entrega foi efectuada nas visitas de controle clínico escaladas respectivamente para o 14<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias. Nestas visitas efectuaram-se também otomicroscopia e timpanometria com classificação dos traçados em A, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e B<sup>55</sup>.

**ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As proporções foram comparadas utilizando o teste do Chi-quadrado ou a prova exacta de Fisher quando adequado, para um nível de significância de P <0.05.

**RESULTADOS**

**População do Estudo**

Foram incluídos no presente estudo 60 crianças. Rejeitaram-se 21 casos referenciados: oito sofriam de OME serosa ou mucosa, seis não aparentavam evidência de otite média, cinco estavam sob efeito de antibióticos, dois tinham otorreia com perfuração timpânica espontânea. Em duas situações houve recusa paterna no consentimento. A média das idades foi de 33±18 meses e registou-se um ligeiro predomínio de rapazes (53%). O ouvido esquerdo foi mais frequentemente afectado (58%). Em 31 doentes (52%) foi efectuada miringotomia com colheita de aspirado para cultura microbiológica, dos quais apenas 28 foram submetidos a estudo PCR (Fig. 1).

As crianças pertencentes aos dois grupos do estudo, respectivamente MIR e Não-MIR, estavam distribuídas homogeneamente (Tab.2).

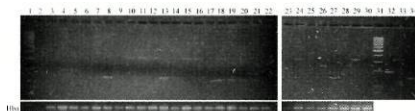


FIG. 1 - ANÁLISE POR PCR DOS ASPIRADOS DO OUVIDO MÉDIO DE CRIANÇAS COM OTITE AGUDA.  
LINHAS 3-30: AMOSTRAS DE 28 INDIVÍDUOS.  
LINHAS 1,31 REPRESENTAM MARCADORES DE PESO MOLECULAR E A LINHA 2 UM CONTROLE NEGATIVO.  
LINHAS 32-34: CONTROLES POSITIVOS;  
32 *M. CATARRHALIS*,  
33 *S. PNEUMONIAE*  
34 *H. INFLUENZAE*  
AMOSTRAS ANALISADAS NAS LINHAS 4,5 E 21 CONSIDERADAS POSITIVAS PARA *M. CATARRHALIS*, 10-12,15,16,18,20,24,29 POSITIVAS PARA *S. PNEUMONIAE* E 8,13,18-21,27 POSITIVAS PARA *H. INFLUENZAE*

**Bactérias Patogénicas**

Isolaram-se patogéneos em 68% das culturas efectuadas (Tab.3). Por ordem decrescente detectaram-se: 32.3% *S. pneumoniae*, 16.1% *H. influenzae*, 16,1% *S. aureus*, 12.9% *S. pyogenes* e 6.5% *M. catarrhalis*. Dez culturas revelaram-se negativas.

A proporção de agentes identificados isoladamente ou em associação, para cada um dos métodos laboratoriais usados no estudo, é apresentada na Tabela 3. Em três amostras, cujas culturas desenvolveram dois *S. pneumoniae* e um *S. aureus* não foi realizado PCR. Consequentemente, registou-se uma taxa de identificação bacteriana pela técnica PCR comparativamente às culturas convencionais de 113% para *S. pneumoniae*, 140% para *H. influenzae* e 150% para *M. catarrhalis*.

Relativamente às estirpes bacterianas isoladas em cultura, verificou-se produção de Beta-lactamases respectivamente em 2/5 dos *H. influenzae* e na totalidade das *M. catarrhalis*,

	Não-MIR (n=29)	MIR (n=31)	P
Sexo (% masculino)	51.7	54.8	0.99
Idade, anos (média ± sd)	2.6 ± 1.4	3.1 ± 1.8	0.37
Ouvido (% esquerdo)	44.8	71.0	0.07
OMA Recorrente (%)	53.6	60.0	0.82
(OMA recorrente: ≥ 3 episódios OMA nos 6 meses precedentes)			

Tabela 2. Comparação entre os dados demográficos dos grupos não-miringotomizado e miringotomizado

JORGE SPRATLEY, ANDERS SJÖSTEDT, FERNANDA COTTA, NUNO LUNET, CECÍLIA PEREIRA, TELMA FELICIANO, MANUEL PAIS-CLEMENTE

	Cultura (n=31)		PCR (n=28)	
	N (Isol+Mix)	%	N (Isol+Mix)	%
<b>S. pneumoniae</b>	10 (8+2)	32.3	9 (7+2)	32.1
<b>H. influenzae</b>	5 (2+3)	16.1	7 (4+3)	25.0
<b>S. aureus</b>	5 (3+2)	16.1	NT	—
<b>S. pyogenes</b>	4 (2+2)	12.9	NT	—
<b>M. catarrhalis</b>	2 (1+1)	6.5	3 (2+1)	10.7
<b>Negativo</b>	10	32.3	9	—

TABELA 3. BACTERIOLOGIA DO FLUIDO DO OUVIDO MÉDIO EM CRIANÇAS COM OTITE MÉDIA AGUDA

(Isol: espécimes isolados; Mix: espécimes em associação; PCR: Polymerase Chain Reaction efectuada apenas para *S.pneumoniae*, *H.influenzae* e *M.catarrhalis*; NT: não testado)

enquanto 50% dos *S. pneumoniae* apresentavam algum tipo de resistência aos antibióticos (Tab.4).

### Avaliação Clínica

#### Primeira visita de controle (14<sup>o</sup> dia):

A totalidade dos doentes apresentou-se nesta visita com os diários preenchidos. A maioria melhorou clinicamente, independentemente da modalidade terapêutica seguida. Três casos (5%), um MIR e dois não-MIR, desenvolveram diarreia discreta (<3 dejeções/dia) que não obrigou a modificar a terapêutica. O grupo de crianças MIR submetidas a antibiótico + miringotomia registou nos diários significativamente menos situações de otalgia/irritabilidade ( $P < 0.001$ ) e mais casos com otorreia em relação aos tratados apenas com antibiótico ( $P < 0.0001$ ); já no respeitante à ocorrência de vômitos ou febre as diferenças não foram significativas (Tab.5). Somente um Não-MIR desenvolveu otorreia e apenas por um dia enquanto os casos de MIR que registaram supuração, esta manteve-se  $1.4 \pm 0.71$  dias (Min. 1 e Max. 3).

Do ponto de vista otoscópico, todas as miringotomias apresentaram-se encerradas. Em 78% dos ouvidos havia sinais de persistência de efusão no ouvido médio sem diferenças significativas entre os dois grupos do estudo. Nenhum caso apresentava critérios de OMA

persistente. Obtiveram-se traçados timpanométricos tipo A ou C<sub>1</sub> em apenas 22% dos casos, igualmente sem diferenças inter-grupos do estudo (Tab.6).

#### Segunda visita de controle (28<sup>o</sup> dia):

Dois doentes (3%), um de cada grupo respectivamente, não compareceram para esta reavaliação. Relativamente aos parâmetros clínicos analisados, não se detectaram diferenças significativas entre as duas modalidades terapêuticas, não obstante se ter verificado uma tendência ligeiramente superior para recidiva de otalgia no grupo de doentes Não-MIR (Tab.5).

Assumindo o conjunto dos doentes, durante este segundo período entre o 14<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias, 31% dos casos registaram informação de otalgia homolateral ao ouvido inicialmente tratado, 19% tiveram febre, e 5% apresentaram respectivamente otorreia e/ou vômitos. Do ponto de vista otoscópico, aos 28 dias, 52% dos ouvidos tinham normalizado e 41% ainda apresentavam sinais de efusão no ouvido médio. Em 7% (N=4) dos casos observaram-se critérios de otite média aguda, correspondendo respectivamente a três ouvidos Não-MIR e um MIR. Em 57% dos timpanogramas o traçado era tipo A ou C<sub>1</sub> e nos restantes C<sub>2</sub> ou B. A comparação dos resultados da otoscopia e tim-

MIRINGOTOMIA NA OTITE MÉDIA AGUDA DA CRIANÇA.  
ESTUDO CLÍNICO E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PELO MÉTODO PCR

	<b>S pneumoniae</b>	<b>H influenzae</b>	<b>S aureus</b>	<b>S pyogenes</b>	<b>M catarrhalis</b>
Oxacilina	2/10	2/5	5/5	0	2/2
Amoxic./Ac.clav.	0	0	0	0	0
Eritromicina	3/10	0	2/5	2/4	0
Cotrimoxazol	2/10	0	3/5	2/4	0
Tetraciclina	2/10	0	0	2/4	0
Cloranfenicol	0	0	0	0	0

TABELA 4. RESISTÊNCIAS AOS ANTIMICROBIANOS

Sintomas	1º Período (1-14 dias)			2º Período (14-28 dias)		
	<b>Não-MIR</b> (n=29)	<b>MIR</b> (n=31)		<b>Não-MIR</b> (n=28)	<b>MIR</b> (n=30)	
	N (%)	N (%)	P	N (%)	N (%)	P
<b>Otalgia</b>	24 (82.8)	11 (35.5)	<b>&lt;0.001</b>	11 (39.3)	7 (23.3)	0.30
<b>Otorreia</b>	1 (3.4)	25 (80.6)	<b>&lt;0.0001</b>	1 (3.6)	2 (6.7)	1.00
<b>Febre</b>	17 (58.6)	11 (35.5)	0.13	6 (21.4)	5 (16.7)	0.90
<b>Vômitos</b>	10 (34.5)	9 (29.0)	0.86	2 (7.1)	1 (3.3)	0.61

TABELA 5. PROPORÇÃO DE CRIANÇAS COM SINTOMAS DURANTE O PRIMEIRO E SEGUNDO PERÍODO DO ESTUDO.

	14 dias			28 dias		
	<b>Não-MIR</b> (n=29)	<b>MIR</b> (n=31)	<b>P</b>	<b>Não-MIR</b> (n=28)	<b>MIR</b> (n=30)	<b>P</b>
<b>Otoscopia</b>	<b>N(%)</b>	<b>N(%)</b>		<b>N(%)</b>	<b>N(%)</b>	
Normal	5 (17.2)	8 (25.8)	0.62	13 (46.4)	17 (56.7)	0.61
OME+OMA	24+0 (82.4)	23+0 (74.2)		12+3 (53.6)	12+1 (43.3)	
<b>Timpanograma</b>						
A + C1	7 (24.1)	6 (19.4)	0.89	15 (53.6)	18 (60.0)	0.82
C2 + B	22 (75.9)	25 (80.6)		13 (46.4)	12 (40.0)	

TABELA 6. RESULTADOS DA OTOSCOPIA E TIMPANOMETRIA AOS 14º E 28º DIAS

panometria entre os dois grupos não mostrou diferenças significativas (Tab.6), embora o grupo MIR tenha revelado tendência para mais otoscopias normais e menos casos de recidiva de OMA aos 28 dias.

Finalmente, independentemente da opção terapêutica seguida, a taxa de otoscopias anormais aos 28 dias foi de 66% (N=22) nas crianças com antecedentes de OMA recorrente comparativamente com apenas 25% (N=6) nas crianças sem passado de OMA recorrente (P <0.003).

## DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo prospectivo indicam que a associação da miringotomia à antibioterapia na OMA não-complicada conduz a uma resolução mais rápida da otalgia, não resultando noutros benefícios significativos de natureza clínica e timpanométrica. Paralelamente, o método de análise PCR revelou uma elevada sensibilidade para a detecção dos agentes infectantes estudados, quando comparado com as culturas, tendo o *S. pneumoniae* aparecido como agente predominante no conjunto das bactérias identificadas.

O estudo da microbiologia das vias aéreas e respectivas sensibilidades aos antimicrobianos tem conhecido um grande impulso em Portugal em anos recentes, permitindo identificar índices moderados de resistência aos antibióticos relativamente a outros países mediterrânicos<sup>12,19,37,58</sup>. É interessante que alguns destes estudos<sup>37,58</sup> tenham apontado para taxas de resistência do *S. pneumoniae* e *H. influenzae* mais elevadas no Sul, seguidas da região Norte e menores na região Centro de Portugal.

Já na que respeita à microbiologia da OMA este tipo de investigação tem escasseado, ressaltando-se o trabalho efectuado em Lisboa por Monteiro et al.<sup>39</sup> num grupo de 46 crianças com OMA refractária à antibioterapia nos quais se isolaram 37% *S. pneumoniae* (42% penicilino-resistentes), 33% *H. influenzae* (27% produtores de  $\beta$ -lactamases), 9% *S. aureus* e

2% *M. catarrhalis*. Nessa série as amostras provieram de miringotomia bilateral em 30% dos doentes, tendo sido revelado existir concordância entre os agentes isolados em cada ouvido.

Em contraste, na presente investigação procurou-se retratar a microbiologia da OMA em crianças sem exposição a antibióticos nos dias precedentes à miringotomia, tentando-se evitar deste modo qualquer indução prévia de resistências. Assim, dentro dos agentes aeróbicos mais frequentemente implicados na OMA, o *S. pneumoniae* (32,2%) destacou-se como a bactéria mais frequentemente isolada na OMA da criança na região do Porto. É significativo que metade dos pneumococos tenham revelado algum tipo de resistência para o conjunto de antimicrobianos testados. Em 30% dos casos isolados verificou-se resistência à eritromicina, um índice elevado comparado com outros registos em Portugal<sup>12,38</sup> mas aquém dos 68,5% reportados recentemente em França<sup>22</sup>, o que poderá reflectir um consumo crescente de macrólidos no nosso País. Taxas de 20% de resistência foram identificadas respectivamente para oxacilina, cotrimoxazol e tetraciclina. Nomeadamente, os índices de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina (oxacilina) no presente estudo são relevantes, considerando que esta bactéria era em anos recentes quase universalmente sensível a esta classe de antibióticos. Contudo, a nossa taxa de *S. pneumoniae* pouco susceptíveis à penicilina não difere de outras séries contemporâneas em Portugal<sup>12,37</sup>, mas quedam-se aquém dos 42% de Monteiro et al.<sup>39</sup> ou dos valores alarmantes de 70% e 90% descritos respectivamente nas vizinhas França<sup>22</sup> e Espanha<sup>14</sup>.

Seguiu-se o *H. influenzae* (16,1%), em 2/5 dos casos produtores de Beta-lactamases sendo estes coincidentes com os não-susceptíveis à oxacilina. Todos os isolados revelaram-se susceptíveis à amoxicilina/ác.clavulânico, valor próximo dos escassos 0,2% de resistências recentemente descritos em culturas deste agente obtidas a partir das vias aéreas superiores<sup>37</sup>.

MIRINGOTOMIA NA OTITE MÉDIA AGUDA DA CRIANÇA.  
ESTUDO CLÍNICO E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PELO MÉTODO PCR

Já a frequência de isolamento de *M. catarrhalis* (6,5%) foi reduzida. É interessante que tanto a presente investigação como o estudo de Monteiro et al.<sup>39</sup>, apontem para uma baixa prevalência de *M. catarrhalis* na OMA infantil em Portugal. Aliás, ao contrário do panorama dos E.U.A.<sup>46</sup>, esta bactéria parece ser pouco prevalente na OMA em outros países europeus como a França<sup>34</sup>. Contudo não deixam de ser curiosas estas baixas incidências no nosso País, atendendo a que num extenso estudo microbiológico da nasofaringe em crianças saudáveis frequentadoras de infantários da zona de Lisboa realizado por De Lencastre et al.<sup>12</sup>, se tenham verificado 54% de portadores de *M. catarrhalis* (98%  $\beta$ -lactamase positivos), contra 72% portadores de *H. influenzae* (20%  $\beta$ -lactamase positivos) e 47% de *S. pneumoniae* (43% com algum tipo de resistência). Talvez o valor diagnóstico controverso das colheitas nasofaríngeas como método para inferir qual o agente causal da OMA<sup>17,21</sup>, ajude a explicar esta disparidade.

Parece interessante salientar no presente estudo os 12,9% de positividade obtidos para *S. pyogenes* que, tendo sido um agente altamente prevalente na OMA e suas complicações no passado<sup>5</sup>, é considerado um achado raro em séries de OMA contemporâneas<sup>4,13,32</sup>. Contudo, os nossos valores aproximam-se dos 14% num estudo recente de Brook e Gober<sup>8</sup> realizado em aspirados de crianças com OMA e perfuração timpânica espontânea. Investigação recente realizada por Melo-Cristino et al.<sup>36</sup> indica uma elevada prevalência de *S. pyogenes* resistentes aos macrólidos em Portugal, o que se confirmou na presente série com metade de isolados resistentes à eritromicina contrapondo-se a uma sensibilidade generalizada à oxacilina. Relativamente ao *S. aureus*, a sua percentagem no nosso estudo excedeu os 9-10% previamente reportados por alguns autores<sup>20,34</sup>, situando-se próxima dos 17% descritos por Karma et al.<sup>29</sup> Sendo esta última bactéria um comensal habitual do canal auditivo

externo, não é de excluir a possibilidade que em alguns destes casos tenha existido contaminação durante a colheita. Todavia, para confirmar esta hipótese teria sido necessário efectuar zaragatoas do canal auditivo externo previamente à miringotomia.

No tocante aos 32% de culturas negativas encontradas na presente investigação, trata-se de um valor comparável ao descrito noutras séries<sup>32,35,47</sup>.

Seguindo as recomendações de um consenso internacional sobre infecções em Otorrinolaringologia<sup>9</sup>, bem como os resultados de um estudo multicêntrico recente sobre susceptibilidade de bactérias causadoras de infecções respiratórias em Portugal<sup>37</sup>, optou-se pela prescrição de amoxicilina/ácido clavulânico aos doentes do nosso estudo. Atendendo às sensibilidades dos vários agentes isolados na presente série, em que à *posteriori* não se detectaram resistências *in vitro* quer ao cloranfenicol ou à amoxicilina/ácido clavulânico, a escolha revelou-se apropriada para o tratamento da OMA pediátrica na população estudada. Contudo, tal não significa que esta associação antibiótica seja a escolha única para o tratamento da OMA na região do Porto, mas apenas a melhor dentro dos antibióticos testados.

De acordo com Brook et al.<sup>7</sup>, o envolvimento de bactérias anaeróbicas na OMA ocorre em aproximadamente 28% dos casos. O presente estudo debruçou-se apenas sobre as bactérias aeróbicas. Refere-se contudo, que a maioria das estirpes anaeróbicas isolados na OMA são sensíveis à associação amoxicilina/ác. clavulânico que foi utilizada no presente protocolo de tratamento.

A análise por PCR consiste na amplificação de pequenas amostras de material genético, e por isso a viabilidade do agente não é considerado como um requisito essencial à sua identificação. Deste modo, a utilização desta técnica laboratorial tem conhecido a sua maior aplicação em otologia na detecção de frag-

mentos de DNA bacteriano em situações de OME persistente, nas quais as culturas bacterianas são raramente positivas. Prova disto mesmo constituem os trabalhos pioneiros de Post et al.<sup>45</sup> e mais recentemente de Gok et al.<sup>23</sup>, que comparando culturas aeróbicas e análise PCR em casos de OME obtiveram um aumento de resultados positivos de 28,9% para 77,3% e de 24,3% para 94,5% respectivamente em cada um dos estudos. Na presente investigação, procedeu-se à análise de fluidos aspirados em crianças com OMA, onde a concentração de bactérias viáveis é supostamente elevada e consequentemente as expectativas de culturas positivas são altas à partida. Mesmo assim a técnica PCR demonstrou-se mais sensível que o exame cultural na identificação de algumas bactérias, com resultados positivos em alguns casos que haviam revelado culturas negativas. Estes achados suportam um estudo prévio de Virolainen et al.<sup>59</sup> que revelou um índice de sensibilidade de 155% do PCR relativamente às culturas, para detecção de *S. pneumoniae* em aspirados de OMA. Sublinhe-se que, para cada uma das três estirpes bacterianas escrutinadas no presente estudo PCR, todos os casos com culturas positivas foram-no igualmente na análise PCR, reflectindo a especificidade deste último tipo de exame. É previsível que no futuro a utilização de tecnologia PCR se venha a tornar progressivamente mais popular no diagnóstico bacteriológico da OMA, já que a sua alta sensibilidade aliada à implementação de "kits" comerciais de fácil manuseamento, venham a permitir uma obtenção de resultados em poucas horas<sup>48</sup>.

Atendendo que nenhuma das crianças registou sinais otoscópicos de OMA aos 14 dias, somos levados a considerar que as situações de OMA diagnosticadas aos 28 dias se trataram de recidivas e não persistência da infecção.

É interessante que Schwartz et al.<sup>51</sup> tenham detectado que 57% das recidivas de OMA ocorrem na primeira semana após suspensão

do tratamento antibiótico. Aliás este grupo de autores reportou na década de oitenta<sup>50</sup>, em que as resistências aos antibióticos eram substancialmente inferiores às actuais, que a taxa de otite média com efusão persistente após OMA era respectivamente de 50% aos 10-14 dias e 29% aos 30 dias. Estes valores são sensivelmente inferiores aos da presente série, tanto para o grupo MIR como para o grupo Não-MIR.

A ausência de complicações da miringotomia sob anestesia local na amostra pediátrica estudada é indicativa que, em situações específicas de OMA como casos refractários ou na presença de complicações supuradas, este tipo de intervenção constitui uma alternativa válida à miringotomia sob anestesia geral. Por outro lado, segundo um estudo recente em modelo animal, a membrana timpânica apresenta uma elevada capacidade de regeneração após miringotomia no decurso da OMA<sup>52</sup>. A presente investigação é concordante com as conclusões desse trabalho, já que a totalidade das incisões nas membranas timpânicas se encontravam encerradas na otoscopia dos 14 dias.

Verificou-se no presente estudo que uma taxa de 17% dos doentes referenciados à urgência de ORL com suspeita de OMA não viu confirmado esse diagnóstico e foram assim excluídos. Estes dados reforçam a importância de uma otoscopia cuidadosa como um dos aspectos primordiais do diagnóstico da OMA e o consequente interesse em diminuir diagnósticos excessivos, por vezes frequentes no Serviço de Urgência, de modo a que a terapêutica desta afecção seja o menos possível baseada em achados vagos. De acordo com González-Vallejo et al.<sup>24</sup>, nunca será de mais salientar a importância de que se reveste o ensino aos estudantes de medicina e internos de especialidade das regras da otoscopia e como interpretar adequadamente as suas observações.

Recentemente, a execução de miringotomia na OMA tem sido defendida como o único méto-

MIRINGOTOMIA NA OTITE MÉDIA AGUDA DA CRIANÇA.  
ESTUDO CLÍNICO E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PELO MÉTODO PCR

do eficaz para identificar os agentes infectantes e aferir sobre a eficácia real dos antimicrobianos, numa era em que as susceptibilidades bacterianas estão em constante mutação<sup>10</sup>. Para além destas vantagens, alguns estudos clínicos em países nórdicos forneceram indicativos que a antibioterapia quando complementada com miringotomia se associava a uma recuperação mais rápida da OMA e reduzia o número de crianças que posteriormente desenvolviam OME<sup>44,45</sup>. Inclusive, uma conferência de consenso Finlandês propôs indicações alargadas para a execução da miringotomia na OMA<sup>29</sup>. Em contraste, o nosso estudo não permitiu confirmar nem uma recuperação mais rápida da OMA nem um número significativamente inferior de casos com OME residual no grupo de ouvidos submetido a miringotomia. A única vantagem em termos estatísticos da associação da MIR ao tratamento antibiótico na presente série residiu num alívio mais precoce da otalgia/irritabilidade das crianças. Estes achados aproximam-se aos obtidos nos estudos de Kaleida et al.<sup>28</sup> e de Engelhard et al.<sup>18</sup>

Por último, os resultados do presente estudo realçam a importância do historial de OMA recorrente, como um dos maiores condicionantes do insucesso terapêutico a médio prazo (28<sup>o</sup> dia). Parece assim cada vez mais evidente que este tipo de criança constitui por si só um universo à parte na problemática da infecção otológica, na qual os factores de risco a que estão expostas desempenham certamente um papel preponderante. Além do mais, indicativos recentes apontam para que as situações de OMA recorrentes se estejam a tornar cada vez mais comuns<sup>27</sup>. Parece interessante especular, não obstante este estudo não ter sido desenhado para testar grupos específicos de OMA recorrente, que a miringotomia na OMA poderá ter um dos seus interesses exactamente neste tipo específico de doentes. Estudos anteriores sobre esta temática revelaram-se contraditórios<sup>28,33,45</sup>, ficando esta hipótese em aberto para investigações futuras.

## CONCLUSÕES

O presente estudo aponta para um interesse limitado da utilização da miringotomia como complemento à antibioterapia na OMA não-complicada. A única vantagem significativa associou-se à redução mais precoce da otalgia. Contudo, estas conclusões não implicam que a miringotomia nunca deva ser utilizada no tratamento destes doentes. Pelo contrário, a sua utilização deve ser sempre considerada na iminência de complicações supuradas ou quando se pretende um diagnóstico microbiológico consistente. Foi deste modo possível avaliar que o *S. pneumoniae* é destacadamente o agente isolado com maior frequência na OMA pediátrica na região do Porto, seguido do *H. influenzae* e uma frequência muito reduzida da *M. catarrhalis*. A relevância atingida pelo *S. pyogenes* foi superior ao descrito em séries recentes. Infelizmente, os índices de resistência aos antimicrobianos revelaram-se elevados a exemplo da tendência presente na maioria dos países da Europa meridional, constituindo mais um alerta sobre a atitude a seguir no tratamento da OMA na actualidade. Finalmente, a análise PCR dos fluidos aspirados revelou-se mais sensível que as culturas clássicas na identificação dos agentes infectantes.

## AGRADECIMENTOS

Estudo patrocinado pela Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde do Ministério da Saúde de Portugal (No.109/99).

Os autores agradecem a colaboração do Prof. Freitas da Fonseca pela disponibilização de meios para preservação térmica das amostras no Serviço de Microbiologia da F.M.P. Estão igualmente reconhecidos ao Prof. Henrique Barros e ao Dr. Correia da Fonseca pelo apoio demonstrado desde o início do projecto. Realçam ainda a colaboração prestimosa do Prof. Sten Hellström e da técnica sénior Cathrine Johanson, bem como do Dr. Duarte Freitas.



## REFERÊNCIAS

1. Alho O, Koivu M, Sorri M, et al.: The occurrence of acute otitis media in infants. A life-table analysis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1991; 21:7-14.
2. Balows A, Hausler W Jr, Herrmann K, Isenberg H, Shadomy H (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991.
3. Baquero F, Canton R, Baquero-Artigao F. Current patterns and evolution of antibiotic resistance among bacterial pathogens involved in acute otitis media. *Clin Microbiol Infect* 1997; Suppl.3: S26-S33.
4. Berche P, Gehanno P, Duval F, et al. Epidémiologie bactérienne des otites moyennes aiguës de l'enfant en France en 1993. *Lett Infectiol* 1994; Suppl.18:S11-S22.
5. Bjuggren G, Tunevall G. Otitis in childhood. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1967; 42: 137-146.
6. Bluestone C, Klein J. 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, 1996; pp. 446-457.
7. Brook I, Anthony B, Finegold S. Aerobic and anaerobic bacteriology of acute otitis media in children. *J Pediatr* 1978; 92: 13-15.
8. Brook I, Gober A. Reliability of the microbiology of spontaneously draining acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:571-573.
9. Conférence de Consensus de la SPILF sur les infections ORL. *Méd Mal Infect* 1997; 27:334-340.
10. Dagan R, Fliss D, Leibovitz E, et al. Antibiotic treatment in acute otitis media: "in vivo" demonstration of antibacterial activity. *Clin Microbiol Infect* 1997; Suppl 3: S43-S48.
11. Dagan R. Treatment of acute otitis media - challenges in the era of antibiotic resistance. *Vaccine* 2001; Suppl.19:S9-S16.
12. De Lencastre H, Kristinsson K, Brito-Avô A, et al. Carriage of respiratory tract pathogens and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* colonization in healthy children attending day care centers in Lisbon, Portugal. *Microbiol Drug Resist* 1999; 5:19-29.
13. Del Beccaro M, Mendelman P, Inglis A, et al. Bacteriology of acute otitis media: A new perspective. *J Pediatr* 1992; 120:81-84.
14. del Castillo F, Baquero-Artigao F, Garcia-Perea A. Influence of recent antibiotic therapy on antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in children with acute otitis media in Spain. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17:94-97.
15. Dowell S, Butler J, Giebink S, et al. Acute otitis media: management and surveillance in an era of pneumococcal resistance. A report from the Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. *Pediatr Infect Dis J*. 1999; 18:1-9.
16. Ehrlich G, Greenberg S (Eds.). *PCR-Based Diagnostics in Infectious Disease*. Blackwell Science Inc, Boston, MA, 1994.
17. Eldan M, Leibovitz E, Piglansky L, et al. Predictive value of pneumococcal nasopharyngeal cultures for the assessment of nonresponsive acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:298-303.
18. Engelhard D, Cohen D, Strauss N, et al. Randomised study of myringotomy, amoxicillin/clavulanate, or both for acute otitis media in infants. *Lancet* 1989; 2:141-143.
19. Felmingham D, Grüneberg R, The Alexander Project Group. 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* 2000; 45:191-203.
20. Gehanno P, Boucot I, Simonet M, et al. Epidémiologie bactérienne de l'otite moyenne aiguë chez l'enfant en région parisienne de 1987 à 1991: à propos de 1232 cas. *Lett Infectiol* 1991; 6:408-414.
21. Gehanno P, Barry B, Berche P. Acute

MIRINGOTOMIA NA OTITE MÉDIA AGUDA DA CRIANÇA.  
ESTUDO CLÍNICO E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PELO MÉTODO PCR

- childhood otitis media: the diagnostic value of bacterial samples from the nasopharynx. *Clin Microbiol Infect* 1997; Suppl. 3: S34-S35.
- 22 Geslin P, Fremaux A, Sissia G, et al. Resistance to betalactams and other antibiotics of pneumococcal strains isolated from acute otitis media: the French National Reference Center statement 1995-1996. *Arch Pediatr* 1998; 5:982-987.
  - 23 Gok U, Bulut Y, Keles E, et al. Bacteriological and PCR analysis of clinical material aspirated from otitis media with effusions. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2001; 60:49-54.
  - 24 González-Vallejo C, Sorum P, Stewart T, et al: Physician's diagnostic judgements and treatment decisions for acute otitis media in children. *Med Decision Making* 1998; 18: 149-162.
  - 25 Ibrahim A, Gerner-Smidt P, Sjöstedt A. Amplification and restriction endonuclease digestion of a large fragment of genes coding for rRNA as a rapid method for discrimination of closely related pathogenic bacteria. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2894-2896.
  - 26 Ibrahim A, Norlander L, Macellaro A, Sjöstedt A. Specific detection of *Coxiella burnetti* through partial amplification of 23S rDNA. *Eur J Epidemiol* 1997; 13: 329-334.
  - 27 Joki-Erkkilä V-P, Pukander J, Lappala P. Alteration of clinical picture and treatment of pediatric acute otitis media over past two decades. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2000; 55:197-201.
  - 28 Kaleida P, Casselbrant M, Rockette H, et al. Amoxicillin or myringotomy or both for acute otitis media: results of a randomized clinical trial. *Pediatrics* 1991; 87: 466-474.
  - 29 Karma P, Palva T, Kouvalainen K, et al. Finnish approach to the treatment of acute otitis media. Report of the Finnish Consensus Conference. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1987; Suppl.96:S1-S19.
  - 30 Klein J. Microbiology of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1980; Suppl. 68: S98-S101.
  - 31 Klein J. Bacterial resistance and antimicrobials drug selection. In: Rosenfeld R and Bluestone C (eds.) *Evidence-Based Otitis Media*. BC Decker, Hamilton, Ontario 1999; pp293-302.
  - 32 Le Bideau M, Mouzard A, Chamoux C, et al. Étude bactériologique au cours de l'otite moyenne aiguë. *Arch Pediatr (Paris)* 1997; 4: 213-218.
  - 33 Lidén M, Flodstrom A, Thore M. Treatment of early recurrences of acute purulent otitis media; value of myringotomy. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1988; 106:441-447.
  - 34 Loundon N, Roger G, VuThien H, et al. Evolution of the bacteriologic features of persistent acute otitis media compared with acute otitis media: a 15-year study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 125:1134-1140.
  - 35 Luotonen J, Reva E, Karma P, et al. The bacteriology of acute otitis media in children with special reference to *Streptococcus pneumoniae* as studied by bacteriological and antigen detection methods. *Scand J Infect Dis* 1981; 13:177-183.
  - 36 Melo-Cristino J, Fernandes M and The Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens. *Streptococcus pyogenes* isolated in Portugal: macrolide resistance phenotypes and correlation with T types. *Microbiol Drug Resist* 1999; 5:219-225.
  - 37 Melo-Cristino J, Fernandes M, Serrano N, et al. A multicenter study of the antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from patients with community-acquired lower respiratory tract infections in 1999 in Portugal. *Microb Drug Resist* 2001; 7: 33-38.
  - 38 Melo-Cristino J, Fernandes M, Serrano N, et al. Susceptibilidade aos antimicrobianos de *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumo-*

- niae e *Moraxella catarrhalis* de infecções respiratórias adquiridas na comunidade em 2000. *Acta Med Port* 2001b;14: 459-468.
- 39 Monteiro L, Acosta L, Calado V. Contribuição para o estudo da prevalência bacteriana da otite média aguda da criança em Portugal. *Rev Port ORL* 1999; 37: 193-200.
- 40 National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobials disk susceptibility tests. 5th ed. Approved Standard. NCCLS Document M2-A5, Villanova, PA, 1993; pp13.
- 41 O'Callaghan C, Morris A, Kirby S, et al. Novel method for detection of beta-lactamase by using a chromogenic cephalosporin substract. *Antimicrob Agents Chemother* 1972; 1:283-288.
- 42 Pichichero M. Acute otitis media: part II. Treatment in an era of increasing antibiotic resistance. *Am Fam Phys* 2000; 61: 2410-2416.
- 43 Post J, Preston M, Aul J, et al. Molecular analysis of bacterial pathogens in otitis media with effusion. *JAMA* 1995; 273: 1598-1604.
- 44 Puhakka H, Virolainen E, Tuohimaa P, et al. Myringotomy in the treatment of acute otitis media in children. *Acta Otolaryngol* 1979; 88:122-126.
- 45 Qvarnberg Y. Acute otitis media. A prospective clinical study of myringotomy and antimicrobial treatment. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1981; 375:1-157.
- 46 Rodriguez W, Schwartz R, Thorne M. Increasing incidence of penicillin-and ampicillin-resistant middle ear pathogens. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:1075-1078.
- 47 Rosenfeld R, Vertrees J, Carr J, et al. Clinical efficacy of antimicrobials drugs for acute otitis media: Metaanalysis of 5400 children from thirty-three randomized trials. *J Pediatr* 1994; 124:355-367.
- 48 Sakamoto M, Sugasawa M, Tanigushi M. -Otogenic meningitis caused by the pneumococci that had acquired resistance to cephalosporins. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 124:350-351.
- 49 Schappert S. Office visits for otitis media: United States, 1975-90. *Adv Data* 1992; 214:1-19.
- 50 Schwartz R, Rodriguez W, Grundfast K. Duration of middle ear effusion after acute otitis media. *Pediatr Infect Dis* 1984; 3: 204-207.
- 51 Schwartz R, Rodriguez W, Hayden G et al. The reevaluation visit for acute otitis media. *J Fam Pract* 1987; 24:145-148.
- 52 Spratley J, Hellström S, Eriksson PO, Pais-Clemente M. Early structural tympanic membrane reactions to myringotomy: a study in an acute otitis media model. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 2002; 122: 479-487.
- 53 Steele R, Suskind-Liu D. Microbiology. In: Steele R and Suskind-Liu D (Eds.) *Contemporary Diagnosis and Management of Otitis Media*, Handbooks and Health Care Co., Newtown, PN, 2000; pp. 49-66.
- 54 Stool S, Field M. The impact of otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 1989; Suppl.1: S11-S14.
- 55 Szucz E, Diependaele R, Clement P. The accuracy of tympanometry assessed by its sensitivity and specificity. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1995; 49:287-292.
- 56 Teele D, Klein J, Rosner B et al. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: a prospective, cohort study. *J Infect Dis* 1989; 160:83-94.
- 57 Van Buchem F, Dunk J, van't Hof M. Therapy of acute otitis media: myringotomy, antibiotics or neither? A double blind study in children. *Lancet* 1981; 8252:883-887.
- 58 Vaz-Pato M, Carvalho C, Tomasz A. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Portugal. A multicenter study between 1989 and 1993. *Microb Drug Resist* 1995; 1:59-69.
- 59 Virolainen A, Salo P, Jero J, et al. Comparison of PCR assay with bacterial culture for detecting *Streptococcus pneumoniae* in middle ear fluid of children with acute otitis media. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2667-2670.

## Publicação IV

---

*Myringotomy delays the tympanic membrane recovery  
in acute otitis media. A study in a rat model*

Laryngoscope 2002; 102: 1474-1481.

The Laryngoscope  
Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Philadelphia  
© 2002 The American Laryngological,  
Rhinological and Otolological Society, Inc.

# Myringotomy Delays the Tympanic Membrane Recovery in Acute Otitis Media: A Study in the Rat Model

Jorge Spratley, MD; Sten Hellström, MD, PhD; Per-Olof Eriksson, MD; Manuel Pais-Clemente, MD, PhD

**Background/Hypothesis:** Acute otitis media is a major cause of visits to pediatric health care providers. Myringotomy in uncomplicated acute otitis media is debatable today. The study addressed this problem through the otomicroscopic and histopathological observations of the events occurring in the tympanic membrane during the first week after myringotomy. **Study Design:** Randomized study in an experimental animal model. **Methods:** Under anesthesia, the left middle ear of 36 Sprague-Dawley rats was inoculated with *Streptococcus pneumoniae* type 3. Forty-eight hours later, at day 0, four animals were immediately killed and the remaining animals were randomly assigned into a myringotomy group (n = 16, myringotomy on the left ear) and a non-myringotomy group (n = 16, otomicroscopy without myringotomy). Otomicroscopy and killings were performed in series of four animals from each group at days 1, 2, 4, and 7 after myringotomy. Tympanic membranes were collected after fixation and processed for light and electron microscopy. **Results:** All inoculated ears showed a manifest acute otitis media at day 0. An intense infiltration by inflammatory cells and edema distorted severely the tympanic membrane structure. These findings decreased the following days. However, inflammation as evaluated by the thickness and the cytoarchitecture of the tympanic membrane layers, recovered significantly faster in the membranes in the non-myringotomy group. At day 7, all tympanic membranes in the myringotomy group were closed by a hypertrophic keratinizing epithelium and a remodeling connective tissue layer, whereas the animals in the non-myringotomy group had a residual edema in the lamina propria. **Conclusions:** The present infectious model in-

duced an intense inflammatory reaction within the entire structure of the tympanic membrane. Myringotomy provoked a delayed recovery from the inflammatory process within the tympanic membrane. Therefore, if applicable to human conditions, the use of myringotomy in the management of acute otitis media should be restricted to selected cases of acute otitis media. **Key Words:** Otitis media, tympanic membrane, myringotomy, rat, *Streptococcus pneumoniae*.

*Laryngoscope*, 112:1474-1481, 2002

## INTRODUCTION

Acute otitis media (AOM) persists as one of the most frequent infections of childhood,<sup>1</sup> being second only to the common cold as a reason for visits to pediatric health care providers.<sup>2</sup> An extensive U.S. survey indicated a growing incidence of acute ear infections, with an increase of almost 40% between 1982 and 1990.<sup>3</sup> Furthermore, the risk of complications is not negligible and might be increasing among certain communities.<sup>4</sup> *Streptococcus pneumoniae* is the bacterium most frequently involved in AOM, and the emergence of penicillin-resistant strains has been a cause of major concern.<sup>5</sup>

In the past, myringotomy was a commonly recommended procedure for the treatment of AOM, granting middle ear pressure alleviation with immediate pain relief, on the one hand, and allowing microbiological harvest and identification on the other. However, the advantages of routine myringotomy in uncomplicated AOM became a matter of debate as a result of the progressive introduction of efficient antimicrobial treatment. Various clinical reports have provided evidence either in favor of myringotomy<sup>6,7</sup> or against<sup>8,9</sup> such a systematic practice. Despite this controversy, absolute clinical indications for myringotomy in AOM today still stand in special clinical situations.<sup>10</sup> Therefore, further investigation around this subject is desirable.

Previous reports<sup>11-18</sup> were dedicated to the medium- and long-range aspects of tympanic membrane (TM) recovery following myringotomy in provoked middle ear inflammation in animal models. However, to our knowledge, the events that occur during the first days that follow the incision of the acutely inflamed TM have not been re-

From the Department of Clinical Sciences, Otorhinolaryngology (J.S., S.H., P.-O.E.), University Hospital of Northern Sweden, Umeå, Sweden, and Department of Otorhinolaryngology (J.S., M.P.-C.), University of Porto Medical School Hospital, Porto, Portugal.

Supported by the Swedish Medical Research Council (grant K200073X-06578-18C), the Swedish Society for Medical Research, the Medical Faculty of Umeå University, Sjuhusetsmedel Västerbotten County Council, and Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde de Portugal (grant 109/99).

Editor's Note: This Manuscript was accepted for publication January 2, 2002.

Send Correspondence to Jorge E. Spratley, MD, Department of Otorhinolaryngology, University of Porto Medical School, Hospital de São João, 4202-451 Porto, Portugal. E-mail: jspratley@mail.telecap.pt

ported to date. The present study aimed to fill this gap by means of an otomicroscopic and histopathological investigation of the early TM findings resulting from myringotomy during the course of AOM.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental Design

Thirty-six healthy adult Sprague-Dawley rats (weight, 250–300 g) were used in the study. The research protocol and animal housing conditions were in accordance with the University of Umeå (Umeå, Sweden) Ethical Committee for Animal Studies. Under general anesthesia by use of methohexital (Brietal, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN) administered through a tail vein, all animals had their normal status of the TM checked under the otomicroscope. Through a ventral skin neck incision, the left-side tympanic bulla was exposed and punctured with a scalpel, and the middle ear cavity was entirely filled (approximately 50 mL) with an inoculum of Todd-Hewitt broth containing  $5 \times 10^7$  colony-forming units (cfu)/mL *S pneumoniae* type 3 bacteria. The right-side bulla was left intact. The animals were kept in the same standard housing environment. Two days later (designated as day 0), all rats had developed typical signs of AOM in the inoculated ears, as confirmed by otomicroscopy under Brietal anesthesia. Before initiating the myringotomies, four animals chosen at random were immediately killed and their tympanic membranes collected for microscopic analysis. The remaining rats were randomly assigned to one of two groups of 16 animals each: In one group (the "MYR group"), the left ear of the animals was treated with a myringotomy occupying the posterior superior quadrant of the pars tensa, which was performed with a sterile microscalpel; in the other group (the "non-MYR group"), the tympanic membranes were left untouched. No aspiration of pus from the middle ear cavity was performed. Thereafter, otomicroscopy and killings with the animals under an overdose of intraperitoneal pentobarbital (Pentobarbitalnatrium, Apoteksbolaget AB, Stockholm, Sweden) were performed sequentially in series of four animals from each group on days 1, 2, 4, and 7, as scheduled. Half the number of the animals killed at every time interval had the tympanic membranes processed for plastic embedding, and the other half, for paraffin embedding.

### Plastic Embedding

Immediately after death the animals were decapitated, and each tympanic bulla was widely opened and filled with a fixative solution composed of 3% glutaraldehyde in a 0.075-mol/L sodium cacodylate buffer (pH 7.4) with 4% polyvinylpyrrolidone and 0.02 mol/L CaCl<sub>2</sub> added. After further immersion of the temporal bones in the same 4°C refrigerated fixative for at least 24 hours, the tympanic membranes and the adjacent external ear canal skin were dissected free from their insertion in the tympanic bone. The pars tensa (PT) and the pars flaccida (PF) were split apart with a sharp microknife, and specimens were rinsed in the same cacodylate buffer and postfixed overnight in 1% OsO<sub>4</sub>. After further rinsing, the tissues were dehydrated with increasing concentrations of ethanol and embedded in a plastic resin (Polybed, Polysciences Inc., Warrington, PA). Semithin (1 mm) and ultrathin (70 nm) horizontal sections perpendicular to the handle of the malleus were cut on an ultramicrotome (Reichert Ultratuc S, Leica, Austria). For light microscopy studies (Zeiss Axiophot, Göttingen, Germany) the specimens were stained with toluidine blue. The ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined in an electron microscope (Jeol-1200EX, Tokyo, Japan).

### Paraffin Embedding

After decapitation and opening of the bullae, the heads were put into a solution of 4% buffered formalin in physiological saline (pH 7.0) and fixed by microwave oven irradiation (Miele M-696, Gütersloh, Germany) set at 700 W until reaching 45°C, as previously reported.<sup>11</sup> After this procedure, the temporal bones were transferred to 0.1 mol/L phosphate buffered saline (pH 7.35) and further immersed at 4°C for 24 hours. Tympanic membranes were dissected out under the stereomicroscope, dehydrated in upgraded concentrations of alcohol to xylene, and embedded in paraffin. Sections of 4 mm were cut perpendicular to the handle of the malleus, placed on albumin-coated slides, and left at room temperature until dried for routine hematoxylin-eosin staining.

### Morphometric Analysis

The measurements of TM thickness were performed in three standardized segments at two different levels of both superior quadrants of the PT and the PF. For this purpose, a scale micrometer was adapted to the binocular light microscope under an oil immersion objective at  $\times 100$  magnification. The thickness values are expressed as mean  $\pm$  SD for each quadrant. Results were analyzed with the Student *t* test for differences between the mean values of two groups as independent samples.

## RESULTS

### Otomicroscopic Observations

At day 0, all inoculated ears presented tympanic membranes indicating fully developed AOM, manifested by reddened and extremely bulging tympanic membranes. In approximately 75% of the cases, a fibrin-like exudate partially covered the TM surface as well as the congested external auditory canal (EAC) walls. Three cases (two from the MYR group and one from the non-MYR group) showed an abundance of purulent secretions accumulating in the EAC indicating spontaneous perforations of the tympanic membranes. On incision of the tympanic membranes, purulent secretions escaped from the middle ear cavity. At day 1, the presence of pus in the EAC precluded the visualization of the TM surfaces in the incised group, whereas the non-MYR eardrums maintained a highly inflamed status. At day 2, all myringotomies were patent but the amount of otorrhea had diminished considerably. The PF in each case appeared to be retracted and opalescent. In the group of non-touched tympanic membranes the otomicroscopic landmarks were slightly more distinct, despite the persistence of inflammation and an intense vasodilation, both in the PT and in the PF. At day 4, all myringotomized tympanic membranes were still opaque and two tympanic membranes depicted a yellow discoloration suggesting the persistence of effusion material within the middle ear cavity, mainly medial to the PF. At this time, three-fourths of the perforations were sealed by a crust of apparently dried secretions and surrounded by dilated vessels. In comparison, three-fourths of the nonincised membranes had returned to a neutral position indicating a resolution of the purulent middle ear effusion. Scattered debris, possibly related to keratin desquamation, gave a cobblestone appearance to the PT. Dilated vessels persisted along the malleus handle and the annulus region. By day 7, all perforations had healed and a scar remained in the posterosuperior quadrant. Dilated vessels were still visible along the handle of the malleus and in

the annulus region emerging to the healed myringotomy area. However, inflammation had clearly abated in the nonperforated quadrant and in the PF. On the other hand, the non-MYR eardrums had regained an almost normal otomicroscopic appearance, yet with a slight lack of brightness and transparency.

### Structural Observations

**Pars tensa.** On day 0 (Fig. 1A, B), the inflammatory reaction induced by the *S. pneumoniae* inoculum caused an extensive disarrangement of all layers of the PT. The infiltration of polymorphonuclear neutrophils led to distorted zones of the external epidermal layer forming pus-filled blebs. These blebs seemed to spontaneously rupture, leaving the denuded, dense collagenous layer as the sole continuous support of the central regions of the PT. Vessels were maximally dilated in the lamina propria of the malleolar and annular regions. The mucosal layer was difficult to distinguish from the abundant purulent secretions filling the middle ear cavities.

At day 1 after myringotomy, the borders of the incision were already partially lined by a layer of activated keratinocytes intermingled with polymorphonuclear neutrophils, predominantly on the side of the handle of the malleus. Pus was seen across the perforation. The lamina propria was intensely infiltrated by polymorphonuclear neutrophils, vacuolated macrophages, and lymphocytes. In the non-MYR group the PT was still thickened because of the extensive inflammation, but the three basic layers started to become distinct again in the entire extension of the eardrum. Inflammatory cells were organized like palisades amid the middle layer fibers.

On day 2, the edges of the myringotomy opening started to approach each other through proliferating keratinocytes underlying a thick aggregate of keratin and inflammatory cells. The thickness of both the perforated and nontouched quadrants were greatly increased because of a thickening of all three TM layers (Fig. 2A, B). In comparison, the thickness of the nonperforated tympanic membranes was decreasing, although edema and cellular inflammatory activity were still present (Fig. 2C, D).

On day 4, two perforations were closed by a crust of a substance, apparently composed of keratin mixed with pus and fibrin. Keratinocytes, along with capillaries, were seen in the advancing front of the perforation border (Fig. 3A and B). One myringotomy was healed with a triple-layered structure. Within the lamina propria of the specimen a distorted connective tissue was seen in connection with keratin cysts, which were surrounded by large macrophages. The fourth perforation was closing at a slower pace. In the non-MYR group (Fig. 3C, D), the infection had abated significantly and the PT was comparatively thinner. Engorged fibroblasts and some residual mononuclear inflammatory cells occurred in the vicinity of dilated vessels within the loose connective tissue over the malleus. Signs of inflammatory-induced osteoneogenesis were observed in the malleus handle. The mucosa still had a cuboid appearance, and keratin debris covered the epidermal layer.

By day 7, all myringotomies were healed. The external epidermal layer constituted a continuous sheet but

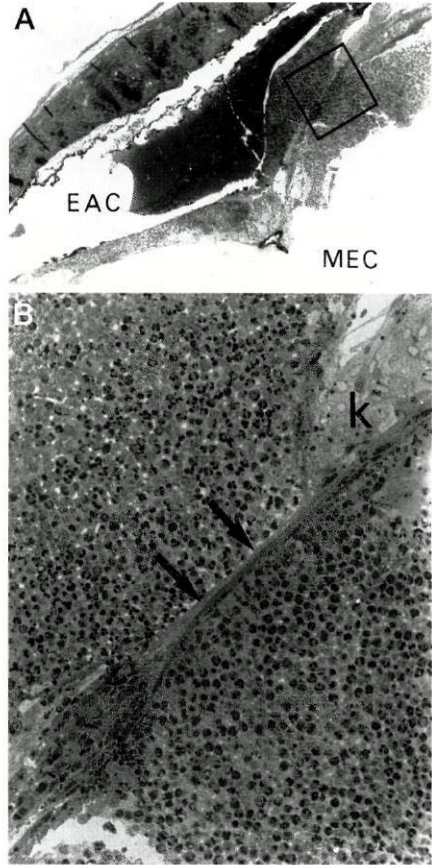


Fig. 1. Light micrograph of a semithin section from an infected tympanic membrane (TM) before myringotomy, at day 0 (toluidine blue stain). (A) Survey picture depicting a severely inflamed TM. MEC = middle ear cavity; EAC = external auditory canal (original magnification  $\times 30$ ). (B) Detail of image shown in (A) (box). Denuded layer of dense connective tissue fibers keeping the integrity of the TM (arrows) is evident. Keratinizing layer (k) (original magnification  $\times 220$ ).

was still thick and active, showing various rows of enlarged keratinocytes with indentations in the basal lamina and prominent nuclei. A blanket of keratin covered the previously perforated area. Remodeling activity persisted within the thickened lamina propria of the traumatized quadrant through the presence of activated fibroblasts, macrophages, and occasional mast cells among whirls of connective tissue fibers and residual edema (Fig. 4A, B).

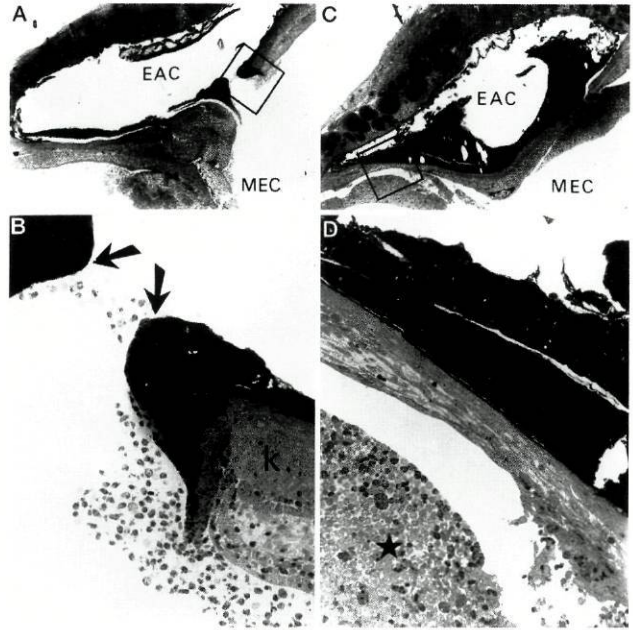


Fig. 2. Light micrographs of semithin sections from tympanic membranes at day 2 (toluidine blue stain). (A) Survey picture of a myringotomized TM showing an healing perforation (original magnification  $\times 30$ ). (B) Detail of image shown in (A) (box). Keratin spurs are evident on the active borders of the perforation (arrows). Hypertrophic keratinizing layer (K) (original magnification  $\times 220$ ). (C) Survey picture of a non-myringotomized TM (original magnification  $\times 30$ ). (D) Detail of image shown in (C) (box). Compare smaller TM thickness with that shown in (B). Purulent fluid in middle ear cavity (star) is evident (original magnification  $\times 220$ ).

In the light and electron microscopes a few myringosclerotic lesions could be confirmed between the connective tissue layer fibers, mainly at the nonperforated anterosuperior quadrant. In the non-MYR group (Fig. 4C, D), each PT, although slightly thickened because of persisting dilated fibroblasts and residual edema in the lamina propria, had returned to an almost normal appearance. No myringosclerotic lesions were visualized in this group. The statistical significance of the differences in thickness between the MYR and non-MYR groups, as measured on the anterosuperior and posterosuperior quadrants of PT throughout the study, are depicted in Figure 5.

**Pars flaccida.** The *S. pneumoniae* inoculum also induced a pronounced inflammatory reaction in the PF, as observed at day 0. The PF was approximately 4.5 times increased in overall thickness, resulting from a reaction within all the three layers. The epidermal layer showed as many as six rows of swollen and keratohyalin granule-filled cells. The lamina propria exhibited an acute inflammatory cell invasion with great amounts of polymorphonuclear neutrophils and macrophages. Mast cells were highly deprived of granules. Vessels were dilated, and extravascular erythrocytes could also be observed between swollen fibroblasts. The epithelium facing the middle ear cavity was composed of tall, columnar, intensely granulated goblet-like cells. Microvilli could be detected on the cell surfaces. An increased number of ciliated cells was

also apparent. Areas of the disrupted mucosal lining acted as gateways to the passage of inflammatory cells directly into the middle ear cavity.

The inflammatory features tended to diminish over time in both groups. The decrease in cellular infiltration and PF thickness paralleled each other from day 0 until day 7, in both groups (Fig. 5). At day 7, sparse myringosclerotic lesions in the proximity of fibroblasts and macrophages were detected in the submucosal region in the MYR group only (Fig. 6).

## DISCUSSION

The early response of the rat TM after myringotomy in a *S. pneumoniae*-induced AOM animal model was sequentially evaluated. The current report follows a series of studies performed at our laboratory<sup>15-17</sup> that were related to the early stages of the TM response after provoked inflammation.

The present investigation indicates that myringotomy in AOM does not lead to a faster recovery of the inflammatory process within the TM structure. Moreover, when compared with infected non-myringotomized ears, it even retards this recovery. These effects were detected in both the PT and the PF, although statistical significance was found only in the PT. It was also apparent that the three layers, which compose the TM structure, were intensely affected by the inflammatory response either in



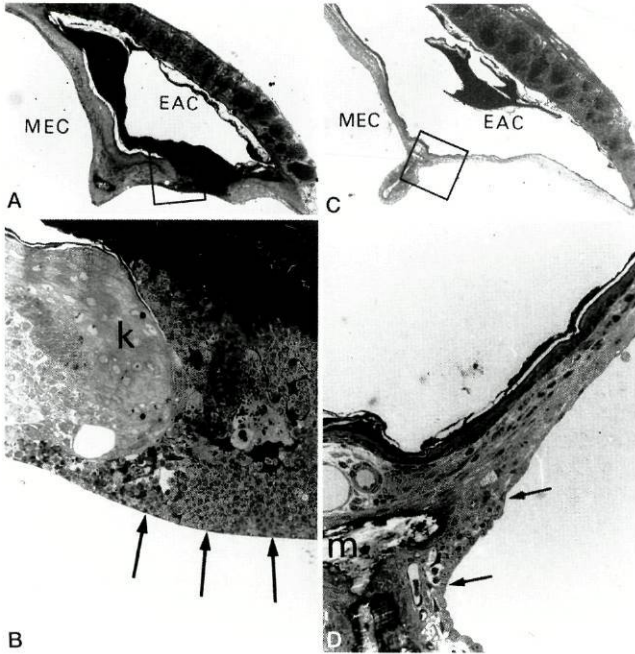


Fig. 3. Light micrographs of semithin sections from tympanic membranes at day 4 (toluidine blue stain). (A) Survey picture of a myringotomized TM showing a closed perforation (original magnification  $\times 30$ ). (B) Detail of image shown in (A) (box). The gap of the perforation is bridged by a matrix of keratin and inflammatory and epithelial cells (long arrows). Keratinocyte layer (K) is evident (original magnification  $\times 220$ ). (C) Survey picture of a non-myringotomized TM representing the fast, spontaneous recovery from acute otitis media (original magnification  $\times 30$ ). (D) Detail of image shown in (A) (box). Dilated vessels adjacent to a handle of the malleus showing areas of osteoneogenesis (m) are evident, as is the cuboid epithelium in mucosa layer (small arrows) (original magnification  $\times 220$ ).

the combat against infection or in response to the additional stress caused by myringotomy.

Our results support those in a previous investigation by Magnuson et al.,<sup>12</sup> in which the effects of myringotomy in AOM during a longer range of time were studied. It was concluded that the combination of infection and myringotomy causes more long-lasting changes in the TM structure than infection alone. Such structural changes were mostly related to the connective tissue layer, and extrapolations were considered about spots of TM weakness and the associated risk of development of retraction pockets. The present study shows that a distortion of the collagenous layer, seen as whirls of fibers and fibroblasts oriented with their axes of length nonparallel to the TM surface, is detectable early after myringotomy. The denuded, dense collagenous fiber layer remains in AOM and will alone resist all the forces generated across the TM during infection, if not spontaneously ruptured. It appears that the incision of this thin remaining layer is per se responsible for the vast disarrangement of the entire lamina propria. It is also evident that in the absence of such a continuous scaffold, the external keratinizing squamous epithelium faces increased difficulties in progressing to a *restitutio ad integrum* in comparison with the more linear advancement of the keratinocytes in the non-MYR group. Interestingly, recurrent AOM is reported to be capable of de-

laying the natural maturation of normal elastic fibers in the pediatric TM and to provoke the destruction of existing ones, as shown by Ruah et al.<sup>18</sup> in a human temporal bone study.

The finding that a considerable number of perforations in infected ears closed early after myringotomy reinforces the strong capacity of the rat TM to heal in AOM. In fact, it seems to close faster in AOM than the 9- to 11-day period reported earlier for noninflamed tympanic membranes.<sup>11</sup> One may assume that it is inflammatory cells or substances that contribute to this faster healing. Such a quick pattern of closure could be compared with the fate of spontaneous TM perforations observed in children recovering from AOM.<sup>19</sup> If our results could be transferable to human conditions, cold-knife myringotomy in AOM should be regarded mainly as a short-term drainage procedure for hyperacute situations because the duration of middle ear aeration appears to be limited.

It is possible that the use of CO<sub>2</sub> laser in assisting myringotomy may extend the duration of middle ear aeration in AOM, as previously reported in patients with nonacute middle ear conditions<sup>20</sup> as well as in studies with normal animals.<sup>21,22</sup> However, it appears that CO<sub>2</sub> laser-assisted myringotomy is technically more challenging in patients with AOM, because of the increase in thickness and bulging of the acutely inflamed tympanic

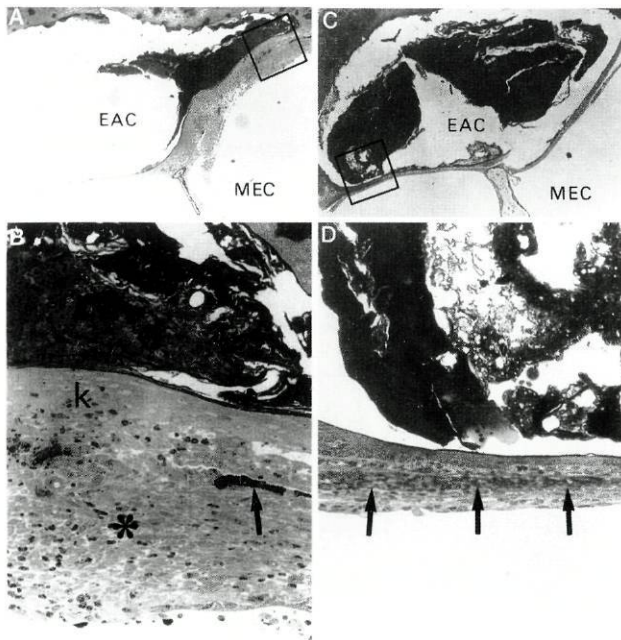


Fig. 4. Light micrographs of semithin sections of tympanic membranes at day 7 (toluidine blue stain). (A) Survey picture of a myringotomized TM showing a thick injured quadrant (original magnification  $\times 30$ ). (B) Detail of image shown in (A) (box). The interrupted dense collagen fibers (arrow) and distorted middle connective tissue layer (asterisk) are evident, as is the keratinocyte layer (K) (original magnification  $\times 220$ ). (C) Survey picture of a non-myringotomized TM (original magnification  $\times 30$ ). (D) Detail of image shown in (A) (box). The reduced thickness of the TM and the preserved dense collagenous fibers (arrows) are evident (original magnification  $\times 220$ ).

membranes.<sup>23</sup> Furthermore, in a recent otomicroscopic study in normal chinchillas by Valtonen et al.,<sup>22</sup> at 7 weeks, lancet myringotomy was associated with less residual thickening of the TM, less visibility of the myringotomy site, and less tympanosclerosis when compared with CO<sub>2</sub> laser-assisted myringotomy. As such, further histopathological research is necessary to clarify the effects on the TM from CO<sub>2</sub> laser-assisted myringotomy in the course of AOM.

In our study, myringosclerotic deposits were found only in the MYR group, but in both the PT and the PF. These findings add further evidence to the postulation of Mattsson et al.,<sup>13</sup> that a single episode of a bacterial infection in the middle ear cavity alone is not sufficient to provoke the development of sclerotic lesions in the rat TM. In that study, in which myringosclerosis formation was evaluated at 1 and 3 months after TM perforation, a particular emphasis was put on the possible influence of oxygen-free radicals in the wounded area. It is attractive to accept this hypothesis because the topical application of substances with scavenger properties onto myringotomized tympanic membranes decreased the development of myringosclerosis.<sup>24,25</sup> It is conceivable that the radicals created by the shear stresses on the collagen fibers during myringotomy<sup>26</sup> could act in conjunction with those oxygen-derived free radicals released by the concurrent infection. Moreover, a possible influence of an immunolog-

ically mediated process cannot be excluded. Thus, Schiff et al.<sup>27</sup> claimed that the myringosclerosis might be triggered by the exposure of damaged collagen to the intense immunologically active cell infiltrate. The presence of macrophages, being great producers of toxic superoxide radicals,<sup>28</sup> observed in the vicinity of the sclerotic lesions in our present study could support the previous assumptions.

A recent Swedish Consensus recommendation for the treatment of AOM advocates watchful waiting and withholding of any antibiotics in AOM during the first 48 hours, if the child is older than 2 years of age.<sup>29</sup> The recommendation rested on evidence-based science and, as a matter of fact, extensive clinical studies have shown that more than 80% of AOM episodes are self-resolving.<sup>30</sup> Our investigation in an animal model also showed that middle ear infection can resolve spontaneously within approximately a week despite the strong purulent process present at the earlier stages of AOM. Hermansson et al.<sup>31</sup> noticed a similar recovery of infection in the *S. pneumoniae*-infected ears during a comparative study in which purulent otitis media had been caused by various bacteria. These results show that the acutely inflamed TM possesses a pronounced potential for repair in response to infection. Furthermore, according to the present findings, it could be inferred that myringotomy does not accelerate the cure from infection but, in contrast, delays the recovery of inflammation within the TM.

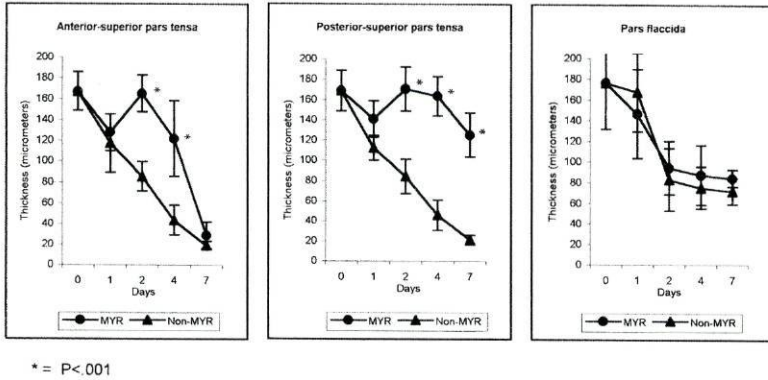


Fig. 5. Mean thickness (in micrometers) and standard deviations of myringotomized tympanic membranes (solid circle) versus non-myringotomized tympanic membranes (solid triangle) in acute otitis media at days 1, 2, 4, and 7 of study. Values for day 0 represent measurements of TM thickness before myringotomies were initiated. \* =  $P < .001$ .

## CONCLUSION

The transbular inoculation of  $10^7$  cfu/mL *S. pneumoniae* caused an intense AOM in the rat. This AOM tended to be self-limited, and myringotomy did not accelerate this process. Furthermore, the rat TM showed a

great capacity for healing in AOM as represented by an early closure of the myringotomy incision. However, structural changes were observed in all layers of the TM at the early stages after myringotomy. These alterations were mostly noticeable as a changed structure of the lamina propria concomitant with the appearance of myringosclerotic deposits. Transferred to clinical conditions, the results of the present study suggest contention concerning a liberal use of myringotomy in uncomplicated AOM.



Fig. 6. Electron micrograph of a myringotomized TM depicting multilamellar myringosclerotic lesions (arrows) becoming confluent in the submucosal region of pars flaccida at day 7. Bar = 1  $\mu$ m.

## Acknowledgments

The authors thank Bengt Lundquist, senior lecturer at the Department of Statistics, University of Umeå, for statistical analysis, Carin Olofsson for kind help in obtaining bacteriological specimens from the Department of Microbiology, University of Umeå, and Cathrine Johansson and Ann-Louise Grehn for their skillful technical and photographic assistance.

## BIBLIOGRAPHY

- Freid V, Makuc D, Rooks R. Ambulatory health care visits by children: principal diagnosis and place of visit. *Vital Health Stat. 13* 1998;137:1-23.
- Hoekelman R. Infectious illness during the first year of life. *Pediatrics* 1977;59:119-123.
- Schaappert S. Office visits for otitis media: United States, 1975-90. *Adv Data* 1992;214:1-19.
- Spratley J, Silveira H, Alvarez I, Pais-Clemente M. Acute mastoiditis in children: review of the current status. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2000;56:33-40.
- Dowell, Butler J, Giebink G, et al. Acute otitis media: management and surveillance in an era of pneumococcal resistance—a report from the Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:1-9.
- Qvarnberg Y. Acute otitis media: a prospective clinical study of myringotomy and antimicrobial treatment. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 1981;375:S1-S75.
- Karma P, Palva T, Kouvalainen K, et al. Finnish approach to

- the treatment of acute otitis media: report of the Finnish Consensus Conference. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1987;129:S1-S19.
8. Van Buchem F, Dunk J, van't Hof M. Therapy of acute otitis media: myringotomy, antibiotics or neither? A double-blind study in children. *Lancet* 1981;2:883-887.
  9. Kaleida P, Casselbrant M, Rockette H, et al. Amoxicillin or myringotomy or both for acute otitis media: results of a randomized clinical trial. *Pediatrics* 1991;87:466-474.
  10. Bluestone C, Klein J. Otitis media, atelectasis and eustachian tube dysfunction. In: Bluestone C, Stool S, Kenna M, eds. *Pediatric Otolaryngology*, vol 2. Philadelphia: WB Saunders, 1996:388-582.
  11. Stenfors L-E, Carlsöö B, Winblad B. Structure and healing capacity of the rat tympanic membrane after eustachian tube occlusion. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1981;91:75-84.
  12. Magnuson K, Hermanson A, Hellström S. Healing of the tympanic membrane after myringotomy during *Streptococcus pneumoniae* otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:397-404.
  13. Mattsson C, Magnuson K, Hellström S. Myringotomy: a prerequisite for the development of myringosclerosis? *Laryngoscope* 1998;108:102-106.
  14. Hellström S, Tengblad A, Hedlund U, Johansson C, Axelsson E. An improved technique for hyaluronan histochemistry using microwave oven irradiation. *Histochem J* 1990;22:677-682.
  15. Magnuson K, Hellström S. Early structural changes in the rat tympanic membrane during pneumococcal otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994;251:393-398.
  16. Mattsson C, Johansson C, Hellström S. Myringosclerosis develops within 9 h of myringotomy. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1999;61:31-36.
  17. Hellström S, Mattsson C, Eriksson P-O. 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, Lim D, eds. *New Frontiers In Immunobiology*. The Hague: Kugler, 2000:3-7.
  18. Ruah C, Schachern P, Paparella M, Zelterman D. Mechanisms of retraction pocket formation in the pediatric tympanic membrane. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 118:1298-1305.
  19. Berger G. Nature of spontaneous tympanic perforations in acute otitis media in children. *J Laryngol Otol* 1989;103: 1150-1153.
  20. Silverstein H, Kuhn J, Choo D, Krespi Y, Rosenberg S, Rowan P. Laser-assisted tympanostomy. *Laryngoscope* 1996;106:1067-1074.
  21. Söderberg O, Hellström S, Stenfors L-E. Myringotomy made by CO<sub>2</sub> laser: an alternative to the ventilation tube? An experimental study. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1984;97: 335-341.
  22. Valtonen H, Poe D, Shapshay S. Experimental CO<sub>2</sub> laser myringotomy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;125: 161-165.
  23. Reilly J, Deutch E, Cook S. Laser-assisted myringotomy for otitis media: a feasibility study with short-term followup. *Ear Nose Throat J* 2000;79:650-657.
  24. Mattsson C, Marklund S, Hellström S. Application of oxygen free radical scavengers to diminish the occurrence of myringosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106: 513-518.
  25. Spratley J, Hellström S, Mattsson C, Pais-Clemente M. Topical ascorbic acid reduces the myringosclerosis in perforated tympanic membranes: a study in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001;110:585-591.
  26. Lesser T, Williams K, Skinner D. Tympanosclerosis, grommets and shear stresses. *Clin Otolaryngol* 1988;13: 375-380.
  27. Schiff M, Poliquin J, Cantazaro A, Ryan A. Tympanosclerosis: a theory of pathogenesis. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1980;89:S1-S16.
  28. Rossi F, Bellavite P, Berton G, Grzeskowiak M, Papini E. Mechanism of production of toxic oxygen radicals by granulocytes and macrophages and their function in the inflammatory process. *Path Res Pract* 1985;180:136-142.
  29. Prellner K, Mølsted S. Treatment of acute otitis media in children—results of a consensus conference. Arranged by the National Board of Health and Welfare, the Swedish Medical Research Council, and the Swedish Association of County Councils. Prellner K, Mølsted S, eds. Västeråker, Sweden, AB CO Ekblad & Co, [ISSN:0281-6881, ISBN: 91-85547-26-3] 2000:1-24.
  30. Rosenfeld R. Natural history of untreated otitis media. In: Rosenfeld R, Bluestone C, eds. *Evidence-Based Otitis Media*. Hamilton Ontario: BC Decker, 1999:157-177.
  31. Hermanson A, Melhus Å, Westman E, Magnuson K, Hellström S, Prellner K. Purulent otitis media caused by different bacteria: a comparison in the rat model. In: Lim D, Bluestone C, Casselbrandt M, Klein J, Ogra P, eds. *Proceedings of the Sixth International Symposium on Recent Advances in Otitis Media*. Hamilton, Ontario: BC Decker, 1996:516-517.

# Publicação V

---

*Early structural tympanic membrane reactions to myringotomy. A study in an acute otitis media model*

Acta Otolaryngol [Stockh] 2002; 122:479-487.

## Early Structural Tympanic Membrane Reactions to Myringotomy: A Study in an Acute Otitis Media Model\*

JORGE SPRATLEY<sup>1,2</sup>, STEN HELLSTRÖM<sup>1</sup>, PER-OLOF ERIKSSON<sup>1</sup> and MANUEL PAIS-CLEMENTE<sup>2</sup>

From the <sup>1</sup>Department of Clinical Sciences, Otorhinolaryngology, University Hospital of Northern Sweden, Umeå, Sweden and <sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology, University of Porto Medical School, Hospital de S. João, Porto, Portugal

Spratley J, Hellström S, Eriksson P-O, Pais-Clemente M. Early structural tympanic membrane reactions to myringotomy: a study in an acute otitis media model. *Acta Otolaryngol* 2002; 122: 479–487.

Myringotomy (Myr) is one of the most frequently performed surgical procedures in children. However, events occurring in the early phases, i.e. a matter of hours, following Myr in the acute otitis media (AOM) model have not been described. The aim of the present study was to evaluate the early otomicroscopic and histopathologic reactions of the tympanic membrane (TM) after Myr during the course of AOM (AOM-Myr). The left tympanic bulla from 36 healthy Sprague-Dawley rats was inoculated with *Streptococcus pneumoniae* type 3. Forty-eight h later, at Day 0, 4 randomized animals were immediately sacrificed and the remaining animals were treated with bilateral Myr. Otomicroscopy and sacrifices were performed in series of 4 animals at 3, 6, 9, 12, 24 and 48 h, and 4 and 7 days. The AOM-Myr TMs were compared to non-infected Myr TMs (non-AOM-Myr). The TMs were then dissected free and routinely processed for light and electron microscopy. AOM developed in all inoculated ears at Day 0. In the pars tensa of the AOM-Myr TMs the reaction of the keratinocyte layer of the perforation border was already evident at 6 h. The lamina propria exhibited a strong inflammatory reaction, which became more organized from 12 h onwards. At Day 4 the perforations were closed in three-quarters of cases. At Day 7 all perforations were healed with a distorted scar. In the non-AOM Myr TMs a strong degranulation of mast cells and edema were found in the pars flaccida at 6 h. A keratin spur at the perforation border was not seen until 24 h. All perforations were patent on Day 7 and myringosclerotic deposits were abundant in these TMs. The infected TMs regenerated faster and closed their perforations at an earlier stage. These findings favor the hypothesis that there is a low risk of chronic perforations when myringotomizing AOM TMs. *Key words:* healing, myringotomy, otitis media, rat, tympanic membrane.

### INTRODUCTION

Myringotomy is one of the most frequently performed surgical procedures in the pediatric patient, either with or without the insertion of ventilation tubes. The advantages of myringotomy in acute otitis media (AOM) include alleviation of otalgia by means of a decrease in middle ear pressure and simultaneous aeration as well as the fact that it allows the harvesting of fluid for bacteriological analysis. However, after the introduction of efficient antimicrobial treatments, the benefits of routine myringotomy in non-complicated AOM have been questioned (1, 2).

*Streptococcus pneumoniae* remains a major pathogen responsible for middle ear infection globally. In contrast to the recent past, the current increasing occurrence of drug-resistant *S. pneumoniae* strains has been a reason for major concern (3, 4), prompting a reconsideration of policies regarding a more rational use of antibiotics in AOM (5) and a possible renaissance in myringotomy (4, 6). The effects of myringotomy in AOM should thus be further elucidated.

The tympanic membrane (TM) of the rat shares structural similarities with the TM in humans (7). It has been demonstrated previously that the rat TM reacts dynamically to the inoculation of various bacteria destined to provoke inflammatory conditions in the middle ear (8, 9). More recently, our research team has been dedicated to investigating the events occurring in the TM, and in particular in the pars flaccida (PF), during the early hours that follow the initiation of otitis media (10, 11). Such studies indicate that the inflammatory mechanisms involved in the development of AOM are histopathologically detectable very soon after bacterial challenge, which may open future avenues for medical intervention.

Against this background, the purpose of the present otomicroscopic and histopathological study was to investigate the early inflammatory events that are evoked by myringotomy in *S. pneumoniae*-infected TMs and to compare these reactions to those in non-infected myringotomized TM controls.

### MATERIALS AND METHODS

Thirty-six healthy, adult Sprague-Dawley rats, weighing  $\approx 300$  g, were used for this study. The research project and animal housing conditions were approved by the University of Umeå Ethical Committee for Animal Studies (A83/97).

\* A preliminary report on this subject was presented as a poster at the 2001 Annual Meeting of the American Academy of Otolaryngology—Head and Neck Surgery, Denver, CO, USA.

All rats were anesthetized, by injecting hexobarbital sodium (Brietal; Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN) into a tail vein, and the normal status of their TMs was checked under an otomicroscope. The left tympanic bulla was accessed via a ventral neck incision and opened with a scalpel. The middle ear cavity was then filled ( $\approx 50 \mu\text{l}$ ) with a suspension containing an inoculum of viable log-phase *S. pneumoniae* type 3 at a dose of  $10^7$  colony-forming units/ml. The right bulla was left untouched to be used as a control. Two days later, denominated Day 0, animals were re-anesthetized with Brietal and their ears were checked under the otomicroscope. All inoculated ears had developed signs of manifest AOM. Four randomized animals were immediately sacrificed and their TMs harvested. The remaining animals were subjected to bilateral myringotomy. The TM incisions, made with a sterile microlancet, were standardized in size and occupied almost the entire posterior superior quadrant of the pars tensa (PT). At 3, 6, 9, 12, 24 and 48 h, and 4 and 7 days, 4 randomized animals were anesthetized on each occasion with an overdose of pentobarbital sodium (Pentobarbitalnatrium; Apoteksbolaget AB, Stockholm, Sweden), had their TM status checked under the otomicroscope and were then promptly sacrificed.

Half the animals killed at each time point had their TMs processed for plastic embedding and the other half for paraffin embedding.

#### Plastic embedding

The animals were decapitated and each tympanic bulla was widely opened and filled with a fixative solution composed of 3% glutaraldehyde in a 75 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.4) with 4% polyvinylpyrrolidone and 2 mM  $\text{CaCl}_2$  added. The heads were further immersed in the same fixative for 24 h at 4°C. The TMs, in continuity with the adjacent external ear canal skin, were then dissected out. The PT was divided from the PF using a sharp microlancet and specimens were briefly rinsed in the same cacodylate buffer and post-fixed overnight in 1%  $\text{OsO}_4$ . After another rinse in buffer, the tissues were dehydrated in increasing concentrations of ethanol and embedded in a plastic resin (Polybed<sup>®</sup>; Polysciences Inc., Warrington, PA).

For light microscopy (Axiophot, Zeiss, Germany), 0.5  $\mu\text{m}$ -thick sections were cut at right-angles to the handle of the malleus on an ultramicrotome (Reichert Ultracut S; Leica, Austria) and stained with toluidine blue. For electron microscopy (1200EX; JEOL, Tokyo, Japan) ultrathin sections (70 nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate.

#### Paraffin embedding

Immediately after decapitation and opening of the bullae, the heads were put into a fixative solution of 4% buffered formalin in physiological saline (pH 7.0) and irradiated up to 45°C in a microwave oven (M-696; Miele, Gütersloh, Germany) set at 700 W, as reported elsewhere (12). Subsequently, the temporal bones were transferred to 100 mM phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.35) and further immersed at 4°C for 24 h. The TMs were then dissected out under a stereomicroscope, dehydrated in increasing concentrations of alcohol to xylene and embedded in paraffin. Sections (4  $\mu\text{m}$ ) were cut perpendicular to the handle of the malleus, placed on albumin-coated slides to dry at room temperature and then stained with hematoxylin-eosin or saved for future immunohistochemical studies.

## RESULTS

#### TMs in *S. pneumoniae*-infected ears with myringotomy ( $n = 32$ )

*Otomicroscopic observations.* At myringotomy, all ears had developed typical signs of AOM, as indicated by bulging and discolored TMs. In the majority of ears a serofibrinous exudate was accumulating in the external auditory canal (EAC). However, a spontaneous TM perforation was confirmed in only three ears. Upon incision, pus flowed from the middle ear cavity.

Between 3 and 24 h after myringotomy the status of the TMs was difficult to ascertain, as abundant purulent secretions filled the EAC. At 48 h the perforations were all patent and the EACs were partially dried up. The TMs were visible again and vasodilatation was discerned. All PFs looked retracted, with fluid in the attic.

At Day 4 a yellowish crust covered the perforation in three-quarters of cases. In one TM a small perforation persisted. The inflammatory reaction seemed to have diminished but hypervascularity was observed, in particular at the quadrant of incision. A yellow discoloration of the TMs suggested the persistence of effusion in the middle ear cavity.

At Day 7 all perforations had healed and scar formation in the posterior superior quadrant remained. Signs of inflammation had definitely abated. Dilated vessels from the handle of the malleus and the annulus emerged to the wounded quadrant. The transparency of the TMs was still diminished and no myringosclerotic lesions could be visualized. The PF showed a few dilated vessels but the previously described yellow discoloration had disappeared.

**Histological observations.** At Day 0, prior to the myringotomies, the TMs showed a very intense inflammatory reaction. The thickness of the PF was increased approximately four to five times compared to normal PFs. The external keratinizing epithelium was arranged in six rows of keratohyalin granule-filled keratinocytes, which were covered by abundant strata of keratin debris. The edematous lamina propria showed a profuse infiltration of polymorphonuclear neutrophils (PMNs), extravascular erythrocytes and vacuolated macrophages. The mast cells were not easy to distinguish. In some areas the inner mucosal epithelium was missing, whereas in other areas the epithelium was constructed in a mono- or double-layered fashion, with cuboidal and sometimes columnar goblet-like features. Sporadic ciliated cells were also observed. Gaps in between the mucosal epithelial cells apparently acted as gateways for PMN permeation into a pus-filled middle ear space.

The inflammation looked even more dramatic in the PT. Owing to massive leukocyte infiltration, mostly of PMNs, the keratinizing layer in certain areas had lost its adherence to the fibrous layer and had "exploded" like blebs of pus into the EAC, leaving areas of denuded collagen. Residual hyperactive keratinocytes, characterized by a dilated, pale cytoplasm, occurred mainly at the annulus-EAC transition and to a lesser degree in the manubrial region. The basal lamina was thickened and showed indentations, with keratinocytes forming "rete pegs". The loose connective tissue in the manubrial and annular regions showed remarkably dilated vessels, with adhering PMNs and diapedesis. As in the PF,

the mucosal lining of the PT showed extensive damage and the contiguous middle ear cavity was filled with inflammatory cells.

At 3 h post-myringotomy, very intense inflammation persisted in both the PF and PT. The borders of the incision were rough and retracted, and inflammatory cells were seen across the perforation. The annulus area showed the most active keratinocytes.

At 6 h the PF appeared less edematous. In the PT the keratinocyte layer close to the malleus handle had increased in thickness, whereas the underlying stroma was still very disorganized.

At 9 h the fibroblasts in the PF became more distinguishable, displaying a rounded shape. However, no mast cells were observed at this stage. In the mucosal layer an increasing number of goblet cells occurred. Concomitantly, the PT keratinocytes appeared to progress actively over the dense collagenous fibers of the lamina propria, which acted like a scaffold. The manubrial border of the perforation was the most active and the keratinocyte front advanced towards the edge of the myringotomy incision. Macrophages, PMNs and small lymphocytes continued to intensely infiltrate the richly vascularized connective tissue layer.

At 12 h the structure of the PF looked somewhat denser. The lamina propria was still densely packed with inflammatory cells (Fig. 1a). In the manubrial region of the PT, the leukocytes were arranged in palisades within the connective tissue layer. The epidermal layer continued to be strongly activated and showed deep indentations in the basal lamina (Figs 2a and 2b).

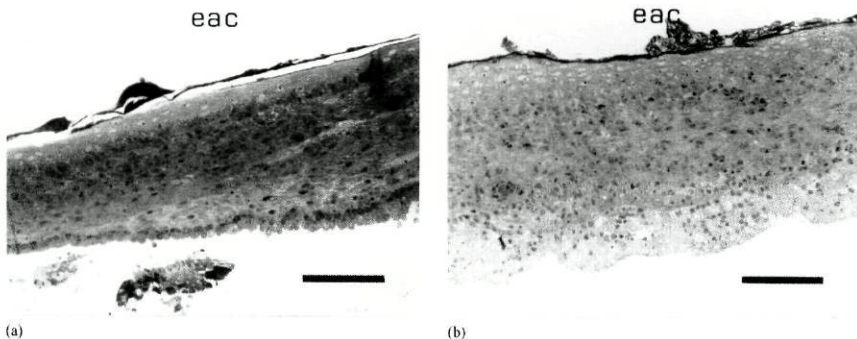


Fig. 1. Light micrographs of sectioned, plastic-embedded and toluidine blue-stained PF from the AOM group. Original magnification  $\times 160$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . (a) 12 h after myringotomy. The stroma of the PF is packed with inflammatory cells. The epidermal layer is thickened and the inner epithelial lining is composed of cylindrical goblet-like cells. (b) 24 h after myringotomy. The PF remains extremely thickened by the massive invasion of inflammatory cells in the lamina propria, but also because of thickening of the epithelial layers. eac = external auditory canal.



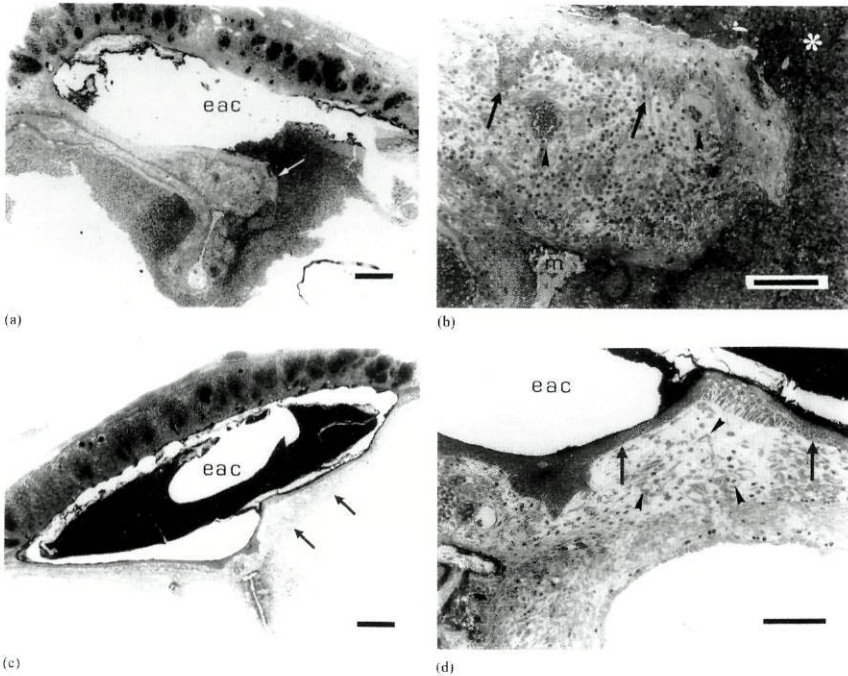


Fig. 2. Light micrographs of sectioned, plastic-embedded and toluidine blue-stained TMs (PT) from the AOM group: (a, b) 12 h and (c, d) 4 days after myringotomy. (a) The perforation border is thickened and has started to proliferate (arrow). Original magnification  $\times 40$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . (b) Detail of (a) depicting the thickened keratinocyte layer showing indentations (arrows) towards the connective tissue layer. The latter is infiltrated by inflammatory cells and shows dilated blood vessels (arrowheads). The perforation border is covered by pus (asterisk). Original magnification  $\times 160$ ; bar = 200  $\mu\text{m}$ . (c) The perforation has closed and is already showing the original triple-layer structure (arrows). Original magnification  $\times 40$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . (d) Detail of (c). The epidermal layer (arrows) has partially thinned out. Note the ongoing reorganization of the underlying lamina propria and the presence of abundant vessels (arrowheads). Original magnification  $\times 160$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . eac = external auditory canal; m = handle of the malleus.

At 24 h the cell infiltrate of the PF was reduced (Fig. 1b). In parallel the inflammation was slowly decreasing in the PT, in which an increased thickness in both the perforated and non-touched quadrants tended to persist. The keratinocytes of the manubrial area still exhibited an active appearance in comparison to those of the annulus region. In the non-perforated regions, the triple-layer structure of the PT was regained in all specimens. Purulent secretions still crossed the perforation.

At 48 h the fibroblasts in the PF appeared spindle-like in shape and mast cells exhibiting scarce cytoplasmic granules were seen in the subepidermal space. The recovering mucosal epithelium was losing its goblet-like appearance. In the PT, the thickened per-

foration edges exhibited typical keratin spurs, supported by a PMN-rich matrix. The manubrial border of the perforation was still comparatively thicker.

At Day 4 the inflammatory process in the PF had abated significantly despite lymphocytes and macrophages still remaining, along with dilated vessels. In the PT, three perforations were closed. Of these, two were sealed by an aggregate of keratinocytes plus fibrin and inflammatory cells topped by keratin debris, whereas the third specimen already displayed a distinct triple-layer arrangement (Figs 2c and 2d). Both the perforated and non-injured quadrants remained thickened, although the thickening was more pronounced in the former. Dilated capillaries occurred in the vicinity of the myringotomized

area. The connective tissue layer was rich in mononuclear inflammatory cells as well as swollen fibroblasts. No myringosclerotic lesions were observed.

At Day 7 the epidermal and mucosal layers of the PF had returned to a normal status, whereas the connective tissue layer was still slightly hypervascular, with swollen fibroblasts. Mast cells were still partially deprived of granules. In the submucosal region a few deposits of myringosclerosis could be detected. All perforations of the PTs had healed and the scarred quadrant had regained its ordinary triple-layer structure. However, the thickened lamina propria persisted and showed collagen fibers aligned at random whereas the outer keratinizing layer still looked hypertrophic. In comparison, the untouched quadrant was less thickened and exhibited a few scattered myringosclerotic lesions amongst the connective tissue fibers.

#### TMs in non-infected myringotomized ears ( $n = 32$ )

*Otomicroscopic observations.* At myringotomy 28 right TMs were normal, with the exception of 6 cases (19%) which had developed effusion in the right middle ear (5 mucoid, 1 purulent). These ears were excluded from further evaluation. Therefore, only two right TMs were evaluated at each of the time points 3, 6 and 9 h.

Between 3 and 9 h, increased vascularity of the PF, along the handle of the malleus and in the annulus region was noticed. At 12 h, half the PFs were retracted and yellowish, with an accumulation of fluid in the attic. Early evidence of myringosclerosis, visible as faint whitish deposits, was seen around the

umbo region. At 24 h, fluid had developed in the attic in three-quarters of cases. Myringosclerosis formation had progressed along the handle of the malleus and close to the annular region in all specimens. At 48 h, effusion material was present in the attic, medial to the PF. At Day 4, all myringotomy incisions had been slightly reduced in size by a developing rim of keratin. The sclerotic lesions appeared enhanced in whiteness. The PFs had normalized. By Day 7 all perforations were still patent, although the diameters had been reduced in size to less than one-quarter of the initial dimensions. Capillaries emerging from the manubrial and annular vessels were directing into the perforation area. Dense myringosclerotic lesions formed a continuous horseshoe-shaped ring adjacent to the handle of the malleus and annulus. No otomicroscopic signs of myringosclerosis could be detected in the PF.

*Histological observations.* At 3 h, a slight edema, vasodilation and very occasional PMNs were observed in the loose connective tissue of the PF in half of the specimens.

At 6 h, an intense edema had developed in the stroma of the PF concomitant with degranulated mast cells and a few remaining PMNs (Fig. 3a). With the exception of a slight vasodilation and edema in its centermost region, the PT still showed no reaction.

At 9 h, a filamentous substance, apparently fibrin, had started to accumulate in the stroma of the PF, as seen at the electron microscopic level. The PT continued to show little if any reaction, except for a few PMNs seen underneath the epidermal layer in proximity to dilated vessels of the malleus handle region.

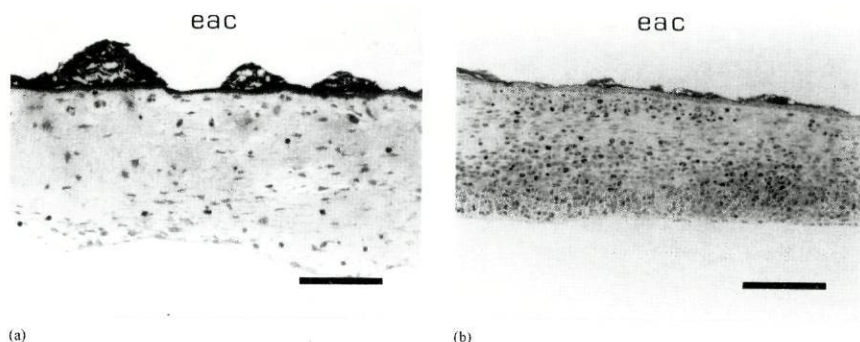


Fig. 3. Light micrographs of sectioned, plastic-embedded and toluidine blue-stained PF from the non-AOM group. Original magnification  $\times 160$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . (a) 6 h after myringotomy. The PF is extremely thickened due to massive edema. Only a few inflammatory cells have escaped from the vessels. Mast cells are degranulated. (b) 24 h after myringotomy. The edema is reduced but has been substituted by a pronounced invasion of inflammatory cells. The thickness of the outer epidermal layer is normal. eac = external auditory canal.

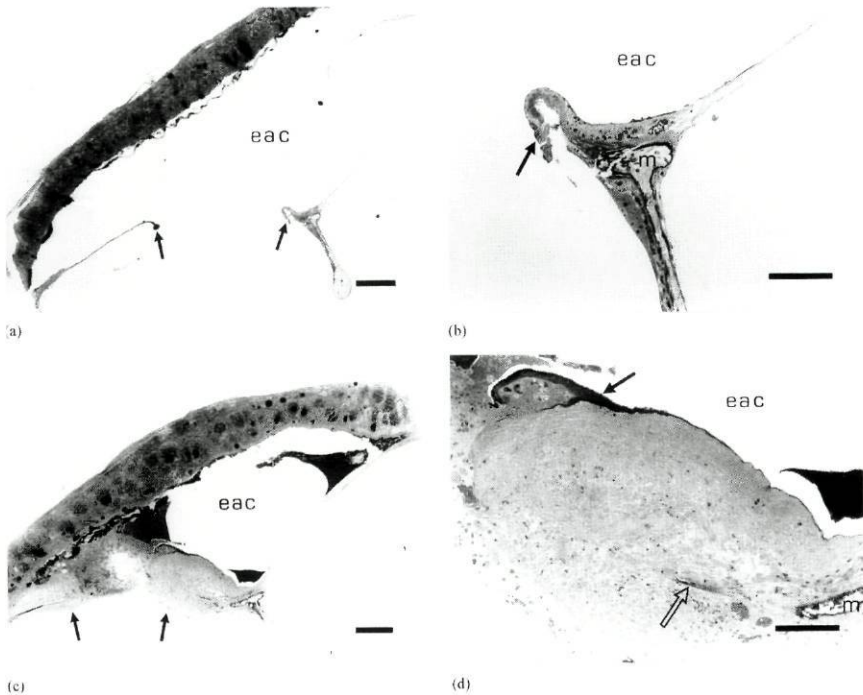


Fig. 4. Light micrographs of sectioned, plastic-embedded and toluidine blue-stained TMs (PT) from the non-AOM group: (a, b) 12 h and (c, d) 7 days after myringotomy. (a) The TM is very thin and the perforation borders remain non-active (arrows). Original magnification  $\times 40$ ; bar = 200  $\mu\text{m}$ . (b) Detail of (a) showing the manubrial border of the perforation and the retracted remnants of the TM (arrow). Original magnification  $\times 160$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . (c) The perforation is still open. The myringotomy borders are extremely thickened (arrows). Original magnification  $\times 40$ ; bar = 200  $\mu\text{m}$ . (d) Detail of (c) showing the manubrial border of the perforation. Note the proliferating keratinocyte layer and the incipient keratin spur (solid arrow) which has formed. Amongst the cell-rich lamina propria lie the remnants of the original dense collagenous layer (open arrow). Original magnification  $\times 160$ ; bar = 100  $\mu\text{m}$ . eac = external auditory canal; m = handle of the malleus.

At 12 h, the invasion of leukocytes had intensified and was dispersed throughout the whole thickness of the lamina propria of the PF. Mast cell degranulation was generalized and the deposition of the filamentous substance had augmented. The external keratinizing layer was thickened and the mucosal epithelial cells had changed from flat to cuboidal. In the PT, very occasional PMNs permeated in the direction of the wounded area. The perforation borders persisted in almost total quiescence (Figs 4a and 4b). Myringosclerosis was observed in one specimen. At the ultrastructural level myringosclerotic deposits with a spicule appearance occurred between the collagen fibers.

At 24 h intense inflammation persisted in the PF (Fig. 3b). The filamentous substance observed earlier

could no longer be distinguished. Faint myringosclerotic deposits were now visible in the submucosal region. In the PT, the epidermal layer was slightly increased in thickness both at the annulus and in the manubrial regions. The non-touched quadrant was slightly thickened, mainly due to the keratinizing and connective tissue layers, and myringosclerosis was now evident in all cases, although in small amounts.

At 48 h the overall thickness of the PF was reduced, with fewer inflammatory changes. In contrast, in the PT the inflammation of the lamina propria was greater than before. The keratinocytes reached the manubrial border of the perforation whereas on the annular side an incipient keratin spur was formed in addition. The mucosal layer of the TM appeared unaffected. Sclerotic deposits appeared denser within

the lamina propria. Ultrastructurally these lesions constituted rounded multilayer structures, sometimes confluent, with a dense core. At Day 4 the increased vascularity, initially restricted to the subepidermal area of the PF, was now also observed in the submucosal region. Mast cells had regained some granules. The edema of the connective tissue layer had abated whereas engorged fibroblasts still denoted activity. In the PT active keratinocytes formed the rim of the perforation. The degree of myringosclerosis had increased.

By Day 7 the PF appeared normal, except for the presence of some active fibroblasts and a still slightly increased vascularity. Sparse myringosclerotic deposits were seen in the submucosal region. In the PT intense keratinocyte activity in the vicinity of the perforation borders seemed to promote fast closure of the incision (Figs 4c and 4d). The connective tissue layer was infiltrated by leukocytes, predominantly small, rounded lymphocytes and macrophages. Swollen fibroblasts as well as tortuous capillaries, which almost reached the tip of the hypertrophic border, were seen. Myringosclerotic deposits were abundant in the lamina propria of the PT, mostly in the non-perforated quadrant (Fig. 5).

## DISCUSSION

The present investigation mapped the early inflammatory reactions of the TM in a *S. pneumoniae*-induced AOM model, from 3 h to 7 days after myringotomy. The TM response to myringotomy was strongly affected by the presence of infection. The differences from the non-infected myringotomized TMs could be distinguished within 3–6 h following the TM incision. As such, the TMs in AOM showed an almost immediate reaction in the PT, in particular in the epidermal layer, which seemed to promote faster closure of the perforation. In contrast, the non-AOM TMs showed a delayed response in the PT secondary to inflammatory reactions in the PF. However, these PF reactions seemed to be triggered through degranulation of mast cells. Furthermore, the non-infected TMs developed myringosclerotic deposits earlier and more extensively.

The course of TM healing following myringotomy in various non-infectious conditions has been studied in different species, e.g. guinea-pig (13, 14), cat (15–17), mouse (16, 18), hamster (18) and rat (17, 19, 20). These previous studies emphasized the importance of proliferation of the squamous keratinizing epithelium in the closure of the perforation. In contrast to wound healing in the skin, the occurrence of an underlying granulation tissue was con-

sidered to be of secondary interest. In our study, the faster healing observed in the AOM specimens seemed to result not only from rapid activation of the keratinocyte layer, with formation of a keratin spur, but also from the underlying bed of an intensely inflamed connective tissue which seemed to play a key role of support.

Our findings confirm the earlier observations of Magnuson et al. (21) that the TM perforations in AOM tend to close faster. In the present study, the perforation border started to proliferate a matter of hours after myringotomy, in contrast to 1–2 days in the non-infected TMs. Transferred to the clinical situation, this strong capacity for rapid healing in AOM, despite the concomitant collagen fiber disarrangement, implies a low risk of occurrence of residual perforations. However, one should also consider that the patency of the myringotomy opening and consequent benefits of middle ear aeration will be short-lived.



Fig. 5. Electron micrograph showing detail of a non-AOM PT 7 days after myringotomy. There are frequent myringosclerotic deposits between the collagenous fibers (arrows). Bar = 1  $\mu$ m. eac = external auditory canal; mec = middle ear cavity.

What causes the strong capacity for regeneration observed in the AOM TMs? One conceivable reason is the already ongoing intense inflammation, which may induce the release of various substances, including "growth factors", that could trigger the healing reaction. Moreover, the topical application of bacterial derivatives, e.g. non-viable *Staphylococcus aureus*, its cell wall or cell wall peptidoglycans (22), has been shown to accelerate the healing of cutaneous wounds. It is tempting to assume that a similar mechanism could explain our findings in the myringotomized AOM animals.

In a recent study on auditory epithelial migration, Kakoi and Anniko (20) focused on the germinative centers of the keratinizing epithelium in the rat TM. Accordingly, two major areas should be considered: one located in the annulus and the other in the vicinity of the malleus handle. The shape and orientation assumed by the keratinocytes in these regions were regarded as a strong indicator of activity and migration. Such cellular features were clearly distinguished in our AOM myringotomized specimens, in which an early, strong reaction was monitored in the annulus keratinocytes followed by, at 12–24 h, a later predominance of the manubrial keratinocytes. A similar pattern of keratinocyte activity occurred in the non-infected TMs but at a later time. This type of centrifugal closure of the perforations fits the description of Makino et al. (23) regarding the healing of human traumatic TM perforations. Likewise, the pus-filled blebs that occurred on the TM surface, early during manifest AOM, may be of clinical interest. Such blebs may conceal the true thickness of the TM. Thus, when myringotomy is considered and the inflamed TM is punctured by an inexperienced surgeon or when otomicroscopy is not available, the rupture of these superficial blebs could easily mimic penetration into the middle ear space.

Mast cells are ubiquitously distributed in the PF in both rats (24) and humans (25). The capacity of the PF to react early to various stimuli (11, 26, 27) could be related to these mast cells, which harbor granules rich in various mediators and connective tissue-degrading enzymes (28). The PF mast cells in the non-infected TMs reacted very early and distinctly to myringotomy, and seemed to act as a trigger for subsequent inflammatory events. It is possible that interference with this mechanism may have consequences for the healing of traumatic TM perforations.

In the present study, the occurrence of myringosclerosis in the PT of the AOM specimens was less evident than in the non-infected ears. These findings agree with the long-term results of Mattsson et al. (29) who reported different extensions of deposits

when comparing infected and non-infected myringotomized TMs. It seems plausible that the infection-induced inflammation of the connective tissue layer interferes with the process of myringosclerosis formation. Furthermore, the development of myringosclerosis in non-infected perforated TMs has been associated with exposure to a hyperoxic environment (30). As such, the presence of pus filling the middle ear cavity and covering the perforation edges may reduce the exposure of these structures to the relative hyperoxic atmosphere and thus contribute to the diminished occurrence of myringosclerosis.

Grote et al. (8) described the reaction of rat TM to *S. aureus* infection to be almost restricted to the regions of loose connective tissue, i.e. the PF and the manubrial and annular areas of the PT. In the present *S. pneumoniae* model, the infectious process appeared to be more aggressive and involved the entire extension of the TM. However, similar to the *S. aureus* model, gaps in the mucosal cell lining were frequently observed, allowing free passage of inflammatory cells from the TM into the middle ear cavity. The common occurrence of this process at early stages of the study further suggests that an active role is played by the TM in the dynamics of the middle ear defense system.

## CONCLUSIONS

The TM reaction to myringotomy was remarkably distinct in AOM and non-infected specimens. These differences were already noticeable within a few hours after myringotomy. In AOM, the early response of the PT keratinocyte layer, supported by a highly inflamed lamina propria, contributed to faster healing of the TM incision. In contrast, the PT reaction in the non-infected TMs was greatly delayed and the first signs of inflammation seemed to occur in the PF via degranulation of mast cells. If applicable to clinical practice, the findings of the present study would appear to indicate that myringotomy in AOM is associated with a low risk of persistent perforation, but that the duration of middle ear aeration is also short.

## ACKNOWLEDGMENTS

The technical and photographic assistance of Cathrine Johansson and Ann-Louise Grehn is greatly appreciated. This work was supported by grants from the Swedish Medical Research Council (No. K200073X-06578-18C), the Swedish Society for Medical Research, the Medical Faculty of Umeå University, Sjuhälsanmedel Vasterbotten County Council and the Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde do Ministério da Saúde de Portugal (No. 109/99).

## REFERENCES

- Engelhard D, Strauss N, Jorzak-Sarni L, Cohen D, Sacks T, Shapiro M. Randomized study on myringotomy, amoxicillin/clavulanate, or both for acute otitis media in infants. *Lancet* 1989; ii: 141-3.
- Kaleida P, Casselbrant M, Rockette H, et al. Amoxicillin or myringotomy or both for acute otitis media: results of a randomized clinical trial. *Pediatrics* 1991; 87: 466-74.
- Baquero F, Cantón R, Baquero-Artigao F. Current patterns and evolution of antibiotic resistance among bacterial pathogens involved in acute otitis media. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3 (Suppl): S26-33.
- Wald E, Mason E, Bradley J, Barson W, Kaplan S, and The US Pediatric Multicenter Pneumococcal Surveillance Group. Acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae* in children's hospitals between 1994 and 1997. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 34-9.
- Dagan R. Treatment of acute otitis media—challenges in the era of antibiotic resistance. *Vaccine* 2001; 19 (Suppl): S9-16.
- Poole M. It's time to bring back diagnostic tympanocentesis. *Ear Nose Throat J* 1994; 73: 49-50.
- Schmidt S-H, Hellström S. Tympanic membrane structure—new views. A comparative study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1991; 53: 32-6.
- Grote J, Bakker D, Hesseling S, Blitterswijk C. Tympanic membrane structure during a *Staphylococcus aureus*-induced middle ear infection. A study in the rat middle ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1989; 107: 225-34.
- Hermansson A, Prellner K, Hellström S. Persistent structural changes in the middle ear mucosa of the rat, after experimentally induced episode of pneumococcal otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1990; 109: 421-30.
- Magnusson K, Hellström S. Early structural changes in the rat tympanic membrane during pneumococcal otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994; 251: 393-8.
- Hellström S, Mattsson C, Eriksson P-O. 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, Lim D, eds. *New frontiers in immunobiology*. The Hague, Netherlands: Kugler Publications, 2000: 3-7.
- Hellström S, Nilsson M. The microwave oven in temporal bone research. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 1992; 493: S15-8.
- Taylor M, McMinn R. Healing of experimental perforations of the tympanic membrane. *J Laryngol Otol* 1965; 79: 148-58.
- Johnson A, Smallman L, Kent S. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. A two-dimensional histological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1990; 109: 406-15.
- McIntire C, Benitez J. Spontaneous repair of the tympanic membrane. Histopathological studies in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1970; 79: 1129-31.
- Reijnen C, Kuijpers W. The healing pattern of the drum membrane. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 1971; 287: 1-74.
- Stenfors L-E, Carlsson B, Salén B, Winblad B. Repair of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1980; 90: 332-41.
- Boedts D. The tympanic epithelium in normal and pathological conditions. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1978; 32: 295-420.
- Söderberg O, Hellström S, Stenfors L-E. The healing pattern of experimental heat myringotomy. *Revue Laryngol* 1985; 106: 81-5.
- Kakoi H, Anniko M. Auditory epithelial migration. II: Morphological evidence for auditory epidermal cell migration in rat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1996; 116: 850-3.
- Magnusson K, Hermansson A, Hellström S. Healing of the tympanic membrane after myringotomy during *Streptococcus pneumoniae* otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996; 105: 397-404.
- Levenson S, Chang T, Kan-Gruber D, et al. Accelerated effects of non-viable *Staphylococcus aureus*, its cell wall, and cell wall peptidoglycans. *Wound Rep Reg* 1996; 4: 461-9.
- Makino K, Amatsu M, Kinishi M, Mohri M. Epithelial migration in the healing process of tympanic membrane perforations. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1990; 247: 352-5.
- Alm P, Bloom G, Hellström S, Stenfors L-E, Widemar L. Mast cells in the pars flaccida of the tympanic membrane. A quantitative morphological and biochemical study in the rat. *Experientia* 1983; 39: 287-9.
- Widemar L, Hellström S, Stenfors L-E, Bloom G. An overlooked site of tissue mast cells—the human tympanic membrane. Implications for middle ear infections. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1986; 102: 391-5.
- Alm P, Bloom G, Hellström S, Salén B, Stenfors L-E. The release of histamine from pars flaccida mast cells. One cause of otitis media with effusion? *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1982; 94: 517-22.
- Goldie P, Hellström S. Autonomic nerves and middle ear fluid production. An experimental study in the rat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1988; 106: 10-8.
- Ruah C, Penha R, Schachern P, Paparella M. Tympanic membrane and otitis media. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1995; 49: 173-80.
- Mattsson C, Magnusson K, Hellström S. Myringotomy: a prerequisite for the development of myringosclerosis? *Laryngoscope* 1998; 108: 102-6.
- Hellström S, Fall C, Goldie P, Magnusson K, Spandow O. Factors influencing the development of tympanosclerosis: an experimental study. In: McCabe B, Mogi G, eds. *Immunobiology in otology, rhinology and laryngology*. Amsterdam: Kugler Publications, 1992: 159-62.

Submitted October 8, 2001; accepted January 10, 2002

Address for correspondence:  
 Jorge E. Spratley, MD  
 Department of Otorhinolaryngology  
 University of Porto Medical School  
 Hospital de S. João  
 PT-4202-451 Porto  
 Portugal  
 Tel.: +351 22 502 96 61, ext. 1570  
 Fax: +351 22 208 01 61  
 E-mail: j.spratley@mail.telepac.pt

# Publicação VI

---

*Topical ascorbic acid reduces the myringosclerosis in perforated tympanic membranes: A study in the rat*

Ann Otol Rhinol Laryngol 2001; 110: 585-91.

## TOPICAL ASCORBIC ACID REDUCES MYRINGOSCLEROSIS IN PERFORATED TYMPANIC MEMBRANES

### A STUDY IN THE RAT

JORGE E. SPRATLEY, MD

PORTO, PORTUGAL

CECILIA K. MATSSON, MD, PHD

UMEÅ, SWEDEN

STEN O. HELLSTRÖM, MD, PHD

UMEÅ, SWEDEN

MANUEL PAIS-CLEMENTE, MD, PHD

PORTO, PORTUGAL

Myringosclerosis, a common finding after myringotomy, has been recently associated with an increased production of oxygen free radicals. Ascorbic acid's proposed actions include collagen synthesis, antioxidation, and free radical scavenging. The effects of topical ascorbic acid on healing tympanic membranes were studied. Particular attention was given to detecting the presence of myringosclerosis. Twelve Sprague-Dawley rats were bilaterally myringotomized. Their ears were randomized into group A, which received topical ascorbic acid in Gelfoam, group B, which received topical saline solution in Gelfoam, and group C, which received no treatment. The tympanic membranes were harvested on day 13, after routine otomicroscopy. Under light microscopy, the connective tissue layer of the untouched side of the pars tensa was distinctly thicker in group A than in group B or group C. At this level, the extent of sclerotic lesions was significantly less in the ascorbic acid-treated group. It is inferred that topical ascorbic acid reduces the occurrence of myringosclerosis following tympanic membrane perforations in the rat.

**KEY WORDS** — ascorbic acid, myringosclerosis, myringotomy, rat, tympanic membrane, vitamin C.

#### INTRODUCTION

An intact and vibrating tympanic membrane (TM) is of the utmost importance for the normal physiology of hearing. Its movement is hampered by lesions of sclerotic material, as seen after ventilation tube placement. Previous animal experiments suggest an intimate relationship between the formation of myringosclerosis (MyS) and an increased concentration of oxygen in the environment of the wound following myringotomy.<sup>1</sup> Further, the development of sclerotic lesions could be prevented by topical application of oxygen free radical scavengers.<sup>2</sup>

Ascorbic acid (AscA), synonymous with vitamin C, participates in roles in health maintenance as diverse as leukocyte activity,<sup>3,4</sup> nonheme iron absorption,<sup>5</sup> eye defense from ultraviolet light,<sup>6</sup> and possible protection against cancer.<sup>7</sup> The ability of this molecule to protect against free radical-mediated tissue damage is well acknowledged.<sup>8,9</sup> Furthermore, the effect of AscA on wound healing has been extensively studied in different structures — for example, the colon,<sup>10</sup> cornea,<sup>11</sup> skin,<sup>12</sup> and gingiva.<sup>13</sup> Ascorbic acid seems to actively participate in different steps of the synthesis and formation of connective tissue, such as collagen gene expression and hydroxylation

with an increased secretion of collagen in parallel with an augmented production of some of the matrix glycoproteins.<sup>14</sup>

In recent years, an increasing interest has focused on the possibility of interfering with the healing of TM perforations through topical application of bioactive substances.<sup>15-17</sup> Although a few studies were published in the Japanese literature regarding the metabolism of AscA in the ear during chronic inflammation,<sup>18,19</sup> to our knowledge there is a lack of reports focusing on the use of AscA on the healing TM.

The purpose of the present investigation was to study the effects of topical application of AscA after myringotomy, with particular attention to the development of MyS.

#### MATERIAL AND METHODS

Twelve healthy male Sprague-Dawley rats, of the same age and weighing 250 to 300 g, were used for the study. All animals were kept under standard laboratory conditions and were given pellets and water ad libitum without any vitamin restriction. The research protocol was in compliance with the Institutional Committee for the Care and Use of Labora-

From the Department of Otorhinolaryngology, University Hospital of Umeå, Umeå, Sweden (Spratley, Hellström, Mattsson), and the Department of Otorhinolaryngology, University of Porto Medical School, Porto, Portugal (Spratley, Pais-Clemente). Supported in part by grants from the Swedish Medical Research Council No. 06758, the Swedish Society for Medical Research, the Medical Faculty of Umeå University, and the Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados da Saúde do Ministério da Saúde de Portugal.

**CORRESPONDENCE** — Jorge E. Spratley, MD, Dept of Otorhinolaryngology, University of Porto Medical School, Hospital de S. João, 4200 Porto, Portugal.



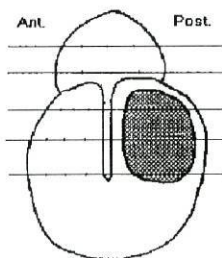


Fig 1. Schematic drawing represents rat tympanic membrane and standardized area of perforation (shaded), levels of sectioning (horizontal lines), and spots selected for measurements (intersections).

tory Animals of the University of Umeå. For all of the procedures, the rats were anesthetized intravenously with a short-acting barbiturate, methohexital sodium (Brietal; Eli-Lilly and Company, Indianapolis, Ind), via a tail vein. Under the otomicroscope, a perforation, standardized in size, occupying almost the entire superior rear quadrant of the TM, was made with a myringotomy lancet through an ear speculum.

Each ear was randomized to receive one of the following topical treatments immediately after the myringotomy (day 0): 1) group A (9 ears), which had covering of the perforation with a rounded pledget of Gelfoam (The Upjohn Co, Kalamazoo, Mich) soaked in a solution of 28-mmol/L AscA ( $C_6H_8O_6$ ) in sterile water (pH 3); 2) group B (9 ears), in which the perforation was covered with Gelfoam soaked in sodium chloride 9 g/L; and 3) group C (6 ears), in which the perforation was left untouched.

The TM status was routinely evaluated under the otomicroscope by 2 observers simultaneously on days 1, 3, 5, 7, 10, and 13. The findings were documented on standardized protocol sheets. On days 1 and 3, group A and B ears received an additional topical treatment, through instillation of drops containing AscA and saline solution, respectively, over the residues of Gelfoam, through an ear speculum. Thirteen days after the myringotomy, the animals were painlessly sacrificed with an intraperitoneal overdose of pentobarbital sodium (Pentobarbitalnatrium, Apoteksbolaget, Stockholm, Sweden) and decapitated. The tympanic bulla was immediately dissected free, opened, and filled with a fixative solution containing 3% glutaraldehyde in 75-mmol/L sodium cacodylate buffer (pH 7.4) with 4% polyvinylpyrrolidone and 2-mmol/L calcium chloride added. After immersion in the fixative at 4°C for 24 hours, the TMs were dissected out in toto in continuity with the adjacent external ear canal skin under a stereomicroscope. After a brief rinsing in cacodylate buffer, the pars tensa

and pars flaccida were separated from each other with a sharp scalpel and post-fixed overnight in 1% osmium tetroxide. The specimens were then dehydrated in increasing concentrations of ethanol and embedded in an epoxy resin (Polybed; Polysciences Inc, Warrington, Pa). For light microscopy, semithin sections (1  $\mu$ m) were cut perpendicular to the handle of the malleus, collected, and stained with toluidine blue. Sections were prepared from 3 standardized levels of the upper quadrants of the pars tensa and from 2 levels of the pars flaccida. Under a light microscope equipped with an eyepiece micrometer scale, the distance from the handle of the malleus to the annulus was divided into 4 equal parts, in which the pars tensa thickness was measured (Fig 1). Each section of the pars flaccida was also divided into 4 parts, and the thickness was measured. A semiquantitative analysis of myringosclerotic deposits was performed on each section in a blinded manner with a 4-point scale: no visible MyS, occasional MyS, moderate MyS, and severe MyS. For transmission electron microscopic observations, ultrathin sections were cut and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The statistical significance of the results was tested with the  $\chi^2$  test, and with the 2-tailed Fisher exact test (2 groups) or the Kruskal-Wallis test (more than 2 groups) for unpaired samples.

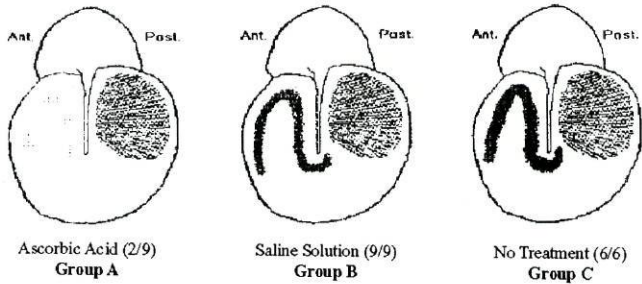
## RESULTS

**Otomicroscopy.** On day 1 after myringotomy, dilated vessels in the annular region, in the anterior and posterior tympanomalleolar folds, and extending along the handle of the malleus were noticed in all TMs. The vascular reaction was most intense in group A. White, chalky spots in the pars tensa could be distinguished in most of the nontreated controls and in a few of the saline-treated TMs. The sclerosis pattern occurred mainly on the noninjured side of the region around the umbo.

On day 3, an increase in vessel caliber was observed to be still more enhanced in the group A, AscA-treated TMs. A bulging yellow pars flaccida, representing the presence of effusion in the epitympanum, affected 2 of 3, 1 of 3, and 1 of 3 cases in groups A, B, and C, respectively. In 1 TM of group A, faint, whitish deposits of MyS were detected, and in all cases in groups B and C, whitish lesions were seen extending along the handle of the malleus.

On day 5, reactions at the borders of the perforations were observed. On TMs devoid of scaffolding, a spur of keratin, originating from the anterior-superior region of the myringotomy rim, was noticed. Two TMs of group A had spontaneously lost the Gelfoam pledget, and their perforation rims showed intense signs of keratin production together with a dark yellow

Fig 2. Schematic drawing depicts otomicroscopic distribution of myringosclerotic deposits on day 13, according to different treatment methods (groups A, B, and C). Note that myringosclerosis is located in anterior quadrant, and area of healed perforation is represented in posterior-superior quadrant. Numbers show number of eardrums with myringosclerosis per number of eardrums in group.



low color to this area. In groups B and C, the sclerotic lesions continued to increase in intensity and became more widespread along the handle of the malleus and also in the annulus region, still preferentially in the nonperforated quadrant. Two cases in group A were now also affected by MyS.

Postmyringotomy day 7 was characterized by a peak of vascular exuberance. For the first time, very thin capillaries, originating as branches from the annular and malleolar vessels, were noticed reaching the border of the perforation. The intensity of this vascular pattern was more evident in group A than in groups B and C. All perforations were reduced to less than half of their original size. An elevated circular rim of keratin was present in those cases without Gelfoam, and in the remaining cases, the gelatin sponge seemed to be deeply incorporated in the TM tissue.

On day 10, the numbers of closed perforations were 7 of 9, 6 of 9, and 3 of 6 in groups A, B, and C, respectively. The differences were not significant.

By day 13, all TMs were closed except for 1 in group A. This particular case was less than 10% of its initial size and exhibited an intense keratinization. In all other TMs, the area of the healed perforation was opaque — more markedly in groups A and B than in group C. The vascular reaction had almost vanished, although some capillaries could yet be detected in the vicinity of the traumatized area. The MyS deposits in group C, the nontreated cases, were

TABLE 1. LIGHT MICROSCOPIC EVIDENCE OF MYRINGOSCLEROSIS IN PARS TENSA

Group	Myringosclerosis			
	None	Occasional	Moderate	Severe
A (ascorbic acid; n = 9)	6	1	2	
B (saline solution; n = 9)		1	5	3
C (no treatment; n = 6)			1	5

confluent, forming a horseshoe-shaped pattern. This feature was less intense in the saline group and faint or nonexistent in the AscA-treated TMs (Fig 2). Only 2 cases in group A showed any signs of MyS, and then in small amounts. In the pars flaccida, no MyS could be observed with the otomicroscope.

**Light Microscopy.** The amount of MyS in the pars tensa is depicted in Table 1. The most extensive MyS in the pars tensa specimens was found in the untreated ears (Fig 3). The MyS occurred predominantly in the region adjacent to the handle of the malleus, but also near the annular region. The MyS deposits were sometimes confluent and could be observed in the middle layer on both sides of the handle of the malleus, although they were more pronounced on the non-injured side. Similar findings were present in the TMs of the saline group (Fig 4). In contrast, only 3 specimens treated with AscA showed any light microscopic evidence of MyS, and then with few and scattered deposits. The occurrence of MyS deposits was significantly different between groups A (3/6) and B (9/0;  $p < .01$ ) and between groups A (3/6) and C (9/0;  $p < .03$ ), but the difference between groups B and C was not significant.

A significant variability in the TM thickness of the anterior-superior quadrants could also be distinguished (Table 2). The AscA-treated TMs were the most thickened (Fig 5). The thickening of the AscA TMs seemed mainly to be due to a swollen middle connective tissue layer. This layer showed an increased number of fibroblasts characterized by an increased nucleus-cytoplasm ratio, suggesting augmented metabolic activity. The reaction in the middle layer was slight in the saline group and negligible in the nontreated TMs.

The epithelial layers, both keratinizing and mucosal, appeared normal, except in the area previously perforated, in which single or double layers of keratinocytes with signs of an increased production of keratin, visible nuclei, and "pseudopodia" facing the basal lamina could be observed. An increased amount

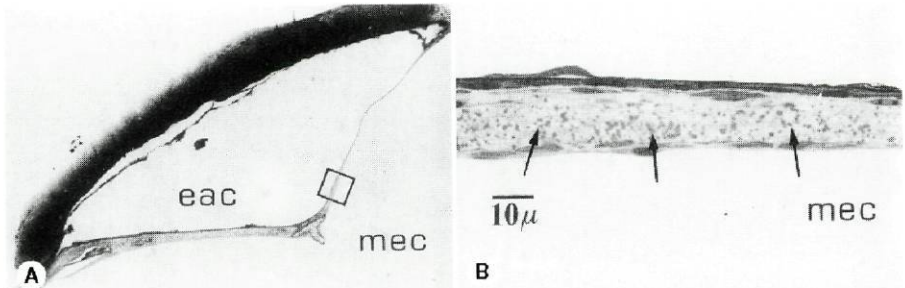


Fig 3. Light micrographs of pars tensa left untouched after myringotomy. mec — middle ear cavity. A) Survey micrograph (toluidine blue, original  $\times 30$ ). eac — External auditory canal. B) Detail of boxed area in A (toluidine blue, original  $\times 550$ ). Note extensive sclerotic lesions in lamina propria (arrows).

of keratin debris was detected inside the external auditory canal in group A.

In the majority of group A and B cases, islands of Gelfoam still persisted on the TM, undergoing a process of degradation. This process was accompanied by a foreign body-type reaction in which a glossy, structureless substance was being digested in the presence of macrophages, giant multinucleated cells, some mast cells, and fibroblasts, along with increased vascular proliferation. The inner mucosal layer cells were flat and, in some cases, slightly cuboidal.

The pars flaccida was quite similar in appearance in all groups. The outer keratinocyte layer looked thicker than in the pars tensa. The lamina propria was well developed, with a random distribution of collagen and elastic fibers in between fibroblasts and rare macrophages. Adjacent to the epidermal layer, mast cells could be seen in proximity to the capillaries and nerve fibers. Occasional MyS lesions were noticed in 3 of 9, 7 of 9, and 4 of 6 cases in groups A, B, and C, respectively. The sclerotic deposits were

predominantly located close to the inner epithelial layer. The inner epithelium was flat, but was sometimes interrupted by ciliated mucosal cells. No intergroup differences could be detected in the thickness of the pars flaccida (Table 2).

**Electron Microscopy.** The MyS lesions in the pars tensa were localized in between the collagen fibers of the lamina propria. They were distributed among both fiber layers: the inner layer with circular fibers and the outer layer with radiating fibers. The majority of deposits were, however, in the latter layer. These lesions varied from granular, electron-dense deposits with an irregular surface to confluences of more rounded, globular, multilamellar structures (Fig 6).

In the pars flaccida, the MyS lesions, mostly of the round, multilamellar type, were predominantly located in the submucosal region.

#### DISCUSSION

In the present investigation, topical Asca application to the perforated TM of the rat was associated with a significant reduction of MyS in the pars tensa.

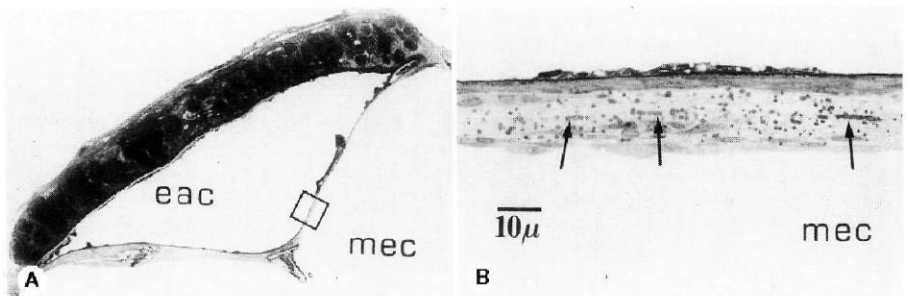


Fig 4. Light micrographs of pars tensa treated with topical application of saline solution after myringotomy. A) Survey micrograph (toluidine blue, original  $\times 30$ ). B) Detail of boxed area in A (toluidine blue, original  $\times 550$ ). Note abundant sclerotic lesions in lamina propria (arrows).

TABLE 2. TYMPANIC MEMBRANE THICKNESS AT DIFFERENT LEVELS OF ANTERIOR-SUPERIOR QUADRANT OF PARS TENSA AND OF PARS FLACCIDA

Group	Anterior-Superior Quadrant of Pars Tensa			Pars Flaccida	
	1st Level	2nd Level	3rd Level	1st Level	2nd Level
A (ascorbic acid; n = 9)	22.6 ± 9.3	27.6 ± 13.2	36.1 ± 14.6	67.4 ± 19.3	57.8 ± 15.5
B (saline solution; n = 9)	10.3 ± 4.0	10.7 ± 3.0	11.8 ± 2.7	62.3 ± 14.8	49.3 ± 11.1
C (no treatment; n = 6)	7.4 ± 2.0	10.2 ± 3.7	10.8 ± 2.4	66.2 ± 15.3	51.7 ± 9.0
	p = .0007	p = .0012	p = .0002	p = .898	p = .426

Data are mean ± SD in micrometers.

There are several explanations as to how AsCA could prevent MyS. In the absence of adequate endogenous AsCA, hydroxylated collagen tends not to accumulate within the cytoplasmic vacuoles of cells, consequently becoming more sensitive to degradation.<sup>20</sup> However, this degradation did not seem to occur in the present study, as increased extracellular connective tissue was detected, along with signs of an enhanced fibroblastic activity. Previous studies<sup>21,22</sup> suggested that sclerosis preferentially occurred in areas in which the connective tissue was more dense. Our results in part seem to confirm this hypothesis, as the MyS deposits in the pars tensa predominated in the saline-treated and nontreated cases that showed a thinner connective tissue layer. However, in the pars flaccida, where the connective tissue is typically more lax, we could still find MyS deposits in all groups. That the 2 distinct effects of AsCA — increase of collagen and reduction of MyS — are coincidental cannot be excluded.

A connection between the low pH of the AsCA solution used and the reduction of MyS deposits might also be considered. In an earlier report,<sup>23</sup> an acidic environment was associated with a reduction of sclerotic deposits in the TM.

An increased oxygen concentration in ears with traumatized TMs has been shown to increase the ex-

tent of MyS deposits.<sup>1</sup> Furthermore, data strongly support the importance of inflammation with production of oxygen free radicals in the pathogenesis of MyS.<sup>24</sup> This sequence was shown to be arrested in the presence of free radical scavengers in the injured tissue. Thus, the role of AsCA as an antioxidant in the prevention of MyS is the most attractive hypothesis of all. However, a synergistic effect of the Gelfoam scaffolding on the prevention of MyS has to be considered, as this might protect the middle ear from an increased oxygen tension. This effect is likely, as the noncovered TMs showed the most intense deposits.

Also, according to Monboisse and Borel,<sup>25</sup> superoxide anion is capable of fragmenting collagen with secondary liberation of small peptides containing hydroxyproline. Ascorbic acid could play a role in preventing this sequence by protecting collagen from hydroxyl radicals in the presence of oxygen.<sup>14</sup>

In the present study, the regions in the vicinity of the annulus and along the malleus handle were the preferential sites of MyS deposits. One may speculate that this localization might be due to a higher saturation of soluble oxygen in these richly vascularized areas, which, together with the shear stresses created on the fibers by myringotomy,<sup>26</sup> could lead to increased production of oxygen free radicals.

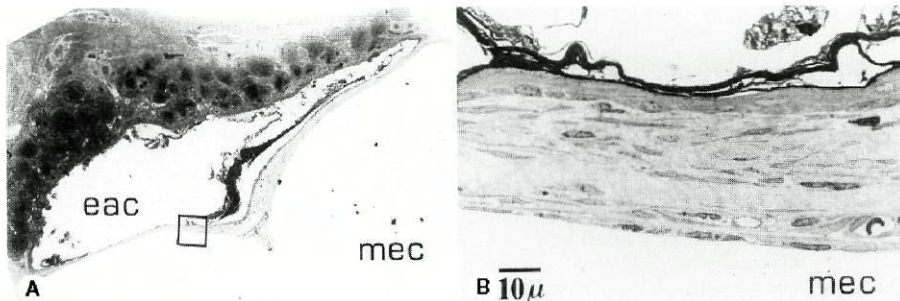
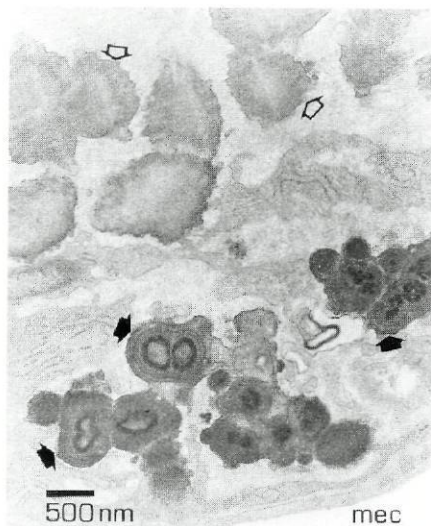


Fig 5. Light micrographs of pars tensa treated with topical application of ascorbic acid after myringotomy. A) Survey micrograph (toluidine blue, original  $\times 30$ ). B) Detail of boxed area in A (toluidine blue, original  $\times 550$ ). Note increased thickness of lamina propria and absence of sclerotic lesions.



**Fig 6.** Electron micrograph of pars tensa from specimen treated with saline solution depicts 2 different types of myringosclerotic lesions encountered: rounded, multi-lamellar lesions with confluent characteristics (dark arrows) and granular, electron-dense structures with spiked surface (open arrows). mec — middle ear cavity.

During wound healing, an excess of iron ions acts negatively,<sup>27</sup> apparently through the activation of free radicals that interact with fibroblast cell membranes, impairing the synthesis of collagen. According to Vaxman et al,<sup>28</sup> reporting the healing of skin sutures in humans, the supplementation of AscA leads to a decreased iron content in the tissue and a subsequent improvement in healing. Mattsson et al<sup>2</sup> obtained a reduction of MyS with the iron chelator desferrioxamine. Consequently, the decrease in iron ions affecting the free radical cascade may also be another beneficial effect of AscA in the present model.

**ACKNOWLEDGMENTS** — The skillful technical assistance of Cathrine Johansson and Ann-Louise Grehn is gratefully acknowledged. Statistical analyses were performed by Claudia Silva, Department of Epidemiology, University of Porto Medical School.

#### REFERENCES

- Hellström S, Goldie P, Magnuson K, Fall C. Oxygen level influences the middle ear tissue reaction in ears with perforated tympanic membranes. In: Lim DJ, Bluestone CD, Klein JO, Nelson JD, Ogra PL, eds. *Proceedings of the Fifth International Symposium on Recent Advances in Otitis Media*. Toronto, Canada: Decker Periodicals, 1993:334-5.
- Mattsson C, Marklund SL, Hellström S. Application of oxygen free radical scavengers to diminish the occurrence of myringosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:513-8.
- Goldschmidt MC. Reduced bactericidal activity in neutrophils from scorbutic animals and the effect of ascorbic acid on these target bacteria in vivo and in vitro. *Am J Clin Nutr* 1991; 54(suppl):1214S-1220S.
- Del Rio M, Ruedas G, Medina S, Victor VM, De la Fuente M. Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. *Life Sci* 1998;63:871-81.
- Hallberg L, Brune M, Rossander L. The role of vitamin C in iron absorption. *Int J Vitam Nutr Res Suppl* 1989;30(suppl): 103S-108S.
- Reddy VN, Giblin FJ, Lin LR, Chakrapani B. The effect of aqueous humor ascorbate on ultraviolet-B-induced DNA damage in lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39: 344-50.

Nitric oxide promotes endothelium-dependent vasodilation. The bioactivity of this molecule is partially dependent on its interaction with superoxide. Ascorbic acid and superoxide dismutase, acting as scavengers of superoxide radicals, indirectly preserve the activity of nitric oxide.<sup>29</sup> Recently, the potentiation of nitric oxide synthesis in endothelial cells by the action of L-AscA was also demonstrated.<sup>30</sup> Both effects might be related to the enhanced vascularity observed otomicroscopically in the AscA-treated TMs compared to the saline-treated and nontreated TMs.

The noninjured anterior quadrant reacted consistently, like a mirror image of the injured side, to the various treatment methods. The decision to restrict the measurements of thickness to the nonperforated side of the TM was justified by the presence of remaining Gelfoam in the area previously perforated, creating unreliable measurements.

In the present study, the rat was used to investigate the influence of AscA on healing TM perforations. Unlike humans, rats are able to endogenously synthesize AscA. Thus, no dietary variations of the AscA content should influence the results. This allowed us to conclude that topical supplementation of AscA was responsible for the effects noted. That AscA exerts effects in nondeprived animals has been shown in rabbits kept under standard nutrition, in which an additional administration of AscA was associated with increased tensile strength of a colonic anastomosis.<sup>10</sup> Similarly, oral lesions in guinea pigs showed enhanced healing following daily intake of AscA above the standard requirements, in comparison to controls fed a standard, nondeprived diet.<sup>13</sup>

From this investigation, it is concluded that AscA strongly diminishes the occurrence of MyS in the healed TM after a myringotomy. These observations open different avenues for future studies to evaluate the possible mechanisms involved, long-term effects, and clinical applications of AscA.

7. Block G. Epidemiologic evidence regarding vitamin C and cancer. *Am J Clin Nutr* 1991;54(suppl):1310S-1314S.
8. Bendich A, Machlin L, Scandurra O, Burton G, Wayner D. The antioxidant role of vitamin C. *Adv Free Radic Biol Med* 1986;2:419-44.
9. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford, England: Clarendon Press, 1989:123-6.
10. Vaxman F, Chalkiadakis G, Olender S, et al. Amélioration de la cicatrisation des anastomoses coliques par une supplémentation en vitamines B5 et C: étude expérimentale chez le lapin. *Ann Chir* 1990;44:512-20.
11. Saika S, Uenoyama K, Hiroi K, Tanioka H, Takase K, Hikita M. Ascorbic acid phosphate ester and wound healing in rabbit corneal alkali burns: epithelial basement membrane and stroma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;31:221-7.
12. Kim M, Otsuka M, Yu R, Kurata T, Arakawa N. The distribution of ascorbic acid and dehydroascorbic acid during tissue regeneration in wounded dorsal skin of guinea pigs. *Int J Vitam Nutr Res* 1994;64:56-9.
13. Collins CK, Lewis AE, Ringsdorf WM Jr, Cheraskin E. Effect of ascorbic acid on oral healing of guinea pigs. *Int J Vitam Nutr Res* 1967;37:492-5.
14. Pasquali-Ronchetti I, Quaglino D, Bergamini G. Ascorbic acid and connective tissue. In: Harris JR, ed. *Subcellular biochemistry*. Vol 25. New York, NY: Plenum Press, 1996:249-64.
15. Laurent C, Hellström S, Fellenius E. Hyaluronan improves the healing of experimental tympanic membrane perforations. A comparison of preparations with different rheologic properties. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988;114:1435-41.
16. Fina M, Baird A, Ryan A. Direct application of fibroblast growth factor improves tympanic membrane perforation healing. *Laryngoscope* 1993;103:804-9.
17. Hellström S, Spandow O. Exogenous heparin, topically administered, aids the remodelling of connective tissue in the healing of experimental tympanic membrane perforations. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1994;56:45-50.
18. Yamaguchi M, Asaga H, Hasegawa S, Shimada S. Vitamin C metabolism in the tympanic membrane in chronic inflammation [in Japanese]. *South Med J* 1970;63(suppl):956-7.
19. Yamaguchi T. Pathology of the tympanic mucosa with chronic inflammation with reference to vitamin C metabolism [in Japanese]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 1972;75:905-7.
20. Olsen BR, Prockop DJ. Ferritin-conjugated antibodies used for labeling of organelles involved in the cellular synthesis and transport of procollagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:2033-7.
21. Kinney SE. Post-inflammatory ossicular fixation in tympanoplasty. *Laryngoscope* 1978;88:821-38.
22. Bhaya MH, Schachern PA, Morizono T, Paparella MM. Pathogenesis of tympanosclerosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;109:413-20.
23. Hellström S, Fall C, Goldie P, Magnuson K, Spandow O. Factors influencing the development of tympanosclerosis: an experimental study. In: McCabe BF, Mogi G, eds. *Immunobiology in otology, rhinology and laryngology*. Amsterdam, the Netherlands: Kugler Publications, 1992:159-62.
24. Mattson C. Myringosclerosis. An experimental basis for a theory of its etiology [Dissertation]. Umeå, Sweden: Umeå University, 1997:34-51.
25. Monboisse J, Borel J. Oxidative damage to collagen. In: Emerit J, Chance B, eds. *Free radicals and aging*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 1992:323-7.
26. Lesser TH, Williams KR, Skinner DW. Tympanosclerosis, grommets and shear stresses. *Clin Otolaryngol* 1988;13:375-80.
27. Ackerman Z, Seidenbaum M, Loewenthal E, Rubinow A. Overload of iron in the skin of patients with varicose ulcers. Possible contributing role of iron accumulation in progression of the disease. *Arch Dermatol* 1988;124:1376-8.
28. Vaxman F, Olender S, Lambert A, Nisand G, Grenier JF. Can the wound healing process be improved by vitamin supplementation? Experimental study on humans. *Eur Surg Res* 1996;28:306-14.
29. Jackson TS, Xu A, Vita JA, Keaney JF Jr. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ Res* 1998;83:916-22.
30. Heller R, Munscher-Paulig F, Grabner R, Till U. L-Ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. *J Biol Chem* 1999;274:8254-60.

# **Discussão Global**

---

---

## I. INTERACÇÕES ENTRE O OUVIDO MÉDIO E O OUVIDO INTERNO

### 1. LABIRINTITE SEROSA

A extraordinária sensibilidade dos receptores neuroepiteliais do órgão de Corti exige uma homeostase muito fina, para a qual contribui a estabilidade da composição dos fluidos labirínticos envolventes. Este equilíbrio pode ser alterado em consequência de vários tipos de agressões nas quais se incluem as medicações ototóxicas e os processos inflamatórios da vizinhança como a otite média e a meningite. É conhecido que certas formas de otite média podem reflectir-se dramaticamente na fisiopatologia do ouvido interno (Turner & Fraser 1928; Paparella & Sugiura 1967), enquanto que noutros casos as alterações funcionais cocleares assumem formas mais subtis (Paparella *et al.* 1970a, 1972, 1984).

No princípio do século passado, Fraser (1914) diagnosticou 216 casos de labirintite purulenta otogénica, que constituíam aproximadamente 1.5% dos casos de otite média observados clinicamente por esse autor. Anos mais tarde, Mysel (1942) registou uma redução na incidência de complicações labirínticas, em aproximadamente sete vezes, após a introdução dos antibióticos no armamentário terapêutico. Contudo, num estudo realizado na Polónia por Sekula (citado por Miodonski 1958), de 1945 a 1954, a percentagem de casos de labirintite em doentes com otite



média variava entre 4.7-16%. A este propósito, refira-se que a maioria dos casos contabilizados nestas séries representavam situações severas de labirintite com surdez e vertigem incapacitantes, em que muitos dos doentes apresentavam, concomitantemente, outras complicações supuradas da otite média.

No decurso da OMA, paralelamente às endo e exotoxinas e outros produtos de lise bacteriana (Iino *et al.* 1987), coexistem no fluido do ouvido médio várias substâncias com potencial ototóxico, que incluem diversos mediadores da inflamação como a histamina, lisozima, prostaglandinas, leucotrienos (Bernstein *et al.* 1979; Juhn *et al.* 1980, 1992; Jung 1988, McCormick *et al.* 2003), vários tipos de interleuquinas (Sato *et al.* 1999) e radicais livres de oxigénio (Forseni & Hulcrantz 2002). Conhecendo-se o potencial que estes produtos têm de atravessar a MJR, ou de actuar como facilitadores da permeabilidade dessa membrana, é possível especular-se que existindo OMA haja risco potencial de labirintite (Goycoolea 2001). Ora, quando os espaços do ouvido interno são invadidos por toxinas sem a presença de bactérias ou células inflamatórias, é provável a ocorrência de labirintite serosa. Se tal acontecer, a alteração do equilíbrio bioquímico dos fluidos labirínticos daí resultante é susceptível de provocar disfunção dos receptores cocleares e vestibulares, com graus variáveis de hipoacusia e vertigem. A severidade e eventual recuperação da função cocleo-vestibular estarão dependentes da extensão do processo patológico subjacente (Paparella *et al.* 1972).

Demonstrou-se na publicação II que dos 1151 ossos temporais humanos estudados, 96 casos (8.3%) apresentavam evidência histopatológica de labirintite serosa. Destes, 69 doentes (72%) tinham patologia do ouvido médio. O fluido seroso era mais proeminente no compartimento coclear que no vestibular, localizando-se em 91% dos casos na rampa timpânica adjacente à MJR. No total, 20% dos ossos temporais com OMA evidenciavam um precipitado eosinofílico dos fluidos labirínticos

indicativo de labirintite serosa. Note-se que a elevada prevalência das interacções entre o ouvido médio e o ouvido interno já havia sido destacada por Paparella e colaboradores (1972), numa investigação englobando 344 ossos temporais humanos, na qual verificaram que 82% dos ouvidos com OMA apresentavam alterações histopatológicas da rampa timpânica da cóclea, sendo 19% classificados como labirintite serosa pura, i.e. sem infiltrado celular.

Como se referiu anteriormente, a MJR tem uma permeabilidade selectiva que resulta da interacção dinâmica entre a própria membrana e a substância que a tenta atravessar. As propriedades que determinam a passagem de uma determinada substância são as suas dimensões, configuração, lipossolubilidade e carga eléctrica (Goycoolea *et al.* 1988). Estudos histopatológicos demonstraram que, no decurso da OMA, a MJR sofre transformações similares às do mucoperiósteo do ouvido médio (Goycoolea 1979, 1980a). Sobre as condições da própria membrana, sabe-se por exemplo que nas fases iniciais de inflamação a sua permeabilidade parece estar aumentada (Goycoolea *et al.* 1980b; Nomura 1984; Schachern *et al.* 1987; Ikeda *et al.* 1988), enquanto que o seu espessamento na otite média crónica leva a uma redução da sua permeabilidade com efeitos virtualmente protectores (Nomura 1984; Schachern *et al.* 1987; Lundman *et al.* 1992).

Druss em 1929, fundamentado em observações pessoais e nos trabalhos pioneiros de Wittmaack (1926), sublinhou a relativa fragilidade da MJR comparativamente ao resistente ligamento anular da janela oval, com implicações no que respeita à possível porta de entrada do ouvido médio para o ouvido interno. Do mesmo modo, os resultados da presente investigação (*Publicação II*) indicam que a janela oval só muito raramente participará na génese da labirintite serosa e tal apenas acontece nos casos em que a integridade mecânica do ligamento anular esteja perturbada, como anteriormente foi salientado por Saijo & Kimura (1984).

Aliás, Goycoolea e colaboradores (1980a) num estudo sobre as janelas oval e redonda, não detectaram soluções de continuidade na articulação estapedovestibular em diferentes fases da otite média experimental. Outras hipotéticas vias de interação entre o ouvido médio e o ouvido interno incluem a absorção das substâncias pelo mucoperiósteo do ouvido médio ou através de comunicação por passagem por minúsculas comunicações linfáticas (Bortnick & Proud 1965; Lim & Hussl 1975; Arnold 1976; Sakagami *et al.* 1990).

Segundo Goycoolea (1992), a permeabilidade da MJR deve ser encarada mais como um acidente do que uma função normal desta estrutura. Este postulado é merecedor de realce, atendendo a que as modificações histopatológicas apresentadas pela MJR no decurso da otite média têm sido descritas como progressivas, semelhantes às alterações observadas no mucoperiósteo do ouvido médio (Goycoolea *et al.* 1980a). Neste âmbito, Sahni e colaboradores (1987) efectuaram um estudo em ossos temporais humanos no qual verificaram que a MJR nos doentes com otite média se encontrava espessada, atingindo um máximo de espessura na otite média crónica. Por seu lado, numa investigação animal executada por Johansson e co-investigadores (1993), a espessura da MJR, comparativamente ao normal, apresentou um aumento em cerca de seis vezes na OMA e duas vezes na otite média com efusão. Ultraestruturalmente, este aumento de espessura da MJR deve-se em parte à metaplasia do epitélio da camada externa e à presença de células inflamatórias do espaço subepitelial (Hellström *et al.* 1988a; Johansson *et al.* 1993). Para Yoon & Hellström (2002), o aumento de densidade dos fibroblastos e do conteúdo de elastina na região próxima à camada mesotelial interna, contribuiriam de forma relevante para a limitação da permeabilidade da MJR no período que se segue à OMA. Aliás, estudos de difusão experimentais demonstraram uma menor permeabilidade da MJR a alguns marcadores no decurso da otite média crónica (Schachern *et al.* 1987), ou nas fases de resolução da OMA (Ikeda *et al.* 1990).

Considerando os resultados da presente investigação (*Publicação II*) verifica-se a existência de uma complementaridade com os estudos anteriormente mencionados, já que a frequência com que se detectaram fenómenos de labirintite serosa nos ouvido com otite média crónica foi comparativamente inferior à dos ossos temporais portadores de OMA. Portanto, verificando-se que as alterações morfológicas induzidas por diversos agressores parecem ser igualmente responsáveis por alterações da dinâmica da permeabilidade, é admissível invocar-se a existência de mecanismos de defesa intrínsecos à própria MJR (Goycoolea 1992).

Com efeito, da sinopse dos trabalhos entretanto publicados, entre os quais se contam os que constituem esta dissertação (*Publicações I e II*), são inúmeros os dados que sustentam a evidência de interações entre o ouvido médio e o ouvido interno, sendo lícito pensar-se na labirintite serosa como a complicação mais frequente da otite média, e da OMA em particular. Contudo, dado o carácter frequentemente reversível das repercussões auditivas desta entidade clínica (*Publicação I*) e a sobreposição de fenómenos de hipoacusia de condução típicos da OMA, fazem com que o seu diagnóstico passe frequentemente despercebido na prática clínica diária. Não raramente, a suspeita diagnóstica surge apenas quando se verificam fenómenos simultâneos de disfunção vestibular com um quadro clínico de vertigem. Contudo, como se verificou na presente investigação (*Publicação II*), o diagnóstico histopatológico de envolvimento do compartimento vestibular por fenómenos de labirintite serosa, associados à OMA, é substancialmente menor do que o manifestado ao nível coclear. Daqui também decorre que a labirintite serosa não é necessariamente um fenómeno difuso, podendo, em vez disso, surgir centrado na rampa timpânica da espira basal coclear (*Publicação II*).

Partindo do conjunto destes estudos é possível por outro lado especular-se que o risco de utilização de tratamentos tópicos do ouvido com gotas otológicas com antibióticos em doentes com perfuração timpânica e otite média crónica, nos quais o nicho da janela redonda se encontra

habitualmente preenchido por tecido de granulação, comportará um menor risco de ototoxicidade do que anteriormente temido (Schachern *et al.* 1987; Goycoolea 2001).

A análise histopatológica da labirintite serosa em ossos temporais humanos, baseada em grande parte na detecção de uma coloração eosinofílica dos fluidos labirínticos indicativa de alterações no seu conteúdo proteico, exigia previamente a resposta a uma questão técnica ainda em aberto: até que ponto possíveis artefactos *post-mortem* poderiam influenciar a presença desse mesmo precipitado eosinofílico? Na *Publicação II* verificou-se pela primeira vez, através de dois métodos distintos, não haver relação entre o tempo que decorreu até à fixação laboratorial do osso temporal e a presença de sinais de labirintite serosa. Este resultado conferiu um maior poder às correlações que se estabeleceram entre os fenómenos de labirintite serosa e a patologia da vizinhança.

É interessante que se tenha registado, proporcionalmente, um maior número de dadores com labirintite serosa nos estratos etários mais baixos. Tal facto poderá dever-se à maior incidência de patologia otológica aguda nessas idades.

Não obstante o cerne da presente dissertação ser a OMA e as suas interacções com o ouvido interno, em especial a sua importância no desencadear da labirintite serosa, não será despropositado dedicar-se algumas linhas à labirintite com ponto de partida meníngeo. Aliás, as interacções entre o ouvido médio e ouvido interno e destas regiões com os espaços meníngeos são alvo de um renovado interesse na actualidade. Atente-se nas recentes descrições de casos de meningite otogénica associada ao emprego de determinados implantes cocleares (Arnold *et al.* 2002).

Em 1920, Fraser & Dickie publicaram uma revisão da literatura sobre a incidência da labirintite secundária à meningite epidémica, encontran-

do taxas entre 4-37.5%. Zuckerman (1933) referiu uma incidência de surdez profunda de 3,8% de 230 crianças com meningite meningocócica, enquanto que para Sell e colaboradores (1972) essa incidência ascenderia a 35% dos doentes com meningite por *H. influenzae*. Já para Nadol (1978), a meningite bacteriana estaria associada a um risco de surdez neurossensorial em 21% dos sobreviventes. Na série estudada por este último autor, a maioria dos casos apresentava um tipo de surdez neurossensorial com carácter irreversível, resultado da labirintite purulenta, enquanto que nos casos com surdez parcial ou temporária o mecanismo de envolvimento seria aparentemente por labirintite serosa. Curiosamente, as meningites víricas, ditas “assépticas”, não revelaram qualquer comprometimento auditivo. É interessante que num estudo anterior de Liebman e colegas (1969), já se tivesse mencionado a possibilidade de, em alguns casos, haver uma reversibilidade da hipacusia consequente à meningite bacteriana.

As principais vias de comunicação entre o ouvido interno e o compartimento meníngeo são por um lado o aqueduto coclear e por outro o canal auditivo interno através do modíolo (Crowe 1928; Perlman & Lindsay 1939; Asher & Sando 1981; Schucknecht & El-Seifi 1963). Na *Publicação II*, detectaram-se fenómenos de labirintite serosa em pacientes com patologia meníngea variada, embora em reduzido número. Note-se que, na colecção de ossos temporais da Universidade de Minnesota objecto do presente trabalho (*Publicação II*), a grande maioria dos dados com meningite purulenta e sinais de propagação infecciosa para o ouvido interno, apresentam sinais histopatológicos graves de labirintite purulenta e só raramente labirintite serosa (observações pessoais não publicadas).

Como é sabido, estudos prévios referem a ocorrência de hidropisia endolinfática secundariamente à otite média (Paparella *et al.* 1983). Segundo Schucknecht & McNeill (1966), a hidropisia endolinfática da labirintite serosa não é reversível, mas como também não possui um

carácter progressivo, habitualmente não provoca vertigem. As primeiras descrições de hidropisia endolinfática em associação à otite média, feitas a partir de observações levadas a cabo em modelos animais, foram efectuadas por Wittmaack (1956) e Kimura (1968). Noutro estudo (Meyerhoff *et al.* 1980), 45% dos ouvidos com OMA induzida experimentalmente apresentavam hidropisia endolinfática, maioritariamente na região apical coclear. Embora a hidropisia endolinfática tenha sido observada no Homem na ausência de labirintite (Sando *et al.* 1976), especificamente em casos conotados com doença de Ménière, a sua ocorrência histopatológica parece ser mais frequente nos ossos temporais com labirintite, seja do tipo otogénico ou meningogénico (Lindsay 1968, Paparella & Sugiura 1967). A evidência da associação entre otite média e hidropisia endolinfática surge valorizada após estudos animais e humanos (Paparella *et al.* 1979, 1983). Por exemplo, Kawauchi e associados (1988) verificaram que a instilação de endotoxina de *Salmonella typhimurium* no ouvido médio de chinchilas, para além de originar lesões histopatológicas ao nível da estria vascular e células ciliadas cocleares, se associava ao desenvolvimento de hidropisia endolinfática em cerca de 70% dos casos.

Na mesma linha detectaram-se, no presente estudo, sinais de hidropisia endolinfática em 26% dos casos com labirintite serosa, representando uma taxa significativamente maior do que nos ouvidos sem evidência histopatológica de labirintite serosa (*Publicação II*). Num estudo precedente, Paparella e co-autores (1979) descreveram hidropisia endolinfática em 39% dos ossos temporais com otite média, e por isso estabeleceram uma correlação causal, em particular entre situações de otite média silenciosa ou sub-clínica e hidropisia endolinfática. Evidência clínico-patológica mais detalhada, da associação entre a otite média e síndrome de Ménière, foi posteriormente objecto de uma outra publicação do mesmo grupo (Paparella *et al.* 1983).

## 2. REPERCUSSÕES AUDITIVAS

Como se disse, a otite média cursa com um quadro sintomatológico rico, sendo causa de diversas sequelas, entre as quais avulta a hipoacusia. A hipoacusia de condução é aceite pela generalidade dos autores e são vários os investigadores que apresentam evidência, clínica e experimental, da coexistência de disfunção coclear e consequente hipoacusia neurossensorial nesta condição patológica (Paparella *et al.* 1970a; English *et al.* 1973; Aviel *et al.* 1982; Morizono *et al.* 1985; Vartiainen & Karjalainen 1987). Na maioria dos estudos, a deterioração dos limiares auditivos na via óssea foi utilizada como indicativo do envolvimento coclear. Na sequência das experiências pioneiras de electrofisiologia coclear em animais com OMA efectuadas por Morizono e co-autores (1985), Spandow e colegas (1989) demonstraram através de medições por potenciais evocados auditivos, que a inoculação de endotoxina de *Escherichia coli* numa concentração de 0.01mg/ml na MJR do Rato causava hipoacusia neurossensorial temporária, enquanto uma concentração cem vezes superior originava uma surdez irreversível. Numa outra investigação sobre a otite média induzida imunologicamente (Gloddek *et al.* 1992), foi estabelecida uma correlação entre os níveis de interleuquina-2 no ouvido médio e a sua difusão para a perilinfa com a diminuição da amplitude e aumento das latências nos traçados de potenciais evocados.

Porém, a maioria dos trabalhos clínicos tem sido dedicada essencialmente às sequelas auditivas da otite média crónica (Gardenghi 1955; Paparella *et al.* 1972, 1980, 1984; English *et al.* 1973; Moore & Best 1980; Dumich & Harner 1983; Walby *et al.* 1983; Vartiainen & Karjalainen 1987; Tos 1988; Browning & Gatehouse 1989; MacAndie & O'Reilly 1999; Papp *et al.* 2003) ou da otite média com efusão em crianças (Arnold *et al.* 1977; Moore & Best 1980; Aviel *et al.* 1982; Hellström *et al.* 1985; Yamashita *et al.* 1985; Löppönen *et al.* 1992; Mutlu *et al.* 1998). Mais especificamente, no que diz respeito à hipoacusia neurossensorial suscitada pela presença de otite média crónica supurada, Paparella e colegas



(1984) efectuaram um vasto estudo multicêntrico englobando os dados audiométricos de 1082 ouvidos com otite média crónica, tendo mencionado um envolvimento coclear igual ou superior a 15 dB em 42% dos casos, o que corresponderia a um risco oito vezes superior aos dos controlos do mesmo estrato etário. Em estudos precedentes, a incidência da hipoacusia neurosensorial na otite média crónica variou entre os 34% e 92% dos casos estudados (Gardenghi 1955; Frickhinger 1957; Paparella *et al.* 1970a; English *et al.* 1973; Rice 1978). Na tentativa de explicar este tipo de fenómeno, diversas teorias têm sido avançadas. Com efeito, refere-se a passagem de toxinas do ouvido médio para o ouvido interno (Paparella 1984), bem como os efeitos colaterais do tratamento tópico com fármacos ototóxicos – comum nos doentes com otite média crónica (Tanaka & Motomura 1981) – até à possibilidade do agravamento do limiar da via óssea não ser mais que um reflexo da hipoacusia de transmissão através de um fenómeno semelhante ao efeito de Carhart observável na otosclerose (Carhart & Haynes 1949; Walby *et al.* 1983; Browning & Gatehouse 1989). Diga-se relativamente a esta última hipótese que, para Dumich & Harner (1983), a fixação da cadeia ossicular e do estribo em particular não deverão ser responsabilizados pelo nó de Carhart na otite média crónica, já que na sua série de doentes os níveis do atingimento na via óssea eram os mesmos após a cirurgia. Aliás, numa outra investigação que incidiu em 161 doentes com otite média crónica unilateral, Levine e co-autores (1989) verificaram hipoacusia neuro-sensorial estatisticamente significativa nos ouvidos doentes, fornecendo indicações que os ouvidos com patologia mais marcada no ouvido médio teriam mais propensão para hipoacusia neurosensorial. Contudo, no doente comum, a perda auditiva neurosensorial parece ter um significado clínico discreto (Browning & Gatehouse 1989).

Por outro lado, as taxas de hipoacusia neurosensorial relacionada com a otite média com efusão variam entre 9% e 40%, de acordo com diversas séries (Frickhinger 1957; Arnold *et al.* 1977; Harada *et al.* 1990;

Löppönen *et al.* 1992; Mutlu *et al.* 1998). Para Kobayashi e co-investigadores (1988), a deterioração audiométrica na via óssea que surge associada à otite média com efusão, pode atingir qualquer gama de frequências e habitualmente reverte com o tratamento. Estes dados estão em contradição com as afirmações de Arnold e colegas (1977) e Aviel & Ostfeld (1982), para os quais a hipoacusia neurosensorial não reverte na maioria dos casos, mesmo após a colocação de tubos de ventilação transtimpânicos. Mutlu e colegas (1998), notaram que os casos com alterações irreversíveis dos limiares auditivos constituíam uma minoria, enquanto os ouvidos que apresentavam flutuações temporárias recuperaram completamente com o tratamento.

Paralelamente, embora os mecanismos fisiopatológicos que regem o possível desenvolvimento de hipoacusia neurosensorial na OMA sejam *a priori* comuns aos acima descritos, a investigação sobre as variações dos limiares da condução óssea na OMA tem sido escassa e motivo de alguma controvérsia (Hulka 1941; Munker 1981; Paparella *et al.* 1984; Morizono *et al.* 1985; Tos 1988; Karma *et al.* 1989; Sorri *et al.* 1995). Note-se que, até à presente data, a maioria destes estudos foram planeados tendo em vista a detecção de sequelas a longo prazo e não sobre os efeitos imediatos da OMA nos limiares auditivos.

Assim, alguns autores como Tos (1988) invocam que, sendo a incidência de OMA tão elevada na criança, a surdez neurosensorial deveria ter uma maior prevalência na idade pré-escolar do que é habitualmente mencionada. Esta asserção foi baseada na análise de uma série de crianças com 8-12 anos de idade possuidoras de um passado reconhecido de OMA, na qual o referido investigador (Tos 1988) não detectou indicadores audiométricos significativos de surdez neurosensorial residual. Mais dados contraditórios foram apresentados por outros autores (Jeppsson *et al.* 1973; Rahko *et al.* 1989), que também não detectaram evidência de hipoacusia neurosensorial significativa nas formas não-complicadas de

OMA ou com o seu tratamento, mesmo em situações recorrentes. Num outro artigo do mesmo grupo (Karma *et al.* 1989), concluiu-se que o efeito da OMA nos limiares audiométricos da via óssea, entre 0.5 e 4 kHz, era quase negligenciável a longo prazo. Já outros autores identificaram diminuição dos limiares auditivos da via óssea, indicando hipoacusia neurosensorial, em séries de crianças com OMA (Hulka 1971; Münker 1981). Recentemente, Ikui e colaboradores (1999) publicaram os resultados duma série de onze doentes adultos com evidência de hipoacusia neurosensorial durante a OMA, nos quais registaram uma taxa de recuperação audiométrica em 83% dos casos. Também Sugiushi e colegas (1998) descreveram hipoacusia neurosensorial em doentes com OMA, referindo uma taxa de reversibilidade em 4/5 dos doentes após o tratamento. Em sintonia com estes trabalhos, há vários casos clínicos publicados em que se alude à hipoacusia neurosensorial em doentes com OMA (Farrington & Weider 1991; Margolis & Nelson 1993; Okonska *et al.* 1995; Kanazawa *et al.* 2000).

Um dos aspectos que se salienta neste trabalho (*Publicação I*) é a vertente prospectiva e controlada da avaliação audiométrica, com as medições efectuadas logo no momento do diagnóstico da OMA e nos 15 e 30 dias subsequentes. Este facto permitiu verificar que os limiares auditivos, tanto da via aérea como da via óssea, estavam significativamente degradados durante a OMA, de forma mais evidente entre 4-8 kHz, e que este comprometimento dos limiares era geralmente temporário apresentando uma tendência para a normalização nas fases da convalescência (*Temporary Thresholds Shift*). É interessante que estudos publicados por outros autores tenham revelado que em adolescentes com passado de OMA havia deterioração dos limiares auditivos para frequências altas alargadas (8-20 kHz), dos limiares dos reflexos acústicos por impedancimetria de banda larga e dos níveis de resposta das otoemissões acústicas evocadas por um clique (Margolis *et al.* 1993, 2000; Hunter *et al.* 1996; Ryding *et al.* 2002). Estes estudos sugerem que a mecânica do

ouvido médio nas crianças com passado de OMA está afectada e a função coclear provavelmente também. Note-se que, inclusivamente o próprio grupo finlandês (Karma *et al.* 1989; Rahko *et al.* 1989, 1995) que no passado se havia revelado céptico sobre as sequelas auditivas da OMA, veio rever a sua posição numa publicação mais recente (Laitila *et al.* 1997) afirmando que a OMA recorrente pode realmente resultar num prejuízo da audição nas altas frequências, relacionado com o número de episódios precedentes.

Resumidamente, os dados que se apresentam na *Publicação I* são sugestivos do agravamento audiométrico da via óssea, situação a ser encarada como uma ocorrência comum no decurso da OMA, em especial na gama das frequências altas. Aparentemente, na maioria dos casos, este fenómeno desenrola-se de forma transitória. Contudo, algumas questões permanecem em aberto: Será que estas flutuações da audição, muitas vezes discretas, se associam a uma fragilização das células ciliadas cocleares e as tornam mais susceptíveis à degenerescência espontânea prematura anos mais tarde? Ou, será que potencia o risco de surdez após a exposição ao ruído ou aos ototóxicos?

A juntar a estas considerações, será igualmente pertinente salientar que de acordo com a sua localização anatómica, as células ciliadas do órgão de Corti situadas na rampa basal da cóclea são as mais expostas às agressões provenientes do ouvido médio (*Publicação I*), o que, consequentemente, se traduzirá num componente audiométrico de hipoacusia neurosensorial com predomínio nas altas frequências (*Publicação II*) ou ainda mais especificamente na audiometria para frequências altas alargadas (Margolis *et al.* 1993, 2000; Laitila *et al.* 1997; Ryding *et al.* 2002).

## II. A MIRINGOTOMIA NA OMA

Uma discussão sobre a miringotomia na 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 bastante pouco em anos recentes. Embora os antibióticos tenham reduzido as indicações para a sua utilização rotineira, a miringotomia ainda é uma intervenção frequente em idade pediátrica e para a qual existem indicações formais. O consenso sobre o seu interesse ou não na OMA não-complicada ainda não foi obtido e, considerando a presente emergência de bactérias com múltiplas resistências aos antimicrobianos, é de prever um ressurgimento da sua utilização mais frequente no futuro. A título de exemplo, ainda muito recentemente Pichichero (2000) assumiu que para se avaliar correctamente a eficácia antibiótica na OMA - um problema tão actual - o recurso a miringotomias seriadas é indispensável; defende só assim ser possível avaliar a erradicação do agente infeccioso, realizando o denominado teste de sensibilidade *in vivo*, e deste modo aferir qual a actividade 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, no qual se incluem as situações de labirintite.

### 1. O RATO COMO MODELO DA MIRINGOTOMIA NA OMA

O estudo histopatológico da dinâmica da cicatrização timpânica pós-miringotomia, por razões de índole ética, não é possível ser efectuado no Homem. Ao longo dos anos, a indução experimental da OMA para estudo histopatológico tem sido desenvolvida preferencialmente através da inoculação do ouvido médio com diversos tipos de bactérias viáveis em diversas espécies animais como o Chinchila (Friedman 1955; Giebink *et*

*al.* 1976; Chung *et al.* 1994; Ehrlich *et al.* 2002), o Gerbil da Mongólia (Fulghum *et al.* 1982), o Gato (Hueb *et al.* 1996), e o Rato (Hermansson *et al.* 1988, 1990, 1996; Gröte *et al.* 1989; Magnusson *et al.* 1994, 1996, 1997; Zeevi *et al.* 1996; Forseni 2000; Hellström *et al.* 2000; Cayé-Thomasen *et al.* 2001, 2002; Westman & Melhus 2002).

Outros métodos utilizados para induzir inflamação aguda no ouvido médio incluem a inoculação de bactérias não-viáveis (Lowell *et al.* 1980; Ripley-Petzoldt *et al.* 1988a; Sato 1997, 1999), de vírus (Giebink *et al.* 1980; Lim *et al.* 1988; Ripley-Petzoldt *et al.* 1988b; Chung *et al.* 1993; Suzuki & Bakaletz 1994), e de mediadores inflamatórios, antígenos bacterianos, exotoxinas ou endotoxinas (Nonomura *et al.* 1987; DeMaria *et al.* 1984; Ripley-Petzoldt *et al.* 1988b; Krekorian *et al.* 1990; Rhee *et al.* 1993; Leake *et al.* 1994; Fujioka *et al.* 1994). Outros investigadores desenvolveram modelos alternativos de otite média através de métodos como a inoculação da nasofaringe com bactérias e colonização secundária via trompa de auditiva (van der Ven *et al.* 1999; Eriksson & Hellström 2003), a mediação imunológica (Tachibana *et al.* 1985; Jung *et al.* 1988b; Jewett *et al.* 1999;), através da obstrução da trompa auditiva (Goycoolea *et al.* 1979; Stenfors *et al.* 1981; Tos *et al.* 1984; Jin *et al.* 1991; Hueb *et al.* 1996; Piltcher *et al.* 2002), ou ainda pela secção do palato (Paparella *et al.* 1970b; Widemar *et al.* 1986; Jecker *et al.* 1996).

De todos estes modelos experimentais, sem dúvida um dos mais consistentemente testados e a que mais vezes se recorre actualmente 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 (Hellström *et al.* 1988b, 2000; Hermansson *et al.* 1988, 1990, 1996; Johansson *et al.* 1993; Magnusson *et al.* 1994, 1996, 1997; Melhus *et al.* 1994; Mattsson *et al.* 1998; Westman *et al.* 1999; Forseni 2000; Cayé-Thomasen *et al.* 2001, 2002). Justamente por se tratar de um modelo com uma alta eficácia e reprodutibilidade, rotinizado nos laboratórios onde se levaram a cabo os experimentos aqui relatados, a ele se recorreu.

Para mais, as já mencionadas semelhanças morfológicas entre a MT do Rato e do Homem, favorecem a sua utilização experimental e daí serem mais consistentes as extrapolações que se efectuam 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 (Stenfors *et al.* 1981; Söderberg *et al.* 1984, 1985; Mattsson *et al.* 1998; Magnuson *et al.* 1996), como após a aplicação tópica de substâncias que vão desde a heparina exógena (Hellström & Spandow 1994), corticosteroides (Spandow *et al.* 1990), ácido hialurónico (Laurent *et al.* 1988), diversos factores de crescimento (Mondain *et al.* 1991; Amoils *et al.* 1992; Fina *et al.* 1993), até à utilização de células estaminais embrionárias (von Unge *et al.* 2003).

## **2. A MIRINGOTOMIA COMO ABORDAGEM PARA O DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DA OMA**

Uma dissertação em que se pretende investigar algumas vertentes da miringotomia na OMA, ficaria incompleta sem uma discussão, ainda que sumária, sobre um dos componentes em que a miringotomia é geralmente aceite como tendo grande utilidade: a análise microbiológica dos agentes infectantes durante a OMA.

Como abordado anteriormente, em consequência da permanente mutação das resistências bacterianas tem-se imposto cada vez mais a necessidade de um conhecimento actualizado das prevalências dos agentes infecciosos na OMA, parâmetro que deve ser regularmente aferido em diferentes áreas geográficas. Tal não tem acontecido em Portugal, pelo menos com a consistência desejável.

Actualmente, na maioria dos países, a terapêutica antibiótica mantém-se na primeira linha do tratamento de um episódio de OMA não compli-

cada. A selecção do antimicrobiano é feita, a maior parte das vezes, de modo empírico devido à dificuldade em se obterem culturas. Além disso, embora a maioria dos investigadores que se dedicam a este assunto indiquem o *S. pneumoniae*, o *H. influenzae* e a *M. catarrhalis* como os agentes patogénicos mais frequentes da OMA, a prevalência das resistências não é na generalidade bem conhecida (Berman 1995). Esta situação parece ser inteiramente aplicável ao panorama português. Ora, estando provado que a erradicação dos agentes patogénicos do ouvido médio e o resultado clínico após o tratamento são piores na presença de agentes pouco susceptíveis aos antimicrobianos (Gehanno *et al.* 1995; Dagan *et al.* 1996), é urgente um aprofundamento dos conhecimentos nesta matéria. Perante este cenário, desenvolveu-se um estudo (*Publicação III*) que pretendeu analisar a prevalência bacteriana na OMA pediátrica na região do Porto. Isolaram-se patógenos em 68% das culturas efectuadas. Por ordem decrescente detectaram-se: 32% *S. pneumoniae*, 16.1% *H. influenzae*, 16.1% *S. aureus*, 12.9% *S. pyogenes* e 6.5% *M. catarrhalis*. Dez culturas revelaram-se negativas. Comparativamente ao exame cultural, a análise PCR garantiu um elevado grau de especificidade permitindo ao mesmo tempo aumentar a sensibilidade do diagnóstico microbiológico, com taxas de identificação bacteriana superiores para todas as estirpes bacterianas testadas. Estes achados suportam um estudo prévio que revelou um índice de sensibilidade de 155% do PCR relativamente às culturas, para detecção de *S. pneumoniae* em aspirados de OMA (Virolainen *et al.* 1994).

Os problemas que se verificam com a emergência de bactérias com baixa susceptibilidade aos antimicrobianos na OMA iniciaram-se na década de 1970 com os *H. influenzae* e *M. catarrhalis* produtores de beta-lactamases e prolongaram-se na década de 1980 com o recrudescimento de estirpes de *S. pneumoniae* multi-resistentes. A partir de 1990, o aumento sustentado das resistências nas estirpes bacterianas infectantes



das vias aéreas passou a constituir um problema clínico comum na prática diária em todo o mundo. Actualmente, nos E.U.A., cerca de 25% dos *S. pneumoniae* são resistentes à penicilina e respectivamente 25% dos *H. influenzae* e 90% das *M. catarrhalis* produzem beta-lactamases (Klein 2002), o que se reflecte claramente na abordagem terapêutica da OMA. Como prova da relevância clínica deste tema na actualidade, vários grupos de vigilância multinacionais têm sido criados nos últimos anos com a finalidade de monitorizar a taxas de resistências bacterianas (Jacobs *et al.* 1998; Sahm *et al.* 2000; Felmingham *et al.* 2000).

Jacobs e colegas (1998), num estudo multicêntrico sobre a microbiologia da OMA pediátrica em 917 espécimes colhidos (80% por timpanocentese, 15% por colheita de otorreia pós-perfuração da MT e 2% provenientes de otorreia pós-tubo ventilação) nos E.U.A, e na Europa Central e Europa Oriental, obtiveram 62% de culturas positivas. No total, as percentagens de agentes isolados foram 30% *S. pneumoniae* (30% e 10% resistentes respectivamente à penicilina e amoxicilina/ácido clavulânico), 17% *H. influenzae* (30% beta-lactamase positivos), 7% *S. pyogenes*, 4% *M. catarrhalis* (100% beta-lactamase positivos) e em 3% culturas mistas destas bactérias. As diferenças na distribuição geográfica dos diferentes microrganismos e suas susceptibilidades aos antimicrobianos eram significativas. Do mesmo modo, a probabilidade de isolamento de um agente resistente diminuiu com o aumento da idade da criança. Ainda neste estudo, verificou-se que nas regiões da Europa Central e Europa Oriental as resistências do *S. pneumoniae* no ouvido médio coincidiram com as encontradas em culturas provenientes da nasofaringe.

Por seu lado, Felmingham e co-autores (2002), num outro estudo multicêntrico sobre a susceptibilidade global do *S. pneumoniae* em 25 países, verificaram uma resistência global à penicilina de 22.1%, com os índices mais baixo na Holanda (0%) e os mais altos na Coreia do Sul (71.5%), França (46.2%) e Espanha (42.1%). A resistência à eritromicina

ocorreu em 31.1%, com as taxas mais baixas na Suécia (4.7%) e as mais elevadas na Coreia do Sul (87.6%), França (57.6%), Hungria (55.6%) e Itália (42.9%). Com base nestes resultados, é possível concluir-se que presentemente decorre uma verdadeira pandemia de *S. pneumoniae* resistentes aos antibióticos, localizando-se os focos principais nas regiões asiáticas de Hong-Kong e Coreia, nos países da Europa Ocidental e do Sul, e também nos E.U.A e México.

Aliás, numa extensa investigação prévia deste mesmo autor e seus colaboradores sobre infectantes respiratórios, no âmbito do denominado *Alexander Project* (Felmingham *et al.* 2000), os dados apontam para uma resistência do *S. pneumoniae* à penicilina superior a 50% em França e Espanha, e superior a 20% em Portugal (20.3%), Irlanda, Eslováquia e Hungria. Uma das conclusões deste estudo foi que Portugal parece constituir actualmente um centro reconhecido de *S. pneumoniae* penicilino-resistentes na Europa Ocidental, embora ainda com proporções bastante inferiores às da vizinha Espanha. Ainda nesse trabalho, reportado a amostras colhidas no ano de 1997, a emergência de *S. pneumoniae* resistentes à eritromicina já era considerado um problema sério em várias localidades – Toulouse, Barcelona, Luvaina, Génova e Hong-Kong – e revelava-se inferior a 10% em Portugal. Comparativamente a estes estudos, a presente investigação (*Publicação III*) revelou que nos isolados da OMA, a taxa de *S. pneumoniae* resistentes aos macrólidos cresceu substancialmente em Portugal e encontra-se actualmente num nível próximo dos 30%, enquanto que as resistências à penicilina rondam os 20%. É de salientar, ainda, que comparativamente ao estudo de Felmingham e colaboradores (2000), os resultados obtidos na presente dissertação (*Publicação III*) também tenham revelado um aumento nas taxas de produção de beta-lactamases nas culturas de *H. influenzae* de respectivamente 12.6% para cerca de 40%, enquanto os valores globais para a *M. catarrhalis* produtoras de beta-lactamases coincidiram acima dos 90%. Noutros estudos efectuados em Portugal sobre a bacteriologia

da nasofaringe em crianças (De Lencastre *et al.* 1999) e de infectantes das vias respiratórias inferiores (Melo-Cristino *et al.* 2001), as taxas de *S. pneumoniae* resistentes à penicilina variaram entre 24-24.7%, e as proporções de *H. influenzae* e *M. catarrhalis* produtoras de beta-lactamases variaram respectivamente entre 8.1-20% e 81.6-96%. Sabe-se hoje que a presença de resistências à penicilina por parte do *S. pneumoniae*, para além de originar um desafio terapêutico, constitui um indicativo de resistência a outros antimicrobianos, nomeadamente outras penicilinas, macrólidos, tetraciclina e ao cotrimoxazol (Sahm *et al.* 2000; Doern *et al.* 2001). Segundo Baquero (1999), as taxas de *S. pneumoniae* resistentes aos macrólidos em alguns países como a Itália e a Bélgica, que ultrapassam os índices de resistência à penicilina, aparentam uma relação directa com a prescrição abundante desta classe de antimicrobianos.

No passado, a *M. catarrhalis* era considerada como uma bactéria comensal da nasofaringe, com pouco potencial para causar otite média (Coffey *et al.* 1967; Long *et al.* 1983). Mais recentemente, a sua importância tem vindo a crescer em algumas regiões do globo, onde as taxas de isolamento de *M. catarrhalis* na OMA têm sido descritas com variações entre os 22-27%, catapultando esta bactéria para o terceiro lugar dos infectantes do ouvido médio (Kovatch *et al.* 1983; Bluestone *et al.* 1992; Kilpi *et al.* 2001). Porém, contrariamente aos dados apresentados por esses investigadores, a prevalência de culturas positivas para *M. catarrhalis* nos aspirados do ouvido médio no presente estudo foi reduzida, tal como demonstram respectivamente as taxas de 6.5% de culturas positivas ou de 10.7% se for considerada a análise PCR (*Publicação III*). Note-se que, no seu artigo sobre a prevalência bacteriana na OMA refractária em Lisboa, Monteiro e colegas (1999) obtiveram uma taxa ainda mais baixa, com apenas 2.1% de culturas positivas para *M. catarrhalis*.

Refira-se ainda que, o isolamento do *S. pyogenes* na OMA tem sido regularmente referido como muito baixo nos últimos dez anos (Gehanno *et al.* 1997), ao invés do que sucedia na era pré-antibiótica, época em que a sua prevalência e a associação a complicações supuradas da OMA era muito elevada (Bjuggren & Tuneval 1967). Ao contrário desta tendência dos últimos anos, na presente investigação (*Publicação III*) surpreendeu a taxa de isolamento de 12.9%, bastante superior ao recentemente descrito para esta bactéria. Assinale-se que, no Porto, numa série de crianças com mastoidite aguda pós OMA o *S. pyogenes* foi o agente mais frequentemente isolado juntamente com o *S. pneumoniae* (Spratley *et al.* 2000). Estes dados microbiológicos integram-se nos resultados de um outro estudo apresentado recentemente sobre a prevalência bacteriana na OMA pediátrica em Itália (Marchisio *et al.* 2003), onde as taxas de *S. pyogenes* foram igualmente elevadas (18.9% com 32% de resistências aos macrólidos) e as de *M. catarrhalis* foram ainda mais baixas (1.7%), que as registadas no Porto (*Publicação III*). Registe-se paralelamente que também na vizinha Espanha, a incidência de culturas positivas para *M. catarrhalis* na OMA também tem sido muito baixa (del Castillo *et al.* 1994). Estas investigações mostram haver um elevado grau de semelhança entre a bacteriologia da OMA em Portugal e nestes dois países da Europa meridional, em contraste com a Europa do Norte e E.U.A.

Finalmente, uma nota breve sobre a actual questão relacionada com formação de *biofilme* no ouvido médio. Contrariamente a um conceito passado, que considerava a otite média com efusão como um fenómeno estéril, estudos com tecnologia de diagnóstico molecular por PCR vieram sugerir o contrário (Post *et al.* 1995; Aul *et al.* 1998). Segundo estes investigadores é possível a presença de bactérias viáveis em comunidades complexas na superfície da mucosa do ouvido médio, denominadas por *biofilme*. Mais recentemente, a investigação da mucosa do ouvido de espécimes animais com otite média, através de microscopia electrónica

de varredura e Laser confocal (Ehrlich *et al.* 2002), favoreceu essa mesma teoria o que certamente desempenhará um papel importante no entendimento futuro da patogênese da otite média com efusão e no seu relacionamento com a OMA.

### **3. MIRINGOTOMIA NA OTITE MÉDIA AGUDA NÃO-COMPLICADA?**

A miringotomia é um dos actos cirúrgicos mais frequentemente realizados na criança. Na actualidade, a maioria das suas indicações associam-se ao tratamento da otite média com efusão, complementada ou não com a inserção de tubos de ventilação transtimpânicos e adenoidectomia.

A evidência fornecida por diversos estudos clínicos, relativamente à eficácia da miringotomia na OMA, tem sido diversa ao longo dos anos. Assim, Roddey e colegas (1966) compararam as otoscopias e audiometrias aos 2, 10, 30 e 60 dias entre dois grupos de crianças com OMA tratadas com antibióticos ou antibióticos associados a miringotomia. O uso da miringotomia apenas se verificou ser significativamente eficaz no alívio mais precoce da otalgia, embora tenham notado uma tendência para um número menor de pacientes com efusão residual do ouvido médio no grupo miringotomizado. Herberts e o seu grupo (1971), aos dez dias de tratamento, não detectaram diferenças na persistência de efusão no ouvido médio pós-OMA, entre grupos tratados com antibióticos isoladamente ou em associação à miringotomia. Por seu turno, Lorentzen & Haugsten (1977) obtiveram um sucesso terapêutico idêntico, com 88% de curas, tanto com miringotomia isoladamente, como com miringotomia associada à penicilina V ou com o antibiótico simplesmente. Num trabalho não “randomizado” de Puhakka e associados (1979), aos trinta dias de tratamento, 90% das crianças do grupo tratado com antibióticos

e miringotomia com aspiração estavam curadas contra 71% das tratadas unicamente com antibiótico, concluindo-se que a miringotomia acelera a recuperação da OMA. Qvarnberg & Palva (1980) defenderam uma opinião idêntica após o estudo prospectivo de 248 crianças, no qual verificaram que no grupo tratado com antibiótico e miringotomia a cura era a regra, enquanto em 10% das crianças tratadas com antibiótico isolado a doença assumia uma evolução prolongada. Por sua vez, Schwartz e colaboradores (1984), numa série não “randomizada” de 776 crianças não detectaram vantagens na associação da miringotomia ao tratamento antibiótico, relativamente ao alívio da otalgia ou à persistência de efusão no ouvido médio após dez dias de tratamento. Note-se, contudo, que neste estudo os autores utilizaram diversos tipos de antibióticos e o fluido do ouvido médio não foi aspirado. Mais recentemente, num estudo “randomizado” duplamente cego de Engelhard e co-investigadores (1989), as crianças estudadas foram divididos em três grupos com as seguintes opções terapêuticas: amoxicilina/ácido clavulânico isoladamente, amoxicilina/ácido clavulânico mais miringotomia e miringotomia mais placebo. A recuperação otoscópica da OMA registou-se em 60% dos doentes com antibiótico, com ou sem miringotomia, enquanto apenas 23% das crianças com miringotomia e placebo recuperaram. Por isso, estes investigadores concluíram que a associação da miringotomia à antibioterapia com amoxicilina/ácido clavulânico, aparentemente não traz benefícios quanto à persistência de infecção após o tratamento ou à presença de efusão residual do ouvido médio. Finalmente, Kaleida e colaboradores (1991) dividiram aleatoriamente uma série de crianças com OMA para tratamento com amoxicilina isoladamente, amoxicilina mais miringotomia e miringotomia mais placebo. A avaliação incluiu otoscopia, timpanometria e reflexos acústicos. O grupo tratado com miringotomia e placebo foi o que registou mais falências terapêuticas, enquanto a taxa de sucesso foi semelhante nos outros dois grupos. Os autores demonstraram a eficácia da amoxicilina no tratamento da OMA

e, paralelamente, desaconselharam o uso rotineiro da miringotomia no tratamento da OMA.

Comparativamente a estes estudos, os resultados da investigação clínica incluídos na *Publicação III* desta dissertação, indicam que a única vantagem oferecida pela miringotomia consiste num alívio mais rápido da otalgia, o que foi inferido a partir dos registos de um menor consumo de analgésicos e duma diminuição do quadro de irritabilidade da criança. Conclui-se, nesse mesmo estudo, que comparativamente à terapêutica isolada com amoxicilina/ácido clavulânico, a associação da miringotomia ao antibiótico não acelera a cura da OMA, nem previne a acumulação de efusão no ouvido após a infecção.

Ora, quando analisados conjuntamente, os resultados mencionados na *Publicação IV* realçam a nível experimental as considerações atrás aduzidas 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 expedita como se processou a recuperação espontânea nas MTs controlos com OMA e sem miringotomia. Aliás, é interessante mencionar o facto destes resultados serem complementares de um estudo de Magnuson e colaboradores (1996), 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 tudo quanto se disse, não restam dúvidas que a combinação de infecção e miringotomia causa alterações duradouras na estrutura da MT. Note-se que estas alterações estruturais da MT são visualizáveis logo nas primeiras fases, horas ou escassos dias, da recuperação pós-miringotomia como se vislumbra interpretando os dados incluídos nesta dissertação (*Publicações IV e V*). 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 acto de excepção, evitando-se o seu uso sistemático em situações de OMA não-complicada. Todavia, tal não significa que o recurso à miringotomia na OMA deva ser sempre evitado. Pelo contrário, a miringotomia está formalmente indicada na presença de complicações supuradas, em casos refractários ao tratamento médico, para análise microbiológica do agente infectante, e eventualmente em doentes com otalgia intensa (Bluestone & Klein 1996).

De realçar ainda o facto de se ter demonstrado neste trabalho (*Publicação IV*) 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 (1990), a fase aguda da OMA no Rato começa a declinar ao quarto dia após a inoculação bacteriana. Num outro estudo de OMA experimental por *S. aureus*, Gröte e colaboradores (1989) registaram um declínio da inflamação ao nível da MT logo ao terceiro dia após o início da infecção. Note-se, contudo, que a cura espontânea da OMA parece ser também elevada no Homem, podendo atingir 18% e 48% respectivamente nas infecções por *S. pneumoniae* e *H. influenzae* (Howie & Ploussard 1972). Segundo uma meta-análise efectuada por Rosenfeld e colaboradores (1994), relativa à eficácia dos antibióticos no tratamento da OMA, a taxa de resolução clínica completa do episódio infeccioso sem recurso aos antibióticos foi de 73%, aos 7 a 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 (van Buchem 1987; Del Mar *et al.* 1997; Molstad *et al.* 2000; Damoiseaux *et al.* 2000; Hoberman *et al.* 2002). Note-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 sequencial das crianças, sem encargos financeiros adicionais para o agregado familiar do doente.

#### **4. FENÓMENOS PRECOSES DA CICATRIZAÇÃO DA MEMBRANA TIMPÂNICA**

A agressão provoca uma reacção dos tecidos envolvidos, despoletando uma cascata de fenómenos celulares e bioquímicos que conduzem à cicatrização da ferida. Este fenómeno regenerativo envolve proliferação e movimentação das células dos tecidos em questão, sendo a lesão inicial o estímulo que desencadeia a transformação do comportamento celular. A sequência desta resposta complexa, detalhadamente relatada por Witte & Barbul (1997), pode ser dividida basicamente em três fases, que se vão sobrepondo consecutivamente: hemostase e inflamação, proliferação, e maturação ou remodelação.

A capacidade de cicatrização da MT é reconhecida desde longa data, como atestado numa publicação de Roosa (1873) em que 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 (Kristensen 1992). Não obstante a cicatrização das perfurações timpânicas ser convencional no que respeita aos fenómenos hemostáticos e à cadeia de fenómenos 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 cama de tecido de granulação que serve de plataforma à proliferação do epitélio adjacente, os fenómenos de reparação das

lesões da MT têm que se desenrolar na ausência de um suporte, como se da construção de uma ponte se tratasse (Stenfors 1980).

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 (Taylor & McMinn 1965, 1967; McMinn & Taylor 1966) 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 (McIntire & Benitez 1970; Reijnen & Kuijpers 1971; Stenfors *et al.* 1980, 1981; Söderberg *et al.* 1984, 1985). Após um estudo experimental de microperfurações timpânicas em cobaias, Clawson & Litton (1971) afirmaram que o traumatismo estimulava os centros de geração epitelial a produzir queratinócitos, que avançariam centripetamente em toda a circunferência da perfuração, até ao 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 (McIntire & Benitez 1970; Reeve 1977; Boedts 1978; Olsen & Stenfors 1993). Segundo Johnson & Hawke (1987), o primeiro contacto entre os bordos opostos da perfuração é um fenómeno passivo, efectuado através dos esporões de queratina. Para O'Donoghue (1983), 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. Noutros 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 (Boden *et al.* 1986; Weinberger *et al.* 1988). No que diz respeito ao papel desempenhado pela mucosa na dinâmica da cicatrização timpânica, as opiniões divergem. Para Weinberger e colegas (1988) a camada medial mucosa da MT seria das primeiras estruturas a encerrar a perfuração, enquanto que Smallman e co-autores (1989) demonstraram que a mucosa desempenharia um papel muito pouco significativo neste contexto.

Na presente investigação (*Publicação V*) 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 centrípeto relativamente ao cerne da perfuração, tal como descrito por Clawson & Litton (1971). 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 vector 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 (Christiansen 1984; Makino *et al.* 1990). Na linha dos trabalhos em cobaias efectuados por Clawson & Litton (1985, 1987), é ainda possível pressupor a partir da presente dissertação que o vector 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 (1996). Aliás, Reeve (1977) 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.

Nesta dissertação (*Publicação V*), 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 facto, como se de uma testa de ponte se tratasse. Todavia, ficou igualmente claro que, para que este fenómeno 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 (McIntire & Benitez 1970; Reijnen & Kuijpers 1971; Stenfors *et al.* 1980; Smallman *et al.* 1989). Aliás, parece perfeitamente lógico que assim aconteça, pois os fenómenos de angiogénese – necessários a todo o tipo de cicatrização – ocorrem apenas no interior da *lamina propria* (Hellström *et al.* 2003). Não menos interessante foi ter-se verificado neste trabalho (*Publicação V*) que as perfurações das MT dos ouvidos 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 factores de crescimento, contribua para o encerramento mais acelerado das incisões de miringotomia. De modo semelhante, verificou-se que em feridas cutâneas onde se efectuou 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 (Levenson *et al.* 1996; Imegwu *et al.* 1997).

Pode-se assim afirmar que o presente estudo (*Publicação V*) contraria uma corrente que atribui à presença de infecção a causa frequente de falência do encerramento de perfurações timpânicas agudas (Henry 1945; Griffin 1979; Gladstone *et al.* 1995). Aliás, em sintonia com os resultados da presente dissertação, é interessante que outros autores já houvessem mencionado ser a OMA, em determinadas circunstâncias, estimuladora da cicatrização secundária de perfurações timpânicas crônicas (Stinson 1936; Derlacki 1953; Dragovich 1962). Os resultados agora apresentados (*Publicações V e VI*), são de molde a poder inferir-se que a miringotomia no decurso da OMA se associa a um risco extremamente reduzido de degenerar numa perfuração crónica. Em contrapartida, a rapidez com que o encerramento da incisão se processa implicará necessariamente um período muito curto de arejamento do ouvido médio, o que em parte poderá explicar a ausência de diferenças entre a evolução da OMA nos ouvidos miringotomizados e os ouvidos não-miringotomizados (*Publicações III e IV*).

Valerá a pena notar que Gillman e colegas (1963), 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 actuais sobre factores de crescimento e os elementos de regulação da expressão de diversos genes durante a cicatrização (Sayo *et al.* 2002; Wearing & Sherratt 2000; Werner *et al.* 1992) têm vindo a sustentar esta hipótese. Segundo McMinn & Taylor (1966), ao contrário da epiderme, na cicatrização da MT o epitélio que recobre o tecido de granulação, não mostraria tendência para o invadir e produzir indentações (*rete pegs*). Estes achados estão em sintonia com os que aqui se apresentam relativamente à reacção cicatricial nos bordos da incisão de miringotomia nas MTs controlo não infectadas (*Publicação V*), que assumiu uma forma tardia, pouco exuberante e sem formação de *rete pegs*. Já nas MTs

infectadas a reacção foi extremamente vigorosa com uma grande proliferação dos queratinócitos e do tecido conjuntivo subjacente, visualizando-se zonas de clara projecção do estrato basal da camada queratinizante para o interior do tecido conjuntivo, com formação de *rete pegs*.

Não menos importante em termos histopatológicos foram os dados colhidos neste trabalho quanto à dinâmica do encerramento das perfurações timpânicas no Rato, que, de facto, têm início escassas horas após a agressão (*Publicação V*), ao contrário dos quatro dias inicialmente referidos por Clawson & Litton no seu estudo em cobaias (1971). É também curioso que McMinn & Taylor (1966), num outro artigo sobre a citologia da reparação de perfurações timpânicas experimentais, também em cobaias, tivessem mencionado não ter sido capazes de detectar qualquer papel dos mastócitos na cicatrização timpânica. É possível que esta afirmação, não corroborada pelos achados da presente investigação (*Publicação V*) – em que observou uma desgranulação mastocitária maciça na *pars flaccida* das MTs não infectadas logo às seis horas após miringotomia - resulte tão-somente do facto dos seus autores não terem dedicado qualquer atenção à referida *pars flaccida*. Note-se que esta região da MT tem sido alvo, de há alguns anos a esta parte, de um interesse crescente como área activamente envolvida nos fenómenos inflamatórios do ouvido médio (Alm *et al.* 1983b; Magnuson *et al.* 1994; Eriksson & Hellström 2001b; Eriksson *et al.* 2003). Para mais, num estudo recente de Cayé-Thomasen & Tos (1996), encontraram-se mastócitos a infiltrar o quadrante antero-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 homologias clínicas e eventualmente formular-se recomendações relativamente a precauções na administração de produtos ou medicamentos com potencial inibitório da desgranulação mastocitária, em doentes com perfurações timpânicas traumáticas ou nas fases imediatas pós-timpanoplastia (Cole *et al.* 2001; Schoch 2003).

### III. MIRINGOSCLEROSE. OCORRÊNCIA APÓS MIRINGOTOMIA E SUA PREVENÇÃO

A patógenese da miringosclerose ainda não está suficientemente esclarecida. Várias teorias têm sido propostas para explicar este fenómeno, o que atesta o relativo desconhecimento ainda existente. Para alguns autores, trata-se simplesmente do resultado final da cura da inflamação (Sheehy & House 1962; Igarashi *et al.* 1970; Ferlito 1979). Não se podem negligenciar, porém, outras teorias quanto à causa da miringosclerose tais como as que defendem ser uma consequência da disfunção dos lisossomas e do metabolismo do cálcio (Mann *et al.* 1980, 1986, 1987), e causas imunológicas (Morgan 1977; Schiff *et al.* 1980; Yazawa *et al.* 1985; Bhaya *et al.* 1993). Na realidade, Schiff e colegas (1980) e Yazawa e co-autores (1985) demonstraram ser possível induzir experimentalmente a formação de miringosclerose em cobaias, através da injeção endovenosa de anticorpos anti-componentes do tecido conjuntivo da *lamina propria* timpânica.

Diversos autores têm, por outro lado, contraposto uma teoria mecânica. Neste âmbito, Tos e colaboradores (1983) consideram que a miringosclerose resulta da limitação dos movimentos da MT que promove a hiperplasia fibrosa, a hialinização e a calcificação timpânica. Curiosamente, Gibb & Pang (1994) denominaram estes fenómenos por “teoria da inércia”. Já para Wielinga e colegas (1988), a retracção timpânica consequente à exposição prolongada a pressões negativas, seria um factor importante no desencadeamento e sustentação da formação de miringosclerose. Segundo Lesser e colaboradores (1988), a incisão da miringotomia e o tubo de ventilação resultariam num desequilíbrio da dinâmica timpânica com a geração de fenómenos de stress localizado em regiões críticas das fibras de colagénio da *lamina propria*. Finalmente refere-se que outras hipóteses explicativas da génese da miringosclerose, tais como a hemorragia associada à miringotomia ou o traumatismo da

aspiração do fluido do ouvido médio, não têm sido consensuais (McRae *et al.* 1989; Parker *et al.* 1990; Dawes *et al.* 1991).

Baseados em dados obtidos num estudo histopatológico efectuado em ossos temporais humanos, Bhaya e o seu grupo (1993) adiantaram ser a presença de inflamação e de uma camada de colagénio densa e bem diferenciada requisitos para se desencadear a formação de miringosclerose. Numa actualização publicada recentemente por Tos (2000), foi igualmente imputado um papel fulcral à inflamação da *lamina propria* nos fenómenos iniciais da génese da miringosclerose. Segundo este mesmo autor, esta seria uma das razões porque a colocação repetida de tubos de ventilação em pacientes com membranas atroficas se associaria a um muito menor índice de miringosclerose do que em crianças com MT espessadas.

Há escassos anos atrás, Mattsson (1997) defendeu uma tese inovadora que associa a formação de miringosclerose à produção de radicais livres de oxigénio. Esta teoria fundamenta-se em estudos nos quais se comprovou que as MTs miringotomizadas experimentalmente, quando expostas a ambientes “hiperóxicos” apresentavam mais lesões escleróticas (Mattsson *et al.* 1995), e, quando submetidas à aplicação tópica de antioxidantes a formação de miringosclerose ficava atenuada (Mattsson *et al.* 1997).

Na *Publicação V* observou-se que, como consequência da miringotomia, a formação de depósitos de miringosclerose na *pars tensa* é detectável mais precoce e abundantemente nos ouvidos não infectados do que nos ouvidos com OMA. Paralelamente (*Publicação IV*), evidenciou-se que ao longo dos primeiros dias após o termo de uma OMA, as MTs previamente submetidas a miringotomia apresentavam depósitos de esclerose mais abundantes quando comparadas com as MTs não miringotomizadas. Nestas, a produção de miringosclerose era escassa ou até inexistente em alguns casos. Num estudo anterior, Mattsson e colegas



(1998) haviam referido resultados semelhantes aos 30 e 90 dias após a miringotomia. Numa outra publicação do mesmo grupo (Mattsson *et al.* 1999), o desenvolvimento de miringosclerose resultante da miringotomia em MTs não infectadas, foi detectada ultraestruturalmente na *pars flaccida* nove horas após a incisão timpânica. Os resultados da presente dissertação (*Publicações IV e V*) também revelaram formação de miringosclerose ao nível da *pars flaccida* das MTs miringotomizadas. Terão estas observações a ver com o facto da miringotomia provocar uma alteração da composição gasosa do ouvido médio dada a relativa “hiperóxia” que acarreta (Felding *et al.* 1987)? Ora, esta concentração elevada de oxigénio tem sido associada à formação de miringosclerose, através da produção de radicais livres (Hellström *et al.* 1993; Mattsson *et al.* 1995). Embora a timpanosclerose e a miringosclerose sejam observáveis clinicamente como resultado da otite média recorrente, mesmo sem perfuração timpânica (Sheehy & House 1962; Möller 1981), os resultados incluídos nesta dissertação (*Publicação IV*) mostram não haver indução expressiva de miringosclerose quando se analisa um episódio isolado de OMA. Sabe-se que a inflamação conduz à produção de radicais livres de oxigénio (Rossi *et al.* 1985), mas para que tal seja traduzível na formação de miringosclerose durante a OMA, serão eventualmente necessários episódios repetidos de inflamação (Mattsson *et al.* 1998).

A análise conjunta destes dados leva a que se possa especular serem a “hiperóxia” e o stress mecânico originado pelo trauma da miringotomia ao nível das fibras do tecido conjuntivo os factores que desempenham o papel mais relevante na génese da miringosclerose. Quiçá um papel mais importante do que a própria infecção encarada de forma isolada. Esta suposição enquadra-se na hipótese teórica avançada por Lesser e co-autores (1988) em que, relativamente à génese da miringosclerose associada à colocação de tubos de ventilação trans-timpânicos, o componente do stress sobre as fibras conjuntivas é altamente valorizado. É natural que a própria textura do tecido conjuntivo, que se encontra

alterada pela infecção durante a OMA, também desempenhe um papel na gênese da miringosclerose. Segundo um estudo histopatológico em ossos temporais, no qual a presença de miringosclerose era menos frequente na OMA do que na otite média com efusão ou na otite média crônica, Bhaya e colegas (1993) propuseram que a formação de miringosclerose seria mais comum nas situações em que a camada fibrosa da *lamina própria* está bem diferenciada. Seria este aspecto, associado à menor exposição do ouvido médio a níveis elevados de oxigênio nos casos com OMA submetidos a miringotomia – devido à presença do conteúdo purulento na caixa do tímpano e nos bordos da incisão timpânica – que poderá ter contribuído para a menor incidência de miringosclerose nestes espécimes comparativamente às MTs miringotomizadas sem infecção subjacente. Por tudo quanto se disse, parece prudente não excluir a hipótese da histogênese da miringosclerose, em vez de resultar de um factor etiológico único, ser um fenómeno multifactorial necessitando para que ocorra da sua acção conjugada.

Motivado pela nova teoria que associa a gênese miringosclerose à produção de radicais livres de oxigênio, procurou-se avaliar experimentalmente qual o efeito da aplicação tópica de ácido ascórbico sobre MTs miringotomizadas. Como é conhecido, o ácido ascórbico ou vitamina C, é um antioxidante não-enzimático potente (Bendich *et al.* 1986; Halliwell & Gutteridge 1989), não tóxico e que desempenha um papel relevante na síntese do tecido conjuntivo (Pasquali-Ronchetti *et al.* 1996). O resultado da aplicação de ácido ascórbico na MT perfurada do Rato, comparativamente com MTs controlo tratadas com soro fisiológico ou sem qualquer tratamento, resultou numa redução significativa da ocorrência de depósitos de miringosclerose (*Publicação VI*). Curiosamente, na sequência dos estudos de Mattsson e colaboradores (Mattsson & Hellström 1997; Mattsson *et al.* 1997) e também da publicação VI da presente dissertação, outros investigadores tem desenvolvido estudos cujas con-

clusões favorecem o interesse da aplicação tópica de produtos antioxidantes na prevenção de miringosclerose em MTs miringotomizadas. Neste contexto, Ozcan e co-autores (2002a) num estudo “randomizado” em 40 MTs do Rato, verificaram que a aplicação tópica de N-acetilcisteína após a miringotomia se associava a uma redução significativa de fenómenos de miringosclerose, comparativamente a membranas não tratadas ou submetidas à aplicação de soro fisiológico tópico. O efeito do antioxidante na prevenção da miringosclerose não foi distinto entre o grupo com uma aplicação única e o grupo com aplicações sequenciais diárias ao longo de doze dias. Similarmente ao acontecido nos resultados da presente dissertação (*Publicação VI*), as MTs submetidas ao tratamento com antioxidante por Ozcan e colegas (2002a) apresentavam uma *lamina propria* mais espessada. Num outro trabalho experimental animal realizado por autores já mencionados (Ozcan *et al.* 2002b), a aplicação tópica de N-acetilcisteína em MTs miringotomizadas associou-se a uma redução dos níveis dos radicais óxido nítrico e malonildialdeído. Muito recentemente, Felding e colegas (2003) registaram o primeiro ensaio clínico sobre a aplicação tópica de um antioxidante em MTs miringotomizadas com colocação de tubos de ventilação transtimpânicos. Segundo este estudo duplamente cego e controlado em crianças, a aplicação tópica de N-acetilcisteína resultou numa redução significativa da incidência de miringosclerose e na taxa de reinserção de tubos. Diga-se, a este respeito, que o conhecimento actual dos efeitos da administração sistémica de antioxidantes na prevenção da miringosclerose é ainda controverso, pois se a administração de selénio por via intraperitoneal revelou resultados positivos (Gorur *et al.* 2002), já a injeção de fenspiride pela mesma via foi ineficaz, ao contrário do efeito obtido com a sua aplicação tópica (Mattsson & Hellström 1997).

Ainda umas palavras sobre uma questão pouco consensual que se prende com a influência da miringosclerose na audição. Assim, contrariamente às situações de timpanosclerose com fixação da cadeia ossicular

que se associam claramente a hipoacusia, não é totalmente claro que a miringosclerose afecte a audição de forma significativa (Möller 1981; Skinner *et al.* 1988). Segundo Tos & Stangerup (1989), os limiares auditivos nos ouvidos com miringosclerose são afectados em <0.5 dB. Registe-se que este mesmo investigador e colaboradores (Tos *et al.* 1983), não haviam detectado diferenças significativas na audiometria tonal entre ouvidos com e sem miringosclerose. Por outro lado, num estudo mais recente com audiometria com frequências altas alargadas (8.000 a 20.000 Hz) em crianças com passado de otite média e miringotomia com tubos de ventilação, Hunter e colegas (1995) verificaram que os limiares auditivos médios eram 25 dB piores em ouvidos com miringosclerose recobrimo mais de 75% da superfície da MT, quando comparados com ouvidos afectados em 25% ou menos da MT. Nesse estudo a história recente de otite média também se associava a redução da acuidade auditiva para altas-frequências. Ora, este aspecto assume particular relevância segundo Dobbie & Berlin (1979), pois a hipoacusia ligeira com uma atenuação do sinal sonoro tão subtil como os 20dB, como frequentemente acontece associada à otite média e às suas sequelas, condiciona uma distorção ou ausência da captação da informação do discurso falado. Num outro estudo, de Eimas & Clarkson (1986), demonstrou-se que o desempenho auditivo no reconhecimento do discurso falado era pior em crianças com passado de otite média quando comparado com grupos de crianças sem passado de otites. Esta observação está possivelmente relacionada com os resultados da investigação feita por Welsh e colaboradores (1983), segundo os quais a hipoacusia associada à patologia do ouvido médio nas fases iniciais da vida, momento crítico para o desenvolvimento da comunicação, pode condicionar deficiências na representação dos códigos da linguagem e distúrbios no processamento auditivo a nível central.

**BIBLIOGRAFIA**

- 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.
- Amoils CP, Jackler RK, Lustig LR (1992) Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor. *Otolaryngol Head Neck Surg* 107: 669-683.
- Arnold WJ (1976) Role of perilymph in the early stages of serous otitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 25(2): S73-S80.
- Arnold W, Ganzer U, Kleinmann H (1977) Sensorineural hearing loss in mucous otitis. *Arch Oto-Rhino-Laryng* 215: 91-93.
- Arnold W, Bredberg G, Gstöttner W, Helms J, Hildmann H, Kiratzidis T, *et al.* (2002) Meningitis following cochlear implantation: pathomechanisms, clinical symptoms, conservative and surgical treatments. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 64: 382-389.
- Asher DL, Sando I (1981) Perilymphatic communication routes in the auditory and vestibular system. *Otolaryngol Head Neck Surg* 89: 822-830.
- Aul JJ, Anderson KW, Wadowsky RM, Doyle WJ, Kingsley LA, Post JC, *et al.* (1998) Comparative evaluation of culture and PCR for detection and determination of persistence of bacterial strains and DNAs in the *Chinchilla laniger* model of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 107: 508-513.
- Aviel A, Utel H, Ostfeld E (1982) Acquired irreversible sensorineural hearing loss associated with otitis media with effusion. *Am J Otol* 3: 217-222.
- Baquero F (1999) Evolving resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae*: a link with long-acting macrolide consumption? *J Chemother Suppl* 1: S35-S43.
- Bendich A, Machlin L, Scandurra O, Burton G, Wayner D (1986) The antioxidant role of vitamin C. *Adv Free Radical Biol Med* 2: 419-44.
- Berman S (1995) Otitis media in children. *N Engl J Med* 332: 1560-1565.
- Bernstein JM, Villari EM, Rattazzi MC (1979) The significance of lysosomal enzymes in middle ear effusions. *Otolaryngol Head Neck Surg* 87: 845-851.
- Bhaya M, Schachern P, Morizono T, Paparella M (1993) Pathogenesis of tympanosclerosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 109: 413-20.

- Bjuggren G, Tunevall G (1967) Otitis in childhood. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 42: 137-146.
- Bluestone CD, Stephenson JS, Martin LM (1992) Ten-year review of otitis media pathogens. *Pediatr Infect Dis J Suppl* 11: S7-S11.
- 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.
- Boden P, Johnson A, Weinberger 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.
- Boedts D (1978) The tympanic epithelium in normal and pathological conditions. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 32: 294-419.
- Bortnick E, Proud G (1965) Experimental absorption of fluids from the middle ear. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 81: 237-241.
- Brookhouser PE, Worthington DW, Kelly WJ (1991) Unilateral hearing loss in children. *Laryngoscope* 101: 1264-1279.
- Browning GG, Gatehouse S (1989) Hearing in chronic suppurative otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 98: 245-250.
- Carhart RC, Haynes C (1949) The clinical reliability of bone conduction audiometry. *Laryngoscope* 59: 1048-1101.
- 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.
- Cayé-Thomasen P, Tos M (2002) Histopathologic differences due to bacterial species in acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 63: 99-110.
- Christiansen CB (1984) Photography in the treatment of tympanic membrane perforations. *J Laryngol Otol* 98: 107-111.
- 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.
- Clawson JP, Litton WB (1971) The healing process of tympanic membrane perforations. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 75: 1302-1312.

- Coffey JD, Martin AD, Booth HN (1967) *Neisseria catarrhalis* in exudative otitis media. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 86: 403-407.
- 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.
- Crowe SJ (1930) Pathologic changes in meningitis of the internal ear. Arch Otolaryngol 11: 537-543.
- Dagan R, Abramson O, Leibovitz R, Lang R, Goshen S, Greenberg D, *et al.* (1996) Impaired bacteriologic response to oral cephalosporins in acute otitis media caused by pneumococci with intermediate resistance to penicillin. Pediatr Infect Dis J 15: 980-985.
- 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.
- Dawes PJ, Bingham BJ, Rhys R, Griffiths MV (1991) Aspirating middle ear effusions when inserting ventilating tubes: does it influence post-operative otorrhoea, tube obstruction or the development of tympanosclerosis? Clin Otolaryngol 16: 457-461.
- De Lencastre H, Kristinsson KG, Brito-Avô A, Sanches IS, Sá-Leão R, Saldanha J, *et al.* (1999) Carriage of respiratory tract pathogens and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* colonization in healthy children attending day care centers in Lisbon, Portugal. Microb Drug Resist 5: 19-29.
- Del Castillo F, Barrio-Gomez MI, Garcia A (1994) Bacteriologic study of 80 cases of acute otitis media in children. Enferm Infecc Microbiol Clin 12: 82-85.
- 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.
- DeMaria TF, Yamaguchi T, Li DJ (1989) Quantitative cytologic and histologic changes in the middle ear after the injection of nontypable *Haemophilus influenzae* endotoxin. Am J Otolaryngol 10: 261-266.
- Derlacki EL (1953) Repair of central perforations of the tympanic membrane. Arch Otolaryngol 58: 405-420.

- Dobbie R, Berlin C (1979) Influence of otitis media on hearing and development. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 88: 48-53.
- Doern GV, Heilmann KP, Huynh HK, Rhomberg PR, Coffman SL, Brueggeman AB (2001) Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999-2000 including a comparison of resistance rates since 1994-1995. *Antimicrob Agent Chemother* 45: 1721-1729.
- Dragovich JJ (1962) Closure of tympanic membrane perforations. *Arch Otolaryngol* 75: 206-207.
- Druss JG (1929) Pathways of infection in labyrinthitis. Report of three different types. *Arch Otolaryngol* 9: 392-403.
- Dumich PS, Harner SG (1983) Cochlear function in chronic otitis media. *Laryngoscope* 93: 583-586.
- 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.
- Eimas P, Clarkson R (1986) Speech perception in children: are these effects of otitis media? In: Cavanaugh J (Ed.), *Otitis Media and Child Development*. York Press, Parkton, U.K., p. 139-159.
- Engelhard D, Strauss N, Jorzczak-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.
- English GM, Northern JL, Fria TJ (1973) Chronic otitis media as a cause of sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol* 98: 12-22.
- Eriksson PO, Hellström SO (2003) Acute otitis media develops in the rat after intranasal challenge of *Streptococcus pneumoniae*. *Laryngoscope* 113: 2047-2051.
- Fearrington SJ, Weider DJ (1991) Sensori-neural hearing loss in acute otitis media due to beta-hemolytic *Streptococcus* successfully treated with penicillin and prednisone. *Ear Nose Throat J* 508: 513-519.
- Felding JU, Rasmussen JB, Lidholdt T (1987) Gas composition of the normal and the ventilated middle ear cavity. *Scand J Clin Invest Suppl* 186: S31-S41.



- Felding JU, Tommerup B, Ovesen T (2003) The effect of N-acetylcysteine on the development of myringosclerosis following insertion of ventilation tubes in children. Abstract B46, 8<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, June 3-7, Fort Lauderdale, FL, p. 188.
- 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.
- Felmingham D, Reinert RR, Hirakarata Y, Rodloff A (2002) Increasing prevalence of antimicrobials resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study, and comparative in vitro activity of the ketolide, telithromycin. *J Antimicrob Chemother* 50: 25-37.
- Ferlito A (1979) Histopathogenesis of tympanosclerosis. *J Laryngol Otol* 93: 25-37.
- Fina M, Baird A, Ryan A (1993) Direct application of basic fibroblast growth factor improves tympanic membrane perforation healing. *Laryngoscope* 103: 804-09.
- 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.
- Forseni MF, Hultcrantz M (2002) Possible inflammatory mediators in tympanosclerosis development. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 63: 149-154.
- Fraser JS (1914) Acute suppurative otitis media, purulent labyrinthitis and leptomeningitis without rupture of the tympanic membrane. *J Laryngol Otol* 29: 284-291.
- Fraser JS, Dickie JK (1920) Meningitic neuro-labyrinthitis. *Proc Roy Soc Med* 13: 23-36.
- Frickhinger A (1957) Die Häufigkeit der Innenohrbeteiligung bei den genuine chronischen Entzündungen de Mitteohres. *Hals-Nasen Ohrenheilkd* 6: 240-243.
- Friedman I (1955) The comparative pathology of otitis media – experimental and human. *J Laryngol Otol* 69: 27-50, 588-601.

- Fujioka O, Nonomura N, Kawana M (1994) Otitis media induced by a chemotactic factor in mongolian gerbils. In: Mogi G, Honjo I, Ishii T, Takasaka T (Eds.) Recent Advances in Otitis Media. Kugler Publications, Amsterdam, The Netherlands, p. 187-191.
- 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.
- Gardenghi G (1955) Contributo allo studio della funzione cochleare nell'otite media purulenta cronica. *Boll Mall Orecch* 73: 587-606.
- Gehanno P, Berche P, Boucot I, Lambert-Zechovaky N, Bingen E, Gress JJ, Rollin C (1994) Comparative efficacy and safety of cefprozil and amoxicillin/clavulanate in the treatment of acute otitis media in children. *J Antimicrob Chemother* 33: 1209-1218.
- Gibb AG, Pang YT (1994) Current considerations in the etiology and diagnosis of tympanosclerosis. *Eur Arch Otolaryngol* 251: 439-451.
- 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.
- 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.
- Gladstone HB, Jackler RK, Varav K (1995) Tympanic membrane healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am* 28: 913-932.
- Gloddek B, Lamm K, Haslov K (1992) Influence of middle ear immune response on the immunological state and function of the inner ear. *Laryngoscope* 102: 177-181.
- Gorur K, Ozcan C, Polat A, Unal M, Tamer L, Cinel I (2002) The anti-oxidant and anti-apoptotic activities of selenium in the prevention of myringosclerosis in rats. *J Laryngol Otol* 116: 426-429.
- Goycoolea MV, Paparella MM, Carpenter AM, Juhn SK (1979) A longitudinal study of cellular changes in experimental otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg* 87: 685-700.

- Goycoolea MV, Paparella MM, Juhn SK, Carpenter AM (1980a) Oval and round window changes in otitis media: potential pathways between middle ear and inner ear. *Laryngoscope* 90: 1387-1391.
- Goycoolea MV, Paparella MM, Goldberg B, Carpenter AM (1980b) Permeability of the round window membrane in otitis media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 106: 430-433.
- Goycoolea MV, Muchow D, Schachern PA (1988) Experimental studies on round window structure: function and permeability. *Laryngoscope Suppl.* 44: S1-S20.
- Goycoolea M (1992) The round window membrane under normal and pathological conditions. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl.* 493: S43-S55.
- Goycoolea MV (2001) Clinical aspects of round window membrane permeability under normal and pathologic conditions. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 121: 437-447.
- Griffin WL (1979) A retrospective study of traumatic tympanic membrane perforations in a clinical practice. *Laryngoscope* 89: 261-282.
- 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.
- Halliwell B, Gutteridge J (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Ed., Clarendon Press, Oxford, U.K., p. 123-26.
- Harada T, Yamasoba T, Yagi M (1990) Clinico-statistical study on the sensorineural hearing loss accompanying otitis media with effusion. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 93: 1874-1881.
- Hellström S, Hornsten J, Stenfors LE (1985) Evaluation of inner ear damage during conditions with middle ear effusion by use of brainstem audiometry. *Auris Nasus Larynx Suppl* 12: S34-S35.
- Hellström S, Johansson U, Anniko M (1988a) Structure of the round window membrane. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 457: S33-S42.
- 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.

- Hellström S, Goldie P, Magnuson K, Fall C (1993) Oxygen level influences the middle ear tissue reaction in ears with perforated tympanic membranes. In: Lim DJ, Bluestone CD, Klein JO, Nelson JD, Ogra P (Eds.) *Recent Advances in Otitis Media*, BC Decker Periodicals, Ontario, Canada, p. 334-35.
- 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.
- 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, Passàli D and Lim D (Eds.) *New Frontiers in Immunobiology*. Kugler Publications, The Hague, The Netherlands, p. 3-7.
- Henry GA (1945) Blast injuries of the ear. *Laryngoscope* 55: 663-672.
- Herberts G, Jeppson P, Nylén O, Branefor-Helander P (1971) Acute otitis media: ethiological and therapeutical aspects. *Pract Otol Rhinol Laryngol* 33: 191-196.
- Hermansson A, Emgård P, Prellner K, Hellström S (1988) A rat model for pneumococcal otitis media. *Am J Otolaryngol*, 9: 97-101.
- 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.
- 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.
- Hoberman A, Marchant CD, Kaplan SL, Feldman S (2002) Treatment of acute otitis media consensus recommendations. *Clin Pediatr (Phila)* 41: 373-390.
- Howie VM, Ploussard JH (1972) Efficacy of fixed combination antibiotics versus separate components in otitis media. Effectiveness of erythromycin estolate, triple sulfonamide, ampicillin, erythromycin estolate – triple sulfonamide, and placebo in 280 patients with acute otitis media under two and one-half years of age. *Clin Pediatr* 11: 205-214.

- 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.
- Hulka JH (1971) Bone conduction changes in acute otitis media. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 33: 333-350.
- Hunter LL, Margolis RH, Giebink GS, Schmidt JL, Le CT, Daly KA (1995) Long term prospective study of hearing loss in children after tympanostomy tube treatment of chronic otitis media with effusion. In Lim DJ, Bluestone CD, Casselbrandt M, Klein JO, Ogra P (Eds.), Recent Advances in Otitis Media, BC Decker, Ontario, Canada, p. 383-386.
- Hunter LL, Margolis RH, Rykken JR, Le CT, Daly KA, Giebink GS (1996) High frequency hearing loss associated with otitis media. Ear Hear 17: 1-11.
- Igarashi M, Konishi S, Alford BR, Guilford FR (1970) The pathology of tympanosclerosis. Laryngoscope 80: 233-243.
- Iino Y, Yuasa R, Kaneko Y, Takasaka T, Kawamoto K (1987) Prognosis and endotoxin content in middle ear effusions in cases after acute otitis media. Acta Otolaryngol (Stockh) 435: 85-89.
- Ikeda K, Morizono T (1988) Changes of the permeability of round window membranes in otitis media. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 114:895-897.
- Ikeda K, Sakagami M, Morizono T, Juhn SK (1990) Permeability of the round window membrane to middle-sized molecules in purulent otitis media. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 116: 57-60.
- Ikui A, Ikeda M, Yamauchi Y, Nomura Y, Yoshida S, Kida A (1999) Acute otitis media associated with bone conduction hearing loss. Nippon Jibiinkoka Kaiho 102: 1036-1041.
- 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.
- 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.

- Jeppsson PH, Nylén O, Lidén G (1973) Audiological aspects of acute otitis media. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 75: 439-442.
- Jewett BS, Prazma JP, Hunter SE, Rose AS, Clark JM, Sartor BR, *et al.* (1999) Systemic reactivation of otitis media with effusion in a rat model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 121: 7-12.
- Jin CS, Majima Y, Hamagushi Y, Takeuchi K, Sakakura Y, Juhn SK (1991) A quantitative study of the ciliary area of experimental otitis media with effusion in cats. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 483: S5-S10.
- 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.
- 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.
- Juhn SK, Giebink GS, Huff JS, Mills EL (1980) Biochemical and immunochemical characteristics of middle ear effusions in relation to bacteriological findings. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 68: S161-S167.
- Juhn SK, Tolan CT, Garvis DS, Cross DS, Giebink GS (1992) The levels of IL-1beta in human middle ear effusions. *Acta Otolaryngol Suppl* 493: S37-S42.
- Jung TT (1988a) Arachidonic acid metabolites in otitis media pathogenesis. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 132: S14-S18.
- Jung TT, Hwang SJ, Poole D (1988b) New animal models of otitis media in chinchillas. In: Lim DJ, Bluestone CD, Klein JO, Nelson JD (Eds.) *Recent Advances in Otitis Media*. BC Decker Inc., Ontario, Canada, p. 450-453.
- 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.
- 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.
- Kanazawa T, Hagiwara H, Kitamura K (2000) Labyrinthine involvement and multiple perforations of the tympanic membrane in acute otitis media due to group A streptococci. *J Laryngol Otol* 114: 47-49.

- Karma P, Sipilä M, Rahko T (1989) Hearing and hearing loss in 5-year-old children. Pure-tone thresholds and the effect of acute otitis media. *Scand Audiol* 18: 199-203.
- Kawauchi H, DeMaria TF, Lim D (1988) Endotoxin permeability through the round window. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 457: S100-S115.
- Kilpi T, Herva E, Kajjalainen T, Syrjanen R, Takala AK (2001) Bacteriology of acute otitis media in a cohort of Finnish children followed for the first two years of life. *Pediatr Infect Dis J* 20: 654-652.
- Kimura RS (1968) Experimental production of endolymphatic hydrops. *Otolaryngol Clin North Am* 1: 457-471.
- Klein JO (2002) Strategies for decreasing multi-drug antibiotic resistance: role of ototopical agents for treatment of middle ear infections. *Am J Manag Care Suppl* 14: S345-S352.
- Klein JO, Teele DW, Pelton SI (1992) New concepts in otitis media: Results of investigations of the Greater Boston Otitis Media Study Group. *Adv Pediatr* 39: 127-156.
- Kobayashi K, Kodama H, Takezawa H, Suzuki T, Kataura A (1988) Elevation of bone conduction threshold in children with middle ear effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 16: 95-100.
- Kovatch AL, Wald ER, Michaels RH (1983) Beta-lactamase-producing *Branhamella catarrhalis* causing otitis media in children. *J Pediatr* 102: 261-266.
- Krekorian TD, Keithley EM, Takahashi M, Fierer J, Harris JP (1990) Endotoxin-induced otitis media with effusion in the mouse. Immunohistochemical analysis. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 109: 288-299.
- Kristensen S (1992) Spontaneous healing of traumatic tympanic membrane perforations in man: A century of experience. *J Otolaryngol* 106: 1037-1050.
- Laitila P, Karma P, Sipilä M, Manninen M, Rahko T (1997) Extended high frequency hearing and history of acute otitis media in 14-year-old children in Finland. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 529: S27-S29.
- Laurent C, Hellström S, Fellenius E (1988) Hyaluran improves the healing of tympanic membrane perforations. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 114: 1435-41.

- Leake ER, Holmes K, Lim DJ, DeMaria TF (1994) Peptidoglycan isolated from nontypeable *Haemophilus influenzae* induces experimental otitis media in the chinchilla. *J Infect Dis* 170: 1532-1538.
- Lesser T, Williams K, Skinner D (1988) Tympanosclerosis, grommets and shear stresses. *Clin Otolaryngol* 13: 375-80.
- 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.
- Levine BA, Shelton C, Berliner KI, Sheehy JL (1989) Sensorineural loss in chronic otitis media. Is it clinically significant? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 115: 814-816.
- Liebman EP, Lovrinic JH, Ronis ML, Katinsky SE (1969) Hearing improvement following meningitis deafness. *Arch Otolaryngol* 90: 470-473.
- Lim DJ, Hussl B (1975) Macromolecular transport by the middle ear and its lymphatic system. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 80: 19-31.
- Lindsay JR (1968) Histopathology of Ménière's disease as observed by light microscopy. *Otolaryngol Clin North Am* 1: 319-329.
- Long SS, Henretig FM, Teter MJ, McGowan KL (1983) Nasopharyngeal flora and acute otitis media. *Infect Immun* 41: 987-991.
- Löppönen H, Sorri M, Pekkala R, Penna J (1992) Secretory otitis media and high-frequency hearing loss *Acta Otolaryngol Suppl* 493: S99-S107.
- Lorentzen P, Haugsten P (1977) Treatment of acute suppurative otitis media. *J Laryngol Otol* 91: 331-340.
- Lowell SH, Jhun SK, Giebink GS (1980) Experimental otitis media following middle ear inoculation of nonviable *Streptococcus pneumoniae*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89: 479-482.
- Lundman L, Bagger-Sjoberg D, Juhn SK, Morizono T (1992) *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and *Haemophilus influenzae* type b endotoxin. Effect on the inner ear and passage through the round window membrane of the chinchilla. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* 498: S69-S76.
- MacAndie CM, O'Reilly BF (1999) Sensorineural hearing loss in chronic otitis media. *Clin Otolaryngol* 24: 220-222.



- MacCormick DP, Saeed K, Uchida T, Baldwin D, Deskin R, Lett-Brown MA, *et al.* (2003) Middle ear fluid histamine and leukotriene B4 in acute otitis media: effect of antihistamine or corticoid treatment. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 67: 221-230.
- Magnuson K, Hellström S (1994) Early structural changes in the rat tympanic membrane during pneumococcal otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 251: 393-398.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mann W (1986) Experimental tympanosclerosis following infection with *Streptococcus pyogenes* and vitamin D3 intoxication. *Arch Otorhinolaryngol* 243: 296-303.
- Mann W, Beck C, Schaefer HE (1987) The significance of calcium antagonists in rat experimental tympanosclerosis. *Arch Otorhinolaryngol* 234: 382-386.
- Mann W, Riede UN, Jonas I, Beck C (1980) The role of matrix vesicles in the pathogenesis of tympanosclerosis. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 89: 43-52.
- Marchisio P, Gironi S, Lambertini L, Tosi S, Ghisalberti E, Drago L, *et al.* (2003) Role of group A beta-hemolytic *Streptococcus* (GABHS) in acute otitis media. Abstract A22, Eighth International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, Ft. Lauderdale, FL, p.125.
- Margolis RH, Nelson DA (1993) Acute otitis media with transient sensorineural hearing loss. A case study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 109: 682-686.
- Margolis RH, Hunter LI, Rykken JR, Giebink GS (1993) Effects of otitis media on extended high-frequency hearing in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102: 1-5.

- Margolis RH, Saly GL, Hunter LL (2000) High-frequency hearing loss and wideband middle ear impedance in children with otitis media histories. *Ear Hear* 21: 206-211.
- Mattsson C, Magnuson K, Hellström S (1995) Myringosclerosis caused by increased oxygen concentration in traumatized tympanic membranes. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104: 625-632.
- Mattsson C (1997) Myringosclerosis. An experimental basis for a theory of its etiology. Medical Dissertation, Umeå University, Umeå, Sweden, p.34-51.
- Mattsson C, Hellström S (1997) Inhibition of the development of myringosclerosis by local administration of fenspiride, an anti-inflammatory drug. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254: 425-429.
- Mattsson C, Marklund S, Hellström S (1997) Application of oxygen free radical scavengers to diminish the occurrence of myringosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 106: 513-518.
- Mattsson C, Magnuson K, Hellström S (1998) Myringotomy: a prerequisite for the development of myringosclerosis? *Laryngoscope* 108: 102-106.
- Mattsson C, Johansson C, Hellström S (1999) Myringosclerosis develops within 9 h of myringotomy. *ORL* 61: 31-36.
- McIntire C, Benitez JT (1970) Spontaneous repair of the tympanic membrane: histopathological studies in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 79: 1129-1131.
- McMinn MH, Taylor M (1966) The cytology of repair in experimental perforations of the tympanic membrane. *Br J Surg* 53: 222-232.
- McRae D, Gatland DJ, Youngs R, Cook J (1989) Aspiration of middle ear effusions prior to grommet insertion. An etiological factor in tympanosclerosis. *J Otolaryngol* 18: 229-231.
- 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.
- Melo-Cristino J, Fernandes ML, Serrano N, and The Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens (2001) A multicenter study of the antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from patients with community-acquired lower respiratory tract infections in 1999 in Portugal. *Microb Drug Resist.* 7: 33-38.

- Meyerhoff WL, Shea DA, Giebink GS (1980) Experimental pneumococcal otitis media. A histopathologic study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 88: 606-612.
- Miodonski J (1958) Past and present treatment of labyrinthitis otogenes. *Arch Otolaryngol* 67: 40-48.
- Möller P (1981) Tympanosclerosis of the ear drum in cleft palate patients. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 91: 91-94.
- Molstad S, Eriksson M, Asplund R, Holm S (2000) Behandling av akutöroninflammation hos barn—Konsensusuttalande. In: Landstingsförbundet, Medicinska forskningsrådet och Socialstyrelsen i samverkan, ABC O Ekblad & Co, Västervick, Sweden, p. 1-24.
- Mondain M, Saffiedine S, Uziel A (1991) Fibroblast growth factor improves the healing of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 111: 337-341.
- Moore DC, Best GF (1980) A sensorineural component in chronic otitis media. *Laryngoscope* 90: 1360-1366.
- Morgan WC (1977) Tympanosclerosis. *Laryngoscope* 87: 1821-1825.
- Morizono T, Giebink S, Paparella MM, Sikora MA, Shea D (1985) Sensorineural hearing loss in experimental purulent otitis media due to *Streptococcus pneumoniae*. *Arch Otolaryngol* 111: 794-8.
- Münker G (1981) Inner ear hearing loss in acute and chronic otitis media. *Adv Oto-Rhino-Laryngol* 27: 138-143.
- Mutlu C, Odabasi AO, Metin K, Basak S, Erpek G (1998) Sensorineural hearing loss associated with otitis media with effusion in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 46: 179-184.
- Mysel P (1942) Diagnosis and treatment of labyrinthitis secondary to tympanic infection. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 51: 761-767.
- Nadol JB (1978) Hearing loss as a sequela of meningitis. *Laryngoscope* 88: 739-55.
- Nomura Y (1984) Otological significance of the round window. *Adv ORL* 33: 1-162.
- Nonomura N, Nakano Y, Fujioka O, Niijima H, Kawana M, Fujita M (1987) Experimentally induced otitis media with effusion following inoculation with the outer cell wall of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Arch Otorhinolaryngol* 244: 253-257.

- 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.
- Okonska H, Krzeska-Malinowska I, Moszynski B (1995) Sensorineural hearing loss in the course of acute otitis media. *Otolaryngol Pol* 42: 138-142.
- 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.
- Ozcan C, Gorur K, Cinel L, Talas DU, Unal M, Cinel I (2002a) The inhibitory effect of topical N-acetylcysteine application on myringosclerosis in perforated rat tympanic membrane. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 63: 179-184.
- Ozcan C, Polat G, Gorur K, Talas DU, Bagdatoglu O, Cinel I (2002b) The effect of local administration of N-acetylcysteine in perforated tympanic rat membranes: an experimental study in myringosclerosis. *Pharmacol Res* 45: 5-9.
- Paparella MM, Sugiura S (1967) The pathology of suppurative labyrinthitis. *Ann Otolaryngol* 67:554-586.
- Paparella MM, Brady DR, Hoel R (1970a) Sensorineural hearing loss in chronic otitis media and mastoiditis. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 74: 108-115.
- Paparella MM, Hiraide F, Juhn SK, Kaneko Y (1970b) Cellular events involved in middle ear fluid production. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 79: 766-779.
- Paparella MM, Oda M, Hiraide F, Brady D (1972) Pathology of sensorineural hearing loss in otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 81: 632-47.
- Paparella MM, Goycoolea MV, Meyerhoff WL, Shea D (1979) Endolymphatic hydrops and otitis media. *Laryngoscope* 89: 43-58.
- Paparella MM, Goycoolea MV, Meyerhoff WL (1980) Inner ear pathology and otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 89: S249-S253.
- Paparella MM, deSousa LC, Mancini F (1983) Ménière's syndrome and otitis media. *Laryngoscope* 93: 1004-1012.
- Paparella MM, Morizono T, Le CT, Mancini F, Sipila P, Choo YB, Liden G, Kim CD (1984) Sensorineural hearing loss in otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 93: 623-629.
- Paparella MM, Schachern PA, Yoon TH (1988) Survey of interactions between middle ear and inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 457: S9-S24.

- Papp Z, Rezes S, Jókay I, Sziklai I (2003) Sensorineural hearing loss in chronic otitis media. *Otol Neurotol* 24: 141-144.
- Parker AJ, Maw AR, Powell JE (1990) Intra-tympanic membrane bleeding after grommet insertion and tympanosclerosis. *Clin Otolaryngol* 15: 203-207.
- Pasquali-Ronchetti I, Quaglino D, Bergamini G (1996) Ascorbic acid and connective tissue. In: Harris JR (Ed.) *Subcellular Biochemistry*, Plenum Press, New York, NY, vol.25 (13), p. 249-64.
- Perlman HB, Lindsay JR (1939) Relation of the internal ear spaces to the meninges. *Arch Otolaryngol* 29: 12-23.
- Pichichero ME (2000) Acute otitis media: Part I. Improving diagnostic accuracy. *Am Fam Physician* 61: 2051-2056.
- Piltcher OB, Swartz JD, Nagnuson K, Doyle WJ, Hebda PA (2002) A rat model of otitis media with effusion caused by eustachian tube obstruction with and without *Streptococcus pneumoniae* infection: methods and disease course. *Otolaryngol Head Neck Surg* 126: 490-498.
- Post J, Preston M, Aul J, Larkins-Pettigrew M, Rydquist-White J, Anderson KW *et al.* (1995) Molecular analysis of bacterial pathogens in otitis media with effusion. *JAMA* 273: 1598-1604.
- 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.
- Qvarnberg Y, Palva T (1980) Active and conservative treatment of acute otitis media: prospective studies. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 89: 269-270.
- Rahko T, Karma P, Sipilä M (1989) Sensorineural hearing loss and acute otitis media in children. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 108: 107-112.
- Rahko T, Laitila P, Sipilä M, Manninen M, Karma P (1995) Hearing and acute otitis media in 13-year-old children. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 115: 190-192.
- Reeve DR (1977) Repair of large experimental perforations of the tympanic membrane. *J Laryngol Otol* 91: 767-778.
- Reijnen CJ, Kuipers W (1971) The healing pattern of the drum membrane. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 287: S1-S74.
- Rhee CK, Jung TT, Miller S, Weeks D (1993) Experimental otitis media with effusion induced by platelet activating factor. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102: 600-605.

- Rice DH (1978) Preoperative and postoperative hearing loss in chronic ear disease. *Ear Nose Throat J* 55: 31-36.
- Ripley-Petzoldt ML, Giebink GS, Juhn SK, Aeppli D, Tomasz A, Tuomanen E (1988a) The contribution of pneumococcal cell wall to the pathogenesis of experimental otitis media. *J Infect Dis* 157: 245-255.
- Ripley-Petzoldt ML, Solfelt M, Wright PF (1988b) Middle ear and Eustachian tube histopathology during experimental *influenza A* virus infection. In: Lim DJ, Bluestone C, Klein JO, Nelson JD (Eds.) *Recent Advances in Otitis Media*. BC Decker, Ontario, Canada, p. 433-435.
- Roddey OF, Earle R, Haggerty R (1966) Myringotomy in acute otitis media: a controlled study. *JAMA* 197: 849-853.
- Roosa DB (1873) *A practical treatise of the diseases of the ear including the anatomy of the organ*. William Wood & Co., New York, NY, U.S.A.
- 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.
- Rossi F, Bellavite P, Berton G, Grzeskowiak M, Papini E (1985) Mechanism of production of toxic oxygen radicals by granulocytes and macrophages and their function in the inflammatory process. *Path Res Pract* 180: 136-142.
- Ruah MC (1992) *Evolução pós-natal da membrana do tímpano humana normal e patológica. Implicações clínicas e epidemiológicas*. Tese. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Ruah CB, Schachern PA, Paparella MM, Zelterman D (1992) Mechanisms of retraction pocket formation in the pediatric tympanic membrane. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 118: 1298-1305.
- Ryding M, Konradsson K, Kalm O, Prellner K (2002) Auditory consequences of recurrent acute purulent otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 111: 261-266.
- Sahm DF, Jones ME, Hickey ML, Diakun DR, Mani S, Thornsberry C (2000) Resistance surveillance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated in Asia and Europe, 1997-1998. *J Antimicrob Chemother* 45: 457-466.

- Sahni RS, Paparella MM, Schachern PA, Goycoolea MV, Le CT (1987) Thickness of the human round window membrane. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113: 630-634.
- Saijo S, Kimura RS (1984) Distribution of HRP in the inner ear after injection into the middle ear cavity. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 97: 593-610.
- Sakagami M, Harada T, Juhn S, Duvall AJ (1990) Morphologic and biochemical study of vascular permeability of the middle ear mucosa in experimental otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 99: 654-659.
- Sando I, Holinger LD, Balkany TJ, Wood RP (1976) Unilateral endolymphatic hydrops and associated abnormalities. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 85: 368-377.
- Sato K (1997) Experimental otitis media induced by non-viable *Moraxella catarrhalis* in the guinea pig model. *Auris Nasus Larynx* 24: 233-238.
- Sato K, Kawana M, Nonomura N, Nakano Y (1999) Course of IL-1beta, IL-6, IL-8, and TNF-alpha in the middle ear fluid of the guinea pig otitis media model induced by nonviable *Haemophilus influenzae*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 108: 559-563.
- 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.
- Schachern PA, Paparella MM, Goycoolea MV, Duvall AJ, Choo YB (1987) The permeability of the round window membrane during otitis media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113: 625-9.
- Schachern PA, Paparella MM, Hybertson R, Sano S, Duval AJ (1992) Bacterial tympanogenic labyrinthitis, meningitis, and sensorineural damage. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 118: 53-57.
- Schiff M, Poliquin JF, Cantazaro A, Ryan AF (1980) Tympanosclerosis. A theory of pathogenesis. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 89: S1-S16.
- Schoch C (2003) In vitro inhibition of human conjunctival mast-cell degranulation by ketotifen. *J Ocul Pharmacol Ther* 19: 75-81.
- Schucknecht HF, McNeill RA (1966) Light microscopic observations on the pathology of the endolymph. *J Laryngol Otol* 79: 1-10.
- Schucknecht HF, El Seifi A (1963) Experimental observations on the fluid physiology of the inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 72: 687-712.

- Schwartz R, Rodriguez W, Grundfast K (1984) Duration of middle ear effusion after acute otitis media. *Pediatr Infect Dis* 3: 204-207.
- Sell SH, Webb WW, Pate JE, Doyne EO (1972) Long-term sequelae of *Haemophilus influenzae* meningitis. *Pediatr* 49: 206-211.
- Sheehy JL, House WF (1962) Tympanosclerosis. *Arch Otolaryngol* 76: 151-157.
- Skinner DW, Lesser TH, Richards SH (1988) A 15-year follow-up of a controlled trial of the use of grommets in glue ear. *Clin Otolaryngol* 13: 341-346.
- 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.
- Söderberg O, Hellström S, Stenfors LE (1984) Myringotomy made by CO<sub>2</sub> laser. An alternative to the ventilation tube. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 97: 335-341.
- Söderberg O, Hellström S, Stenfors LE (1985) The healing pattern of experimental heat myringotomy. *Rev Laryngol Otol Rhinol* 106: 81-85.
- Sorri M, Maki-Torkko E, Alho OP (1995) Otitis media and long-term follow-up of hearing. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 115: 193-195.
- Spandow O, Anniko M, Hellström S (1989) Inner ear disturbances following inoculation of endotoxin into the middle ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 107: 90-96.
- Spandow O, Hellström S, Schmidt SH (1990) Hydrocortisone delay of tissue repair of experimental tympanic membrane perforations. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 99: 647-653.
- Spratley J, Silveira H, Alvarez I, Pais-Clemente M (2000) Acute mastoiditis in children: review of the current status. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 56: 33-40.
- 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.



- Stenfors LE, Carlsöö, Salen, Winblad B (1980) Repair of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 90: 332-341.
- 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.
- Stinson WD (1936) Reparative processes in the *membrana tympani*: some interesting manifestations. *Arch Otolaryngol* 24: 600-605.
- Sugiushi T, Asano K, Kawamura N (1998) Acute otitis media with bone conduction hearing loss associated with acute mastoiditis. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Khaio* 101: 841-848.
- Suzuki K, Bakaletz LO (1994) Synergistic effect of adenovirus type 1 and non-typeable *Haemophilus influenzae* in a chinchilla model of experimental otitis media. *Infect Immun* 62: 1710-1718.
- Tachibana M, Morioka H, Tanimura F, Tanaka T, Machino M, Amagai T, *et al.* (1985) Experimental immune complex otitis media: localization of IgG by protein A-gold technique. *Auris Nasus Larynx Suppl.* 12(1): S86-S88.
- Tanaka, Motomura S (1981) Permeability of the labyrinthine windows in guinea pigs. *Arch Otorhinolaryngol* 233: 67-73.
- Taylor M, McMinn R (1965) Healing of experimental perforations of the tympanic membrane. *J Laryngol Otol* 79: 148-158.
- 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.
- Tos M, Bonding P, Poulsen G (1983) Tympanosclerosis of the ear drum in secretory otitis media after insertion of grommets. A prospective, comparative study. *J Laryngol Otol* 97: 489-496.
- Tos M, Wiederhold M, Larsen P (1984) Experimental long-term tubal occlusion in cats. A quantitative histopathological study. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 97: 580-592.
- Tos M (1988) Sensorineural hearing loss in acute and chronic middle ear diseases. *Acta Otolaryngol* (Stockh) Suppl. 457: S87-S93.
- Tos M, Stangerup SE (1989) Hearing loss in tympanosclerosis caused by grommets. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 115: 931-935.

- Tos M (2000) Surgical Solutions for Conductive Hearing Loss. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, p. 1-10.
- Turner AL, Fraser JS (1928) Labyrinthitis: a complication of middle ear suppuration. A clinical and pathological study. *J Laryngol Otol* 43: 609-44.
- van Buchem FL (1987) Antibiotics for otitis media? *J R Coll Gen Pract* 37: 367-371.
- van der Ven LT, van den Dobbeltste GP, Nagarajah B, van Dijken H, Dortant PM, Vos JG, Roholl PJ (1999) A new rat model of otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*: conditions and applications in immunization protocols. *Infect Immun* 67: 6098-6103.
- van Zuijlen DA, Schilder AG, van Balen FA, Hoes AW (2001) National differences in incidence of acute mastoiditis: relationship to prescribing patterns of antibiotics of acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 20: 104-44.
- Vartiainen E, Karjalainen S (1987) Factors influencing sensorineural hearing loss in chronic otitis media. *Am J Otolaryngol* 8: 13-15.
- Ventry IM (1980) Effects of conductive hearing loss: fact or fiction. *J Speech Hear Disord* 45: 143-156.
- Virolainen A, Salo P, Jero J, Karma P, Eskola J, Leinonen M (1994) Comparison of PCR assay with bacterial culture for detecting *Streptococcus pneumoniae* in middle ear fluid of children with acute otitis media. *J Clin Microbiol* 32: 2667-2670.
- 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.
- Walby AP, Barrera A, Schucknecht HF (1983) Cochlear pathology in chronic suppurative otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 103: S1-S19.
- 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.
- 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.

- Welsh LW, Welsh JJ, Healy MP (1983) Effect of sound deprivation on central hearing. *Laryngoscope* 93: 1569-1575.
- 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.
- 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.
- 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.
- Widemar L, Hellström SO, Stenfors LE (1986) Different structural changes in *membrana Shrapnelli* in serous and purulent otitis media. An experimental study in the rat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 102: 266-273.
- Wielinga EW, Kuijpers W, Tonnaer EL, Jap PH (1988) An experimental model for tympanosclerosis. A preliminary report. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 105: 537-542.
- Witte MB, Barbul A (1997) General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 77: 509-528.
- Wittmaack K (1926) *Labyrinthitis purulenta; empyema sacculi endolymphatici*. In: Hencke F, Lubarsch O (Eds.) *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, Julius Springer, Berlin, Germany, vol. 12: p. 275.
- Wittmaack K (1956) *Die Ortho und Pathologie des Labyrinthithes*. Georg Thieme, Stuttgart, Germany. p. 56-67.
- Yamashita I, Sasa H, Okasaki N, Okasaki N, Kumazawa T (1985) A cause of sensorineural hearing loss in otitis media with effusion. *Auris Nasus Larynx Suppl* 12: S40-S42.
- Yazawa Y, Yoo TJ, Ishibe T, Tomoda K (1985) Type II collagen induced tympanosclerosis model in guinea pigs. *Auris Nasus Larynx Suppl* 1: S200-S202.
- Yoon YJ, Hellström S (2002) Ultrastructural characteristics of the round window membrane during pneumococcal otitis media in rat. *J Korean Med Sci* 17: 230-235.

- 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.
- Zuckerman MA (1933) Aural complications of epidemic cerebrospinal meningitis. *Vrach* 16: 706-715.

# **Resumo e Conclusões**

---

---

A presente dissertação é dedicada à otite média aguda (OMA), uma das afecções mais frequentes do estrato etário pediátrico. Entre as diversas complicações e sequelas descritas contam-se a labirintite com disfunção coclear e a miringosclerose. Nas últimas décadas as bactérias responsáveis pela OMA têm demonstrado um aumento progressivo de resistências aos antimicrobianos, exigindo uma actualização permanente por parte da comunidade médica e motivando um repensar das estratégias diagnósticas e terapêuticas. Como tal é legítimo esperar-se um ressurgimento da utilização da miringotomia na OMA, pelo que a investigação dos aspectos relacionados com a cicatrização da membrana timpânica (MT) e a prevenção de sequelas pós-miringotomia se revestem de grande actualidade.

Os resultados obtidos nos trabalhos incluídos na dissertação permitem concluir,

- Através da avaliação audiométrica prospectiva de uma série de crianças com OMA unilateral, que:
  - 1) A OMA origina uma diminuição da acuidade auditiva na audiometria por via óssea.
  - 2) Este tipo de hipoacusia é mais evidente nas frequências altas e assume geralmente um carácter temporário.

- 3) O grau de atingimento auditivo inicial é superior nos casos que permanecem mais tempo com inflamação no ouvido médio.
- Mediante a observação histopatológica de 1151 ossos temporais humanos, que:
    - 4) A presença de coloração eosinofílica nos fluídos do ouvido interno, indicativa de labirintite serosa, é independente de fenómenos artefactuais *post-mortem*.
    - 5) O diagnóstico histológico de labirintite serosa é frequente nos ouvidos com otite média, sendo mais comum na OMA do que na otite média crónica.
    - 6) Embora possa assumir um carácter difuso, a localização predominante dos fenómenos de labirintite serosa dá-se na região da rampa timpânica da espira basal coclear adjacente à membrana da janela redonda.
    - 7) A labirintite serosa associa-se de forma significativa à presença de sinais típicos de hidropisia endolinfática.
  - Com a avaliação clínica e microbiológica de uma série de crianças com OMA submetidas a miringotomia, que:
    - 8) A miringotomia apresenta um interesse limitado quando utilizada como complemento da terapêutica antibiótica na OMA não-complicada, contribuindo apenas para uma redução mais precoce da otalgia.

- 9) O *S. pneumoniae* é destacadamente o agente bacteriano mais frequentemente isolado na OMA pediátrica no Porto, seguido do *H. influenzae*. As taxas de culturas positivas para o *S. pyogenes* são superiores e para a *M. catarrhalis* inferiores às descritas noutros países.
  - 10) Os índices de resistências aos antimicrobianos das bactérias do ouvido médio são elevados mas ainda assim inferiores às de outros países da Europa Mediterrânica.
  - 11) O teste pelo método PCR permite uma elevada especificidade e uma maior sensibilidade que as culturas clássicas na identificação bacteriana da OMA.
- Recorrendo a um modelo de miringotomia na OMA experimental no Rato, que:
    - 12) A evolução na OMA nesta espécie tende a ser auto-limitada. A miringotomia retarda a resolução da inflamação na MT e produz alterações importantes na estrutura conjuntiva da *lamina propria*.
    - 13) A velocidade com que a cicatrização da incisão de miringotomia se desenvolve na OMA é superior à da MT não-infectada, o que implica um risco reduzido de perfuração residual mas também um período curto de arejamento do ouvido médio.
    - 14) A dinâmica da reacção da MT à miringotomia é histopatologicamente detectável logo nas primeiras horas após a incisão. Nas MTs infectadas a resposta é precoce na *pars tensa* através duma estimulação intensa da camada queratinizante e do tecido conjuntivo da *lamina propria*. Nas MTs não-infectadas a reacção



inicial surge na *pars flaccida*, com uma desgranulação intensa dos mastócitos, e os sinais regenerativos na *pars tensa* são mais tardios.

- 15) As perfurações da MT no Rato encerram-se através da regeneração activa dos bordos da perfuração em toda a sua circunferência, mas existe um vector predominante da cicatrização seguindo uma orientação do cabo do martelo para o *annulus*.
  - 16) O desenvolvimento de miringosclerose é superior nas MTs miringotomizadas do que nas MTs infectadas sem miringotomia.
- Aplicando topicamente ácido ascórbico em MTs perfuradas do Rato, que:
- 17) A ocorrência de miringosclerose é fortemente reduzida após a aplicação do antioxidante ácido ascórbico comparativamente com a utilização de placebo ou com a ausência de tratamento.

# **Summary and Conclusions**

This thesis, focused on the wide subject of acute otitis media (AOM), deals with new insights on several topics which include the interactions between middle ear and inner ear, evaluation of the microbiological prevalence in the Porto region, and investigation of diverse aspects related to healing of the tympanic membrane (TM) and prevention of post-myringotomy sequelae. The aim is to raise the debate around these issues in order to contribute to the elucidation of several questions still unanswered.

The data obtained lead to the conclusions,

- Through prospective audiometric evaluation of a series of pediatric patients diagnosed with AOM, that:
  - 1) AOM provokes hearing loss measured in bone conduction audiometry.
  - 2) This type of threshold shift is more evident in the high-frequency ranges and most times is temporary.
  - 3) The initial degree of hearing loss is greater in the ears that show a more prolonged course of inflammation of the middle ear.

- Via the histopathological study of 1151 human temporal bones, that:
  - 4) The presence of eosinophilic staining of the inner ear fluids, indicative of serous labyrinthitis, is independent of *post-mortem* artifacts.
  - 5) The histopathologic findings of serous labyrinthitis are common in human temporal bones with otitis media and are more frequent in AOM than in chronic suppurative otitis media.
  - 6) Despite the sometimes diffuse presentation of serous labyrinthitis, the predominant location where serous fluid is found is the *scala tympani* of the basal turn of the cochlea adjacent to the round window membrane.
  - 7) Serous labyrinthitis is significantly associated with the occurrence of endolymphatic hydrops.
- According to a clinical and microbiological evaluation of a series of children with AOM treated with antibiotics and with or without myringotomy, that:
  - 8) Performing myringotomy as an adjunct to antibiotic treatment of uncomplicated AOM is of limited interest. The only significant advantage seems to be earlier alleviation of otalgia.
  - 9) *S. pneumoniae* is currently the bacterium most frequently isolated in pediatric AOM in Porto, followed by *H. influenzae*. Compared to other countries, higher rates of incidence of infection with *S. pyogenes* and lower rates of *M. catarrhalis* were found, respectively.

- 10) Current rates of infection with bacteria with low-susceptibility to the antimicrobials are high, but this is still less prevalent than in other Southern European countries.
- 11) Polymerase Chain Reaction (PCR) tests give a high degree of specificity and a greater sensitivity than classic cultures in the identification of bacterial strains in AOM.
  - By way of an experimental animal model for AOM and myringotomy, that:
    - 12) The natural history of AOM tends to be self-limited in the Rat. Myringotomy delays the recovery of the inflammatory event in the TM and causes considerable damage to the structure of the *lamina propria*.
    - 13) The healing of the myringotomy incision in AOM is faster than in non-infected TMs, which implies a lower risk of permanent perforations of the TM, albeit the period of aeration of middle ear is also short.
    - 14) The dynamics of reaction in the TM following myringotomy are histopathologically perceptible few hours after the aggression. In TMs with AOM there is an early response from the keratinizing layer and from the connective tissue of the *lamina propria*. In the non-infected TMs, the earlier reactions are observable in the *pars flaccida* through an intense degranulation of mast-cells whereas the regeneration process in the *pars tensa* has a later start.

- 15) The perforations of the Rat TM heal through an active regeneration of the whole circumference of the perforation borders but follow a predominant vector directed from the malleus to the *annulus* region.
- 16) Myringosclerosis tends to occur more frequently in myringotomized than in infected non-myringotomized TMs.
  - Through the topical application of ascorbic acid in miringotomized TMs in rats, that:
- 17) The development of myringosclerosis, a very common finding after myringotomy, is dramatically reduced by local treatment with the antioxidant ascorbic acid in comparison with placebo-treated or untreated myringotomized TMs.

# **Résumé et Conclusions**

---

---

Nous avons essayé, dans ce travail qui s'inscrit dans le très vaste cadre de l'otite moyenne aiguë (OMA), de mieux comprendre quelques uns des aspects de ses répercussions au niveau cochléaire, d'évaluer à partir de différentes méthodes de laboratoires quelle prédominance microbiologique elle a dans la région de Porto, et d'étudier les aspects liés à la cicatrisation de la membrane tympanique (MT) et à la prévention des séquelles post-myringotomie, afin d'essayer de répondre à une série de questions encore ouvertes ou étant encore l'objet de controverses.

Les résultats des travaux inclus dans cette dissertation nous permettent de conclure,

- à partir de l'évaluation audiométrique prospective d'une série d'enfants ayant une OMA unilatérale, que:
  - 1) l'OMA est à l'origine d'une diminution de l'acuité auditive en audiométrie par voie osseuse.
  - 2) ce type d'hypoacousie est plus évident dans les hautes fréquences et est généralement temporaire.
  - 3) le degré de surdité initiale est plus important dans les cas présentant plus longtemps une inflammation de l'oreille moyenne.



- grâce à l'analyse histopathologique de 1151 os temporaux humains, que :
  - 4) la présence de coloration oesinophilique dans les fluides de l'oreille interne, signe d'une labyrinthite séreuse, est indépendante de phénomènes artefactuels *post-mortem*.
  - 5) les signes de labyrinthite séreuse sont fréquemment visibles dans les oreilles avec une otite moyenne, ce phénomène étant plus fréquent dans l'OMA que dans l'otite moyenne chronique.
  - 6) bien que pouvant revêtir un caractère diffus, les phénomènes de labyrinthite séreuse prédominent dans la région de la rampe tympanique du limaçon basal cochléaire adjacente à la membrane de la fenêtre ronde.
  - 7) la labyrinthite séreuse est associée d'une façon significative à la présence de signes typiques d'hydrops endolymphatique.
- au moyen de l'évaluation clinique et microbiologique d'enfants ayant une OMA et soumis à une myringotomie, que
  - 8) la myringotomie présente un intérêt limité lorsqu'elle est utilisée en complément à la thérapeutique par antibiotique de l'OMA non compliquée. Cependant, elle est indiquée en présence de complications potentielles ou lorsque l'on veut un diagnostic microbiologique.
  - 9) *S. pneumoniae* est l'agent bactérien le plus fréquemment isolé dans l'OMA pédiatrique de Porto, suivi par *H. influenzae*. Pour ce qui est de *S. pyogenes* et *M. catarrhalis*, les taux de cultures

positives sont respectivement supérieurs et inférieurs à ceux décrits dans d'autres pays.

- 10) la résistance aux antimicrobiens des bactéries de l'oreille moyenne est élevée mais elle est cependant encore inférieure à celle d'autres pays de l'Europe méditerranéenne.
- 11) l'analyse par la méthode PCR permet d'atteindre, dans l'identification bactérienne de l'OMA, une grande spécificité et une plus grande sensibilité que les cultures classiques.
  - En recourant à un modèle de myringotomie, dans l'OMA expérimentale chez la souris, que
- 12) l'évolution de l'OMA dans cette espèce tend à s'auto-limiter. La myringotomie n'accélère pas ce processus et produit des altérations importantes dans la structure de la MT.
- 13) la rapidité de cicatrisation de l'incision de la myringotomie dans l'OMA est supérieure à celle de la MT non infectée, ce qui implique un risque réduit de perforation résiduelle mais aussi une période courte d'aération de l'oreille moyenne.
- 14) la dynamique de la réaction de la MT à la myringotomie est histopathologiquement détectable dès les premières heures après l'incision: Dans les MT infectées, la réponse est précoce grâce à une stimulation intense de la couche kératinisante et du tissu conjonctif de la *pars tensa*. Dans les MT non infectées, la réaction initiale surgit dans la *pars flaccida*, avec une dégranulation intense des mastocytes, et les signes régénératifs de la *pars tensa* sont plus tardifs

- 15) les perforations de la MT du souris se ferment à partir de la régénération active de toute la circonférence de ses bords, mais sous la prédominance d'un vecteur orienté de la manche du marteaux vers l'*annulus*
- 16) La myringosclérose se développe plus fréquemment dans les MTs myringotomisées que dans les MTs infectées sans myringotomie
- par l'application topique d'acide ascorbique dans des MT perforées de la souris, que:
- 17) l'apparition de myringosclérose est fortement réduite après application de l'antioxydant acide ascorbique en comparaison avec l'utilisation du placebo ou avec l'absence de traitement.