UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARCOS MIRANDA DE ARAUJO

**Efeitos da utilização de insulina e de um implante
transitório de biomembrana de látex natural,
derivado da seringueira *Hevea brasiliensis*, em um
modelo experimental de perfuração traumática de
membrana timpânica**

RIBEIRÃO PRETO

2012

MARCOS MIRANDA DE ARAUJO

Efeitos da utilização de insulina e de um implante transitório de biomembrana de látex natural, derivado da seringueira *Hevea brasiliensis*, em um modelo experimental de perfuração traumática de membrana timpânica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Angelo Hyppolito

RIBEIRÃO PRETO

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Araujo, Marcos Miranda de

Efeitos da utilização de insulina e de um implante transitório de biomembrana de látex natural, derivado da seringueira *Hevea brasiliensis*, em um modelo experimental de perfuração traumática de membrana timpânica. Ribeirão Preto, 2012.

163p.: 33 il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Orientador: Hyppolito, Miguel Angelo.

1. Perfuração da membrana timpânica; 2. Cicatrização; 3. Insulina;
4. Latex; 5. Colágeno; 6. Imuno-histoquímica;
7. Processamento de imagem assistida por computador.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Marcos Miranda de Araujo

Título: Efeitos da utilização de insulina e de um implante transitório de biomembrana de látex natural, derivado da seringueira *Hevea brasiliensis*, em um modelo experimental de perfuração traumática de membrana timpânica.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Aprovado em: ____/____/____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

À minha esposa Adriana Sanches Garcia de Araújo, amor da minha vida, companheira fiel de todos os momentos, enriquecendo-me de justiça, honra, prosperidade e vida.

“Muitas mulheres procedem virtuosamente, mas tu a todas sobrepujas” (Provérbios 31:29).

Ao meu filho Lucas Garcia de Araújo, amado milagre de Deus na minha vida e fonte de inspiração.

“Os filhos são herança de Deus” (Salmos 127:3)

Aos meus pais, Roberval e Maria, a minha gratidão eterna por me ensinarem os verdadeiros valores desta vida.

Aos meus irmãos, Marina e Roberto, pela amizade e boas lembranças de uma convivência inesquecível.

Agradecimentos

Ao orientador Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppólito, tutor, incentivador e um grande exemplo de seriedade, compromisso e raciocínio científico. Sábias palavras de estímulo nos momentos de decisões.

À Prof. Dra. Maria Célia Jamur, serenidade de mestre, pelo acolhimento, permitindo livre acesso às dependências dos Laboratórios de Histotecnologia, além da contribuição fundamental na Metodologia deste estudo.

*Ao Prof. Dr. Joaquim Coutinho-Netto (in memoriam), que, em conversas fugazes, conseguiu ampliar os horizontes de discussão do estudo, sendo um dos responsáveis pelos avanços das pesquisas dos derivados da seringueira *Hevea brasiliensis*.*

Às técnicas Adriana Andrade Batista Murashima e Vaní Maria Alves, pelas inúmeras contribuições e pela amizade construída com vários momentos de trabalho em conjunto. Meu sincero carinho e agradecimento!

À técnica Maria Rossato, pela disponibilidade e dedicação ao Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ao técnico Anderson Souza, pelas orientações na captura de imagens histológicas, a minha gratidão.

Aos médicos patologistas Michel Antonio Kiyota Moutinho, Richard Augusto Ribeiro e Elizete Lopes Guilherme, por me receberem em seu Serviço de Patologia de São Carlos, a minha gratidão.

Ao Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Epígrafe

“O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido ficar crianças por toda a vida”.

(Albert Einstein)

“Continuar com os objetivos e aceitar o tempo são a melhor forma de obter os resultados desejados”.

(Autor desconhecido)

RESUMO

ARAUJO, M. M. **Efeitos da utilização de insulina e de um implante transitório de biomembrana de látex natural, derivado da seringueira *Hevea brasiliensis*, em um modelo experimental de perfuração traumática de membrana timpânica.** 2012. 163f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Nos últimos anos, houve uma tendência na busca por substâncias reguladoras que pudessem otimizar o processo de cicatrização de membranas timpânicas (MTs) perfuradas. **Objetivos:** Determinar os efeitos da utilização da insulina tópica e da biomembrana de látex natural, de forma isolada e em associação, no processo de cicatrização de perfurações traumáticas de MTs. **Materiais e Métodos:** MTs de 61 ratos Wistar foram perfuradas nas porções anterior e posterior ao cabo do martelo. Os animais foram divididos em quatro grupos: Controle, Insulina, Látex e Insulina+Látex. No grupo Insulina, as perfurações foram tratadas com uso tópico de insulina regular. No grupo Látex, tratadas com biomembrana de látex natural. No grupo Insulina+Látex, tratadas com associação da insulina e da biomembrana de látex. As MTs foram avaliadas por técnicas histológicas com três, cinco e sete dias após sua perfuração traumática. Foram analisadas as morfometrias das espessuras das camadas epitelial, fibrosa e mucosa; tamanho da perfuração; área de secção transversal da MT; avaliação semiquantitativa e qualitativa da produção de colágeno por microscopia de polarização; e avaliação imuno-histoquímica das células epiteliais, dos miofibroblastos e da vascularização. **Resultados:** A insulina e a biomembrana de látex anteciparam o fechamento das perfurações traumáticas de MTs ($p<0,01$); estimularam precocemente o aumento da espessura da camada epitelial externa ($p<0,01$); promoveram aumento precoce da espessura da camada fibrosa ($p<0,01$); contribuíram para a maior identificação do anticorpo anti-panqueratina como marcador epitelial ($p<0,05$); aumentaram a marcação do anticorpo anti-alfa-actina de músculo liso ($p<0,05$), caracterizando maior proliferação de miofibroblastos. A insulina, isoladamente, provocou maior formação do colágeno tecidual ($p<0,05$), com fibras colágenas mais espessas e melhor organizadas ($p<0,05$). **Conclusão:** A insulina e a biomembrana de látex natural, de forma isolada e em associação, aceleraram o processo de cicatrização de perfurações traumáticas de MTs.

Palavras-chave: Perfuração da membrana timpânica; Cicatrização; Insulina; Látex; Colágeno; Imuno-histoquímica; Processamento de imagem assistida por computador.

ABSTRACT

ARAUJO, M. M. **Effects of the treatment using insulin and a transitory natural latex biomembrane implant from rubber tree *Hevea brasiliensis*, in an experimental model of traumatic perforation of tympanic membrane.** 2012. 163f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

In recent years, there has been a tendency to search for regulatory substances that can optimize the healing process of perforated tympanic membranes (TMs). **Objectives:** To determine the effects of using topical insulin and natural latex biomembrane, alone or in combination, in the healing process of traumatic perforations of TMs. **Methods:** TMs of 61 Wistar rats were perforated in two sections, anterior and posterior to the malleus. The rats were divided into 4 groups: Control, Insulin, Latex, and Insulin+Latex. The Insulin group was treated with topical regular insulin. The Latex group was treated with natural latex biomembrane. The Insulin+Latex group was treated with a combination of insulin plus latex biomembrane. The TMs were histologically examined 3, 5, and 7 days post-perforation through morphometric analysis of the thickness of the epithelial, fibrous, and mucosal layers; size of the perforation; cross sectional area of the TM; semiquantitative and qualitative evaluation of the collagen production by polarization microscopy, and immunohistochemical evaluation of epithelial cells, myofibroblasts, and vascularization markers. **Results:** Insulin and latex biomembrane accelerated the healing process of the perforated TMs ($p<0.01$); stimulated early thickening of the outer epithelial layer ($p<0.01$); promoted premature increase in the thickness of the fibrous layer ($p<0.01$); contributed to a larger identification of anti-pankeratin antibody as epithelial marker ($p<0.05$); increased labeling of anti-alpha smooth muscle actin antibody ($p<0.05$), indicating greater proliferation of myofibroblasts. When insulin was used alone, it resulted in greater formation of collagen tissue ($p<0.05$), with thicker and better-organized collagen fibers ($p<0.05$). **Conclusion:** Insulin and natural latex biomembrane, used alone or in combination, accelerated the healing process of traumatic perforations of TMs.

Keywords: Tympanic membrane perforation; Wound healing; Insulin; Latex; Collagen; Immunohistochemistry; Image processing, computer-assisted.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Visão esquemática macroscópica da membrana timpânica. (Adaptada de Wenig; Michaels, 2007)	29
Figura 2-	Desenho esquemático histológico da secção transversal da MT de macacos. (Adaptado de Lim, 1968)	30
Figura 3-	Distribuição celular ao longo do tempo durante as fases de cicatrização tecidual. (Adaptada de Witte; Barbul, 1997).....	33
Figura 4-	Diagrama esquemático mostrando as cadeias moleculares da insulina, pró-insulina, IGF-I, IGF-II e relaxina. (Modificado de Blundell; Humbel, 1980).....	38
Figura 5-	Mecanismos de sinalização do receptor de insulina, descrevendo a cascata de mecanismos moleculares relacionados com o transporte de glicose, a síntese de proteína e o crescimento celular. (Modificado de Youngren, 2007).....	42
Figura 6-	(A) Agulha 30x0,8 mm; (B) MT de rato sob otomicroscopia; (C) Insulina humana regular; (D) Membrana de látex de 1,2 mm de diâmetro; (E e F) Posicionamento de membrana de látex sobre as perfurações de MT.....	50
Figura 7-	Imagem de alta resolução de MT corada em HE ilustrando aferição da espessura total da MT e de cada camada (epitelial, lâmina própria, mucosa) separadamente	55
Figura 8-	Imagem de alta resolução de MT corada em HE ilustrando as medições das perfurações anterior (ant) ; posterior (post) (traço amarelo); (CAE) conduto auditivo externo; (m) cabo do martelo (Magnificação de 40x)	56
Figura 9-	Imagem do programa Image Pro-Plus® v. 7.0 ilustrando: (A) MT; após, determinação das medidas Área e Perímetro; (B) com a função “Filled” (do inglês “preenchido”), e (C) “Outline” (do inglês “delineado”)	57
Figura 10-	Ilustração do histograma de cores (à esquerda) identificando as 256 cores de imagem de 8-bit (à direita).....	59
Figura 11-	Imagens de cortes histológicos de MT ilustrando a aplicação do algoritmo color deconvolution. (A) Corte histológico de MT corado com Hematoxilina e DAB com marcação para anticorpo anti-panqueratina identificado por coloração de tonalidade marrom. (B) O mesmo corte histológico após a decomposição de cores, identificando apenas a coloração de	

	tonalidade marrom marcada pelo cromógeno DAB. (Magnificação de 20x, submetidas a zoom de 100%).....	60
Figura 12-	Imagens de corte histológico de MT do grupo Controle após três dias de perfuração traumática corado em HE	64
Figura 13-	Imagens de corte histológico de MT do grupo Insulina após três dias de perfuração traumática corado em HE	66
Figura 14-	Imagens de cortes histológicos de MT do grupo Controle após cinco dias de perfuração traumática corado em HE	68
Figura 15-	(A) Imagens de cortes histológicos de MT do grupo Insulina; (B, C e D) do grupo Insulina+Látex. Após cinco dias de perfuração traumática corado em HE.	70
Figura 16-	Imagens de corte histológico de MT do grupo Controle após sete dias de perfuração traumática corado em HE	72
Figura 17-	Imagens de cortes histológicos de MT após sete dias de perfuração traumática corado em HE	73
Figura 18-	Imagens de cortes histológicos de MT após cinco dias de perfuração traumática com coloração <i>PicroSirius Red</i> (PSR)....	75
Figura 19-	Imagens de cortes histológicos de MT com coloração <i>PicroSirius Red</i> (PSR). (A, B, C e D) grupo Insulina após cinco dias de perfuração	76
Figuras 20-	Cortes histológicos com marcação Imuno-histoquímica para anticorpo anti-panqueratina e contra-coloração com Hematoxilina	78
Figuras 21-	Cortes histológicos com marcação Imuno-histoquímica para anticorpo anti-alfa actina de músculo liso e contra-coloração com Hematoxilina	80
Figura 22-	Cortes histológicos com marcação imuno-histoquímica para anticorpo anti-fator de von Willebrand e contra-coloração com Hematoxilina	82
Figura 23-	Representação gráfica da espessura epitelial (μm) ao longo do tempo (Dias) (# indica $p \leq 0,01$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).....	84

Figura 24-	Representação gráfica da espessura fibrosa (μm) ao longo do tempo (Dias) (# indica $p \leq 0,01$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).....	85
Figura 25-	Representação gráfica da espessura mucosa (μm) ao longo do tempo (Dias) (# indica $p \leq 0,01$ e {} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo)	86
Figura 26-	Representação gráfica das perfurações timpânicas (μm) ao longo do tempo (Dias) (# indica $p \leq 0,01$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).....	87
Figura 27-	Representação gráfica das áreas das MTs (μm^2) ao longo do tempo (Dias)	88
Figura 28-	Representação gráfica dos perímetros das MTs (μm) do tempo (Dias) ({} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).....	90
Figura 29-	Representação gráfica da porcentagem de área de birrefringência do colágeno (%) ao longo do tempo (Dias). Porcentagem de área de birrefringência do colágeno correspondeu à razão da área ocupada pelo colágeno total e a área total da MT (# indica $p \leq 0,01$ e {} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo)	91
Figura 30-	Representação gráfica da porcentagem da birrefringência de tonalidade <i>red</i> , <i>orange</i> , <i>yellow</i> e <i>green</i> (vermelho, laranja, amarelo e verde) do colágeno tecidual (%) ao longo do tempo (Dias). A porcentagem de birrefringência de cada tonalidade correspondeu à divisão do número de pixels de cada área correspondente a cada variação de cores pelo total de pixels de colágeno tecidual avaliado em cada MT ({} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).....	93
Figura 31-	Representação gráfica da porcentagem de área corada com cromógeno DAB identificando o anticorpo primário anti-panqueratina (%) ao longo do tempo (Dias). A porcentagem de área corada com DAB foi calculada dividindo a área da MT corada com DAB dividida pela área total da MT. (# indica $p \leq 0,01$ e {} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).....	95
Figura 32-	Representação gráfica da porcentagem de área corada com cromógeno DAB identificando o anticorpo primário anti-alfa-actina de músculo liso (%) ao longo do tempo (Dias). A porcentagem de área corada com DAB foi calculada	

	dividindo a área da MT corada com DAB dividida pela área total da MT ({} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).....	96
Figura 33-	Representação gráfica da porcentagem de área corada com cromógeno DAB identificando o anticorpo primário anti-fator de von Willebrand (%) ao longo do tempo (Dias). A porcentagem de área corada com DAB foi calculada dividindo a área da MT corada com DAB dividida pela área total da MT	97

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

®-	Marca registrada
µm-	Micrômetro
ABNT-	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Akt-	Serina/treonina quinase (do inglês <i>serine-threonine kinase</i>)
ANVISA-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
bFGF-	Fator de crescimento de fibroblasto básico (do inglês <i>basic Fibroblast Growth Factor</i>)
BSA-	Albumina de soro bovino (do inglês <i>Bovine serum albumin</i>)
Da-	Dalton
DAB-	Diaminobenzidina
EDTA-	Etileno diamino tetra acetato
EGF-	fator de crescimento Epidérmico (do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i>)
ELISA-	Teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos e antígenos específicos (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EUA-	Estados Unidos da América
FDA-	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF-	Fator de crescimento de Fibroblasto (do inglês <i>Fibroblast Growth Factor</i>)
FvW-	Fator de von Willebrand
GCon-	Grupo Controle
GH-	hormônio de crescimento (do inglês <i>Growth Hormone</i>)
GIns-	Grupo Insulina
GInsLat-	Grupo Insulina mais Látex
GLat-	Grupo Látex

Grb2-	Proteína 2 ligante do receptor para fator de crescimento (do inglês <i>growth-factor-receptor-bound protein 2</i>)
HE-	Hematoxilina-eosina
HRP-	Peroxidase de rábano (do inglês <i>Horseradish Peroxidase</i>)
IGF-	Fator de crescimento insulina-símile (do inglês <i>Insulin-like Growth Factor</i>)
IGF-I-	Fator de crescimento insulina-símile-I (do inglês <i>Insulin-like Growth Factor-I</i>)
IGF-II-	Fator de crescimento insulina-símile-II (do inglês <i>Insulin-like Growth Factor-II</i>)
IHQ-	Imuno-histoquímica
IL-	Interleucina
IR-	Receptor da insulina
IRS 1-	Substrato 1 do receptor de insulina (do inglês <i>insulin receptor substrate 1</i>)
IRS 2-	Substrato 2 do receptor de insulina (do inglês <i>insulin receptor substrate 2</i>)
MAPK-	Quinase ativadora da atividade mitogênica (do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
mm-	Milímetro
MT-	Membrana Timpânica
NaOH-	Hidróxido de sódio
p-	Proporção, representação da significância estatística
PBS-	Solução de fosfato tamponada (do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PDGF-	Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês <i>Platelet Growth Derived Factor</i>)
PI 3-kinase-	Fosfatidil inositol 3- quinase

PLGA-	Ácido poliláctico glicol, substância utilizada para confecção de microesferas como matriz de liberação lenta
PSR-	Coloração <i>PicroSirius Red</i>
Raf-	Quinase serina-treonina ativada pelo Ras
Ras-	Membro da família de proteínas ligantes de GTP
RGB-	Vermelho, verde e azul (do inglês <i>Red, Green, Blue</i>)
Shc-	Molécula adaptadora e substrato do receptor de insulina
SOS-	Fator de troca guanina nucleotídeo para o Ras
SUS-	Sistema Único de Saúde
TGF-	Fator de crescimento de transformação (do inglês <i>Transforming Growth Factor</i>)
TGF-β-	Fator de crescimento de transformação beta (do inglês <i>Transforming Growth Factor-Beta</i>)
U-	Unidade internacional, medida padronizada
VEGF/ VEGFR-	Fator de crescimento vascular endotelial/ receptor do fator de crescimento vascular endotelial (do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor/ Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1. Anatomia e Histologia da Membrana Timpânica	29
2.1.1. <i>Pars tensa</i>	30
2.1.2. <i>Pars flaccida</i>	31
2.2. Etiologia e Epidemiologia das Perfurações de MT	31
2.3. Cicatrização	32
2.3.1. Fase inflamatória ou exsudativa	33
2.3.2. Fase proliferativa	34
2.3.3. Fase de remodelação	36
2.4. Fatores de Crescimento	37
2.5. Fatores de Crescimento da Família Insulina-Símile	37
2.5.1. Insulina	39
2.5.2. Receptor de insulina	40
2.6. Biomembrana de Látex Natural	43
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1. Processamento Histológico e Coloração De Rotina	51
4.1.1. Coloração com hematoxilina e eosina	52
4.1.2. Coloração com <i>Picrosirius Red</i>	52
4.1.3. Avaliação imuno-histoquímica	52
4.2. Microscopia	53
4.2.1. Análise Morfométrica	53
4.2.2. Análise computadorizada do colágeno de imagens com coloração de <i>picrosirius red</i> sob luz polarizada	58
4.2.3. Análise computadorizada de imagens com coloração imuno-histoquímica	59
4.3. Análise Estatística	61
5. RESULTADOS	62
5.1. Coloração Hematoxilina e Eosina	63
5.1.1. Três dias após perfuração traumática de MT	63
5.1.1.1. <i>Grupo controle</i>	63
5.1.1.2. <i>Grupos experimentais três dias</i>	65
5.1.2. Cinco dias após perfuração traumática de MT	67
5.1.2.1. <i>Grupo Controle</i>	67
5.1.2.2. <i>Grupos experimentais cinco dias</i>	69
5.1.3. Sete dias após perfuração traumática de MT	70
5.1.3.1. <i>Grupo Controle</i>	70
5.1.3.2. <i>Grupos experimentais sete dias</i>	72
5.2. Coloração com <i>Picrosirius Red</i>	74
5.3. Avaliação Imuno-histoquímica	77

5.3.1. Anticorpo anti-panqueratina	77
5.3.2. Anticorpo anti-alfa-actina de músculo liso	79
5.3.3. Anticorpo anti-fator de von Willebrand	81
5.4. Análise Morfométrica	83
5.4.1. Espessura da camada epitelial externa	83
5.4.2. Espessura da camada fibrosa.....	84
5.4.3. Espessura da camada mucosa.....	85
5.4.4. Medida linear da perfuração da MT	86
5.4.5. Medida das áreas das MTs.....	88
5.4.6. Medida dos perímetros das MTs.....	89
5.5. Análise Computadorizada do Colágeno de Imagens com Coloração de <i>Picrosirius Red</i> sob Luz Polarizada	90
5.5.1. Avaliação da birrefringência do colágeno tecidual	90
5.5.2. Distribuição da birrefringência do colágeno tecidual conforme as tonalidades <i>red, orange, yellow e green</i> (vermelho, laranja, amarelo e verde)	91
5.6. Análise Computadorizada de Imagens com Coloração Imuno-histoquímica	94
5.6.1. Avaliação da porcentagem do anticorpo anti-panqueratina.....	94
5.6.2. Avaliação da porcentagem do anticorpo anti-alfa-actina de músculo liso	95
5.6.3. Avaliação da porcentagem do anticorpo anti-fator de von Willebrand.....	96
 6. DISCUSSÃO	 98
 7. CONCLUSÃO	 118
 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 120
 9. APÊNDICES	 142
 10. ANEXO	 163

ANEXO DE PUBLICAÇÃO

1- INTRODUÇÃO

O conceito de reparo de perfuração de membrana timpânica (MT) é um tema que permeia o universo de estudo dos Otorrinolaringologistas desde o século XIX. É atribuída a Berthold, em 1878, a primeira descrição de uso de enxerto de pele no reparo de MT. Berthold¹ (1878, apud MUDRY, 2008) propôs o termo Miringoplastia para descrever este procedimento cirúrgico limitado à intervenção apenas da MT, sem a exploração da cadeia ossicular ou da orelha média.

Até metade do século XX, os procedimentos de miringoplastias não foram vastamente disseminados devido à dificuldade técnica de realizá-los em face ao aparato precário de iluminação e visualização da época, ocasionando resultados pouco animadores. Com o advento do microscópio binocular e sua utilização na cirurgia otológica, associado com melhoria da qualidade das lentes e da iluminação, houve avanço nas técnicas cirúrgicas a partir da segunda metade do século XX (NOGUEIRA JÚNIOR et al., 2007).

Wullstein² (1952, apud MUDRY, 2008), descreveu a técnica cirúrgica de Timpanoplastia tipo I nos casos de perfurações timpânicas em que a orelha média se encontrava praticamente normal e era observada a integridade da cadeia ossicular durante sua exploração. Nesses casos, a intervenção cirúrgica efetivamente se limitava à reconstituição da MT, promovendo a proteção da janela redonda e da rampa timpânica, e transmissão sonora adequada através da cadeia ossicular até a janela oval e rampa vestibular (COSTA et al., 2000; MUDRY, 2008; TOMITA; KÓS; RODRIGUES, 2003; WULLSTEIN, 1956).

As técnicas cirúrgicas de timpanoplastias continuaram sendo aperfeiçoadas com o objetivo de atingir resultados cada vez melhores com relação à cicatrização da MT e também à melhora auditiva. Mesmo com os avanços nos resultados cirúrgicos, as timpanoplastias ainda apresentam índices de falhas que variam de 8 a 30%, dependendo do tamanho e da localização da perfuração, da experiência do cirurgião, da idade do paciente, a patência da tuba auditiva e do número de procedimentos a que a orelha fora

¹ BERTHOLD, E. About myringoplasty. **Wien Med Blätter**, v. 26, p. 627-639, 1878.

² WULLSTEIN, H. L. Functional middle ear surgery with the aid of free graft. **Arch Ohr- Nas- Kehlkopfheilk**, v. 161, p. 422-435, 1952.

previamente submetida (CHANDRASEKHAR; HOUSE; DEVGAN, 1995; PODOSHIN et al., 1996; RIZER, 1997).

As técnicas cirúrgicas clássicas apresentam custos hospitalares de internação que oneram a saúde pública e privada; custos de formação e tempo de aperfeiçoamento de habilidade cirúrgica pelo médico Otorrinolaringologista (MILLS; LEE, 2003; VARTIAINEN, 1998; WANG et al., 2009); riscos cirúrgicos e anestésicos, que podem impossibilitar que alguns pacientes com comorbidades mais graves possam ser submetidos a tais procedimentos eletivos.

Paralelamente, no campo da pesquisa básica, os estudos avançaram no conhecimento de anatomia e ultraestrutura da MT de modelos animais e de humanos, bem como no entendimento de parte dos mecanismos espontâneos de cicatrização do tímpano (LIM, 1970; LITTON, 1968; REIJNEN; KUIJPERS, 1971; SPANDOW; HELLSTROM; DAHLSTROM, 1996). Do final do século XX até os dias atuais, houve uma tendência na busca por substâncias reguladoras que pudessem otimizar o processo de cicatrização, pleiteando também minimizar a abordagem terapêutica e cirúrgica, com procedimentos mais simples, menos onerosos e que acelerem a cicatrização de forma madura, segura e eficaz (OLIVEIRA et al., 2003).

Com a identificação de parte dos mecanismos de ação e o conhecimento das técnicas de fabricação de biologia molecular para sua obtenção, os fatores de crescimento passaram a ser empregados em pesquisas envolvendo mecanismos de cicatrização de diferentes tecidos. (HOM; SUN; ELLURU, 2009; LYNCH; COLVIN; ANTONIADES, 1989; STEED, 1997). Os fatores de crescimento envolvidos no processo de cicatrização podem ser divididos em categorias, dentre elas: fatores de crescimento epidérmicos (EGF); fatores de crescimento de fibroblastos (FGF); fatores de crescimento de transformação (TGF); fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF); fatores de crescimento insulina-símile (IGF) e interleucinas (IL) (HOM, 1995).

Seguindo essa tendência, observaram-se pesquisas de modelos experimentais de perfurações agudas e crônicas de membranas timpânicas em

animais com a aplicação de fatores de crescimento e análise do seu papel no processo de cicatrização (OLIVEIRA; BERNAL, 2003). O EGF foi utilizado em perfurações crônicas em chinchilas, levando à hiperplasia das três camadas de MT (AMOILS; JACKLER; LUSTIG, 1992; DVORAK et al., 1995). O bFGF foi responsável por aumentar a espessura de lâmina própria em perfurações agudas de cobaias (CHAUVIN et al., 1999) e de ratos (MONDAIN; RYAN, 1993). O PDGF-AA provocou proeminente hiperplasia da lâmina própria em perfurações timpânicas agudas de ratos (YEO et al., 2000). O TGF- β 1 foi detectado em maior quantidade nas margens fibróticas de perfurações crônicas de pacientes submetidos a miringoplastias, quando comparadas com MTs normais de humanos, sendo especulado o papel do TGF- β 1 associado à cicatriz fibrótica não organizada na margem da perfuração (SOMERS et al., 1998). Por outro lado, o uso tópico de TGF- β 1 em perfurações traumáticas de MTs de ratos não causou disfunção da cicatrização dessas perfurações, não permitindo fazer associação direta do efeito do TGF- β 1 como causador de perfurações crônicas em ratos (KAFTAN et al., 2006).

Poucos estudos envolvendo a família dos fatores de crescimento insulina-símile foram verificados em modelos experimentais de cicatrização de MT. Essa família é formada por insulina e pelos IGF-I e IGF-II (BLUNDELL; HUMBEL, 1980). Os IGFs são hormônios peptídeos circulantes que podem agir como fatores de crescimento de forma parácrina e/ ou autócrina no crescimento e desenvolvimento de vertebrados (ELLSWORTH; HEWETT-EMMETT; LI, 1994).

A insulina é um hormônio que regula a homeostase da glicose e as funções de absorção de nutrientes, bem como a síntese de glicogênio, de lipídios, de determinados aminoácidos e de proteínas (ELLSWORTH; HEWETT-EMMETT; LI, 1994). Uma revisão de literatura demonstrou que esse hormônio também foi estudado como promotor do processo de cicatrização em cultura de células *in vitro* (HANAM; SINGLETON; RUDEK, 1983; LIU et al, 2009; STRAUS, 1984), em modelos animais (APIKOGLUS-RABUS et al., 2010; LIMA et al., 2012; LIU et al., 2009; PELEGRINELLI, 2002) e em humanos (GREENWAY; FILLER; GREENWAY, 1999; LIMA et al., 2012; PAUL, 1966;

WILSON et al., 2008), tanto com uso tópico quanto injetável. Tais estudos reforçam a possibilidade de que a insulina pode atuar como fator de crescimento pertencente à família insulina-símile na cicatrização tecidual (LIU et al., 2009). A insulina regular utilizada topicamente em modelo experimental de perfuração traumática de MT promoveu o aumento da atividade fibroblástica e da produção do colágeno no processo de cicatrização de MT de cobaias (EKEN et al., 2007).

Outra linha de pesquisa envolvendo abordagem minimamente invasiva e ambulatorial de Miringoplastia está associada ao uso de implantes transitórios sobre perfurações timpânicas com o propósito de servir de suporte vetorial temporário para regeneração do tímpano (GOLZ, et al., 2003). Dentre esses materiais, houve utilização de implante de papel, derivado de arroz (GOLZ, et al., 2003); biomembrana de látex natural, derivado da seringueira *Hevea brasiliensis* (OLIVEIRA, et al., 2003); bioimplante derivado do bicho da seda, *Bombyx mori* (KIM et al., 2010).

Uma revisão de literatura apontou que a biomembrana de látex, da seringueira *Hevea brasiliensis*, atuou como indutor de cicatrização em diferentes tecidos (ANDRADE, 2007; BRANDÃO, 2006; FRADE, 2003; MRUÉ, 1996, 2000). Estudos preliminares retrospectivos sugerem maior vascularização dos enxertos de membranas timpânicas quando utilizada membrana de látex natural como implante transitório em Miringoplastias (OLIVEIRA et al., 2003).

O propósito deste estudo foi associar o uso tópico de uma substância reguladora do processo de cicatrização com o método ambulatorial de implante transitório, e verificar o papel de cada elemento, isoladamente e em associação, no processo cicatricial de perfurações agudas de membranas timpânicas. Os objetivos deste estudo são, portanto, determinar os efeitos do uso da insulina e da biomembrana de látex natural, como implante transitório, de forma isolada e em associação, no processo cicatricial de perfurações traumáticas de MT.

O uso de um fator de crescimento associado a um implante transitório foi utilizado previamente por Hakuba et al. (2003), quando foi proposto o uso

combinado de bFGF com uma membrana composta por colágeno e silicone. Este ensaio clínico foi realizado em nove pessoas adultas que apresentavam perfuração crônica de MT, obtendo resultado efetivo no tratamento conservador de MT perfurada. Tal estudo foi ampliado para 87 pacientes, atingindo o fechamento completo das perfurações timpânicas em 80 pacientes (92%), sendo a combinação de bFGF com atelocolágeno considerada efetiva no tratamento conservador de perfurações de MT (HAKUBA et al., 2010).

Após revisão de literatura, não foram encontrados trabalhos prévios que estudassem os efeitos da utilização de insulina e da biomembrana de látex natural, derivado da seringueira *Hevea brasiliensis*, em associação, no processo cicatricial de tecidos animais em geral e, conseqüentemente, nem em modelo experimental de perfurações de membranas timpânicas.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomia e Histologia da Membrana Timpânica

A MT é a estrutura anatômica que separa a orelha externa da orelha média e apresenta disposição côncava. O centro da concavidade é referido como umbus, que corresponde ao ponto de contato com o manúbrio do martelo (WENIG; MICHAELS, 2007).

Macroscopicamente, é formada por duas partes (ou *pars*): a *pars tensa* e a *pars flaccida* (ou membrana de Schrapnell). A delimitação da parte flácida é fornecida pelos ligamentos timpanomaleolares anterior e posterior, que se dirigem do processo lateral do martelo para o anel timpânico, determinando o formato triangular da membrana de Schrapnell. No exame otoscópico, a área onde ocorre o reflexo de luz na porção anterior da membrana é conhecido como “cone de luz” (WENIG; MICHAELS, 2007) (Figura 1).

Figura 1: Visão esquemática macroscópica da membrana timpânica. (Adaptada de Wenig; Michaels, 2007).

2.1.1. *Pars tensa*

A parte tensa da MT é de natureza fibroelástica, constituída por três camadas: a externa, de origem ectodérmica epitelial; a média ou lâmina própria, de origem mesodérmica, constituída por um sistema de fibras colágenas que confere à MT suas características vibratórias especiais; e a interna, de origem endodérmica, formada pela mucosa da orelha média (NÓBREGA, 2003) (Figura 2).

Figura 2: Desenho esquemático histológico da secção transversal da MT de macacos. (Adaptado de Lim, 1968).

A camada externa é formada por tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado (LIM, 1995; SANTA MARIA et al., 2010; STENFELDT; JOHANSSON; HELLSTROM, 2006; WENIG; MICHAELS, 2007).

Na MT, a camada epitelial externa apresenta a expressão de citoqueratinas, uma família de polipeptídeos, cuja marcação imunocitoquímica pode ser usada para identificar essa camada celular epitelial de forma específica (ANANDACOOMARASWAMY et al., 2006).

A camada média ou lâmina própria é formada por tecido conjuntivo frouxo subepitelial; tecido conjuntivo denso organizado e conjuntivo frouxo submucoso. O tecido conjuntivo frouxo subepidérmico e submucoso é composto de fibras colágenas frouxamente organizadas, fibroblastos, fibras nervosas e capilares sanguíneos. O tecido conjuntivo denso é formado por fibras colágenas de arranjo radial mais externamente e fibras colágenas de arranjo circular mais internamente (LIM, 1968; SANTA MARIA et al., 2010; STENFELDT; JOHANSSON; HELLSTROM, 2006; WENIG; MICHAELS, 2007). As fibras colágenas são espessas na margem da MT para formar um anel fibrocartilaginoso, que é o ânulus fibrocartilaginoso da MT, que a adere ao *sulcus* timpânico do osso temporal (WENIG; MICHAELS, 2007).

A camada interna é formada por tecido epitelial colunar simples, que é continuidade do tecido epitelial da orelha média (WENIG; MICHAELS, 2007).

2.1.2. *Pars flaccida*

A *pars flaccida* é composta por três camadas, incluindo duas epiteliais, uma externa e outra interna, e uma camada média com tecido conjuntivo entre elas (LIM, 1995; SANTA MARIA et al., 2010). A *pars flaccida* é similar à *pars tensa*, exceto pela maior proporção de fibras elásticas e menor organização do tecido conjuntivo na primeira (LIM, 1995; SANTA MARIA et al., 2010).

2.2. Etiologia e Epidemiologia das Perfurações de MT

As perfurações de MT apresentam como causas principais as otites médias e os traumas (GLADSTONE; JACKLER; VARAV, 1995). Apesar de a incidência exata de perfurações de MT devido a infecções ser incerta, o número de rupturas traumáticas de MT é estimado de 1,4 a 8,6 por 100.000 pessoas (GRIFFIN, 1979; KRISTENSEN et al., 1989).

Perfurações associadas a otites médias não complicadas são geralmente pequenas. Perfurações amplas podem resultar de infecções por organismos necrotizantes como *Streptococcus* beta-hemolítico (GLADSTONE; JACKLER; VARAV, 1995).

Os traumas podem ser ocasionados por objetos sólidos penetrantes, barotraumas, explosões, queimaduras térmicas ou químicas, iatrogênicos, como tubos de ventilação de longa duração. Perfurações traumáticas de MT apresentam taxa de 78,7% de cicatrização, conforme meta-análise de 760 casos envolvendo variações de pressões aéreas, calor, corrosivos, sólidos e variações de pressões aquáticas (KRISTENSEN, 1992). Quando são excluídas rupturas timpânicas induzidas por explosão, cerca de 88% das perfurações traumáticas cicatrizaram espontaneamente (KRISTENSEN et al., 1989). Já foi estabelecido na literatura que perfurações induzidas pelo calor ou agentes corrosivos têm incidências menores de cicatrização, por efeitos termocoagulativos lesando a vascularização da MT, levando à necrose tecidual e atraso da cicatrização (GRIFFIN, 1979; KRISTENSEN, 1992). Os fatores que previnem reparo adequado de MT nas outras situações traumáticas, e na ausência de infecção, ainda não estão completamente definidos.

2.3. Cicatrização

A cicatrização da MT está tipicamente descrita em três fases distintas, mas temporalmente superpostas: inflamatória ou exsudativa, proliferativa e remodelação (KOOPMANN, 1995; SANTA MARIA et al., 2010) (Figura 3); ou quatro fases, quando se considera a hemostasia como fase distinta da inflamatória (GLADSTONE; JACKLER; VARAV, 1995).

Figura 3. Distribuição celular ao longo do tempo durante as fases de cicatrização tecidual. (Adaptada de Witte; Barbul, 1997).

2.3.1. Fase inflamatória ou exsudativa

A fase inflamatória ou exsudativa se inicia imediatamente após a injúria tecidual e dura por alguns dias. Essa fase é composta por desarranjo dos vasos sanguíneos, com aumento da permeabilidade vascular, com extravasamento de proteínas séricas, plaquetas e fatores de coagulação (KOOPMANN, 1995).

O processo de hemostasia e formação do coágulo se inicia logo após a injúria vascular, onde as plaquetas entram em contato com os constituintes da matriz extracelular, dentre eles o colágeno, os proteoglicanos, a fibronectina. O processo de adesão plaquetária é mediada por fator de von Willebrand (FvW), que é um cofator essencial para adesão plaquetária ao colágeno e a outras superfícies, levando à ativação plaquetária. Após a agregação plaquetária, há ativação da cascata intrínseca de coagulação, que corresponde a uma série de conversões de proenzimas inativas em enzimas ativadas, culminando na formação de trombina. A trombina, por sua vez, converte o fibrinogênio solúvel

do plasma em fibrina, que estabiliza e ancora o trombo formado (MITCHELL; COTRAN, 1999).

Após 5 ou 6 horas da injúria tecidual, os neutrófilos polimorfonucleares são recrutados até a ferida, enquanto os monócitos passam a ser recrutados com 24 a 48 horas (Figura 3). No local da lesão, os monócitos diferenciam-se em macrófagos. Os neutrófilos polimorfonucleares atuam contra a contaminação bacteriana da ferida. Os macrófagos fagocitam bactérias e neutrófilos e liberam substâncias responsáveis pela remoção de debris teciduais, além da liberação de fatores de crescimento, como TGF- β , IL, PDGF, IGF, FGF, entre outros, responsáveis por regulação da síntese da matriz extracelular, angiogênese e fibroplasia. (KOOPMANN, 1995; NATHAN, 1987; WITTE; BARBUL, 1997). A fase inflamatória pode, então, ser dividida em fase aguda, rica em neutrófilos e fase tardia, rica em células mononucleares: macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Os neutrófilos polimorfonucleares estão presentes por tempo relativamente curto, enquanto o infiltrado mononuclear permanece mais tempo no tecido e exerce papel de transição entre as fases inflamatória e proliferativa (KOOPMANN, 1995).

2.3.2. Fase proliferativa

A fase proliferativa é classicamente caracterizada por proliferação de fibroblastos, com deposição de colágeno; por angiogênese, com formação do tecido de granulação; e pela proliferação epitelial (PICCINATO; COUTINHO NETTO; CHERRI, 2003).

Os fibroblastos são ativados e sofrem estímulos às atividades proliferativas e sintéticas, produzindo, inicialmente, grandes quantidades de fibronectina, dentre outros componentes da matriz extracelular, como colágeno, elastina e glicosaminoglicanos (PICCINATO; COUTINHO NETTO; CHERRI, 2003).

A angiogênese é um importante evento no processo cicatricial, sendo fundamental para o suprimento sanguíneo dos mais variados eventos metabólicos que ocorrem simultaneamente no tecido cicatricial. Nos processos habituais de cicatrização do tecido cutâneo, por exemplo, a vasculatura

compreende a cerca de 60% do tecido de reparo. Daí o nome de tecido de granulação, que deriva da proeminência dos vasos na lesão em cicatrização (PICCINATO; COUTINHO NETTO; CHERRI, 2003).

A cicatrização da MT ocorre de maneira convencional nos primeiros estágios de hemostasia e inflamação. Suas fases proliferativas e migratórias são peculiares e diferentes dos outros tecidos. No processo de cicatrização do tecido cutâneo, por exemplo, um leito de tecido de granulação se forma e serve como plataforma sobre a qual ocorrerá a reepitelização (GLADSTONE; JACKLER; VARAV, 1995; KOOPMANN, 1995). A MT tem uma característica especial de cicatrização, por ser a única membrana do organismo humano suspensa entre dois meios aéreos, entre as orelhas externa e média. As células reparadoras precisam formar uma ponte tecidual que cubra a perfuração, porém não há um arcabouço tecidual de sustentação previamente formado sobre o qual ocorra a migração tecidual (SANTA MARIA et al., 2010; TAYLOR; McMINN, 1967).

Em alguns estudos histológicos envolvendo cicatrização de MT, é apontado que a membrana realmente cicatriza em uma sequência similar aos outros tecidos, com proliferação fibrosa precedendo regeneração da camada epitelial. (McMINN; TAYLOR, 1966; TAYLOR; McMINN, 1967). Por outro lado, estudos subsequentes descrevem que a cicatrização da membrana timpânica ocorre de maneira peculiar: o tecido epitelial da camada externa da MT seria o tecido responsável pelo fechamento da perfuração timpânica inicialmente, com a formação de uma ponte epitelial sobre a perfuração, e somente após, haveria o restabelecimento do tecido fibroso da camada média (AMOILS; JACKLER; LUSTIG, 1992; GLADSTONE; JACKLER; VARAV, 1995; JOHNSON; HAWKE, 1987; JOHNSON; SMALLMAN; KENT, 1990; REIJNEN; KUIJPERS, 1971).

Outra característica peculiar da MT é que a camada epitelial externa se encontra em um estado de movimento fisiológico contínuo (JOHNSON; HAWKE, 1987). Os estratos mais superficiais da camada epitelial externa sofrem uma migração centrífuga a partir do *umbus* em direção ao meato auditivo externo (KOBAYASHI, 1995; LITTON, 1963; SPRATLEY, 2003). Alguns estudos com marcadores celulares defendem a existência de centros

germinativos epiteliais com alto índice mitótico, ao nível do *umbus* e também do *annulus* timpânico, os quais estariam implicados no fenômeno migratório (KOBAYASHI, 1995; LITTON, 1968). Aparentemente, estes mesmos centros assumem uma elevada importância nos fenômenos regenerativos da MT após agressão, como no reparo habitual de perfurações (SPRATLEY, 2003). Contudo, os eventos que regulam a migração celular e os eventos cicatriciais ainda não se encontram totalmente elucidados (SPRATLEY, 2003).

2.3.3. Fase de remodelação

A fase de remodelação tecidual, ou terceira fase da cicatrização, se inicia, em média, com duas ou três semanas após injúria tecidual.

A camada epitelial externa que apresenta cerca de duas a três fileiras de células com duas semanas após injúria tecidual (SANTA MARIA et al. 2010), tende a se tornar gradativamente mais fina, tornando-se com uma a duas fileiras de células após três semanas da injúria tecidual (McMINN; TAYLOR, 1966).

Na lâmina própria, a fase de remodelação é caracterizada por redução no número de fibroblastos, de macrófagos e da vascularização. (KOOPMANN, 1995). A fibronectina é eliminada da matriz do tecido cicatricial, ao mesmo tempo em que o colágeno tipo I e tipo III se acumulam (STENFELDT; JOHANSSON; HELLSTROM, 2006). Os fibroblastos presentes no tecido de granulação passam por mudanças ultraestruturais e bioquímicas e passam a ter características semelhantes às células musculares lisas, denominadas de miofibroblastos. Os miofibroblastos produzem a proteína α -actina de músculo liso e possuem características contráteis, importantes no processo de cicatrização tecidual (LORENA et al., 2002).

A camada mucosa da orelha média tende a retomar seu aspecto habitual na fase de remodelação (JOHNSON; SMALLMAN; KENT, 1990).

2.4. Fatores de Crescimento

A cicatrização é um processo biológico complexo, regulado, na sua maior parte, por moléculas sinalizadoras de natureza protéica, denominadas fatores de crescimento. Os fatores de crescimento agem de forma parácrina ou autócrina, regulando diretamente muitos dos processos cruciais da cicatrização tecidual, incluindo migração quimiotática de células inflamatórias, mitoses de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais vasculares, neovascularização, além da síntese e degradação dos componentes da matriz extracelular (MA; ZHAO; ZHOU, 2002).

A liberação dos fatores de crescimento ocorre pelas células lesadas na injúria tecidual, pelas plaquetas, pelos macrófagos, pelos linfócitos, pelos fibroblastos, pelas células endoteliais e pelos queratinócitos, de forma coordenada, com o propósito de regular os eventos celulares e moleculares do processo de cicatrização, que assegurem os mecanismos de epitelização, angiogênese e formação de colágeno e da matriz extracelular (HOM, 1995; MA; ZHAO; ZHOU, 2002).

2.5. Fatores de Crescimento da Família Insulina-Símile

A família de ligantes e receptores insulina/insulina-símile controlam aspectos chaves na vida dos mamíferos, incluindo crescimento, metabolismo e reprodução (NAKAE; KIDO; ACCILI, 2001). Da homologia da sequência de aminoácidos e da conhecida distribuição dessas proteínas no mundo animal, insulina e IGFs são, provavelmente, originados de um gene ancestral comum em estágios precoces da evolução dos vertebrados (ELLSWORTH; HEWETT-EMMETT; LI, 1994) (Figura 4).

A insulina foi descoberta na década de 20 do século passado, quando Frederick Banting e Charles Best, no laboratório do fisiologista JJR MacLeod, isolaram a molécula de insulina de pâncreas de cães (PIRES; CHACRA, 2008).

Os peptídeos denominados como insulina-símile foram previamente chamados de somatomedinas por Daughaday et al. (1972), quando estudavam

incorporação de sulfato em proteoglicanos de cartilagens em resposta ao hormônio de crescimento (GH) (VAN DEN BRANDE, 1999). O conceito de que esses peptídeos poderiam compartilhar homologia estrutural e funcional com a insulina foi emergindo a partir das observações de Hintz e Clemmons (1972), que relataram que a somatomedina-C competia com a insulina no processo de ligação com o receptor de insulina em membranas celulares. A designação IGF foi utilizada pela primeira vez por Rinderknecht e Humbel (1976), que isolaram polipeptídeos do grupo das somatomedinas e determinaram sua sequência de aminoácidos, estabelecendo sua inequívoca relação com a insulina (BLUNDELL; HUMBEL, 1980) (Figura 4).

Figura 4: Diagrama esquemático mostrando as cadeias moleculares da insulina, pró-insulina, IGF-I, IGF-II e relaxina. (Modificado de Blundell; Humbel, 1980).

2.5.1. Insulina

A insulina é um hormônio produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas. A insulina é uma proteína de 51 aminoácidos de peso molecular de 5808 Daltons, composta por duas cadeias de aminoácidos, conectadas uma à outra por pontes dissulfeto. Quando as duas cadeias de aminoácidos são separadas, perde-se a atividade funcional da molécula de insulina (GUYTON; HALL, 2002).

A insulina tem papel importante no metabolismo energético do organismo, atuando como hormônio de efeito anabólico, tais como: transporte transmembrana de glicose e aminoácidos, formação de glicogênio no fígado e músculos esqueléticos, conversão de glicose em triglicérides, síntese de ácido nucléico e síntese de proteína. Secretada pelas células β do pâncreas em resposta ao aumento dos níveis de glicose, a insulina acelera o aumento da captação da glicose em tecidos alvos como músculo e tecido adiposo; e suprime a liberação hepática de glicose (GUYTON; HALL, 2002; YOUNGREN, 2007).

Além do efeito da insulina no metabolismo energético, uma revisão de literatura aduz que o hormônio da insulina pode influenciar o processo de cicatrização de feridas. Os primeiros estudos do uso de insulina, no processo de cicatrização, remontam à primeira metade do século XX. Stuck (1932) percebeu que o uso de insulina sistêmica em coelhos submetidos a fraturas de tíbia provocou a aceleração do processo de cicatrização óssea, sem necessariamente alterar o tecido ósseo histologicamente.

A insulina pode atuar em tecido epitelial no processo de cicatrização. Liu et al. (2009) mostraram que a insulina, administrada com aplicação tópica, estimulou a migração e proliferação de queratinócitos; que esse papel é independente de EGF; e que a epiderme assume uma morfologia mais madura quando feridas são tratadas com insulina. A insulina tópica acelerou a cicatrização de feridas em pele encurtando o tempo de epitelização, tanto em ratos não-diabéticos quanto nos animais com diabetes (APIKOGLU-RABUS, et al., 2010).

Em tecido de origem mesodérmica, estudos apontam que a insulina estimula incorporação de [^3H] Timidina em culturas de fibroblastos de pele humana *in vitro*, assumindo papel mitogênico (FLIER; USHER; MOSES, 1986). Histologicamente, com o uso de insulina tópica, foi evidenciado aumento no número de fibras colágenas em ratos não-diabéticos comparados com animais controles não-diabéticos (APIKOGLU-RABUS, et al., 2010). A administração subcutânea de insulina provocou aumento de deposição de colágeno na pele de ratos submetida à injúria por queimadura quando comparado com grupo controle (MADIBALLY et al., 2003). A insulina aumentou a atividade fibroblástica e deposição de colágeno quando utilizada topicamente em membranas timpânicas de cobaias (EKEN et al., 2007).

Ainda, quanto aos efeitos sobre tecidos de origem mesodérmica, a insulina estimula a angiogênese. A pele de ratos, após uso de insulina injetável, mostrou vasos sanguíneos maiores e mais ramificados, com maior expressão celular de α -actina de músculo liso, sugerindo diferenciação e maturação apropriada dos novos vasos; e que a insulina aumentou a marcação de CD31, um marcador de células endoteliais (LIU, PETREACA, MARTINS-GREEN, 2009). Foi observado também que a insulina estimula a migração de células endoteliais humanas e sua organização em forma de tubos, e que esses efeitos ocorrem independentemente de sinalização de VEGF/ VEGFR, mas são dependentes de receptores de insulina. (LIU; PETREACA; MARTINS-GREEN, 2009).

2.5.2. Receptor de insulina

A insulina interage com as células através dos receptores de insulina, que são moléculas tetraméricas formadas por duas subunidades alfa-extracelulares que se ligam à insulina, e duas subunidades β transmembrana, que têm atividade celular tirosina quinase (MITCHELL; COTRAN, 1999; YOUNGREN, 2007). Os receptores de insulina e IGF-I, assim como as proteínas receptoras de outros fatores de crescimento como EGF e PDGF, são estreitamente associados com atividades tirosina quinase específicas (STRAUS, 1984).

A ligação da insulina às subunidades α do receptor de insulina resulta na mudança de conformação que induz autofosforilação de resíduos tirosina distintos das subunidades β . Como outros receptores tirosina quinase, a autofosforilação produz uma mudança conformacional que provoca a atividade tirosina quinase da proteína do receptor sobre outras moléculas intermediárias ou substratos celulares, provocando a ativação da cascata de sinalização intracelular (HONGYING; YAN; GISHIZKY, 1998; YOUNGREN, 2007) (Figura 5). Esses substratos fosforilados, incluindo substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), substrato 2 do receptor da insulina (IRS-2), e Shc (proteína adaptadora e substrato do receptor de insulina), servem de moléculas de encaixe que se ligam e ativam quinases celulares, iniciando diferentes caminhos de sinalização celulares que medeiam a ação da insulina (PELEGRINELLI et al., 2001; PELEGRINELLI 2002; PELICCI et al., 1992; WHITE, 1998).

Substratos do receptor de insulina IRS-1 e IRS-2 se ligam à subunidade de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase). A jusante na cascata de sinalização de PI3-quinase, a serina/treonina quinase (Akt) é ativada e sua fosforilação aparece como mecanismo pelo qual ocorre a regulação do transporte de glicose, síntese de proteína e o crescimento celular (BURGERING; COFFER, 1995; LIMA et al., 2012; PELEGRINELLI et al., 2001; PELEGRINELLI, 2002; YOUNGREN, 2007) (Figura 5).

A fosforilação de tirosina da proteína Shc leva a uma associação específica com proteína 2 ligante do receptor para fator de crescimento (Grb2) (SKOLNIK et al., 1993) (Figura 5). Também foi demonstrado que a insulina estimula as proteínas quinases ativadoras da atividade mitogênica (MAPK) (ROBERTS, 1992). E um dos mecanismos que ligam o receptor da insulina à MAPK envolve Shc, Grb2, SOS, Ras, Raf e MAP quinase-quinase (MAPKK) (ARONHEIM et al., 1994; HILL; TREISMAN, 1995; LIMA et al., 2012; PELEGRINELLI et al., 2001; PELEGRINELLI, 2002;) (Figura 5).

Figura 5. Mecanismos de sinalização do receptor de insulina, descrevendo a cascata de mecanismos moleculares relacionados com o transporte de glicose, a síntese de proteína e o crescimento celular. (Modificado de Youngren, 2007).

Pesquisas demonstraram os mecanismos da cascata de sinalização intracelular desencadeados pela ação da insulina sobre seus receptores no transporte de glicose e metabolismo energético em tecidos musculares, hepático e adiposo (PÁEZ-ESPINOSA et al., 1998; PELEGRINELLI et al., 2001; SAAD et al., 1992). Por outro lado, os mecanismos moleculares exatos do efeito na cicatrização induzido pela insulina ainda não foram completamente elucidados.

Evidências sugerem um papel ativo da insulina na pele. Foi mostrado que queratinócitos de epiderme humana expressam receptor de insulina (VERRANDO; ORTONNE, 1985) e que cultura de queratinócitos humanos são dependentes de insulina para o seu crescimento (TSAO; WALTHALL; HAM, 1982). Foram identificados receptores de insulina em cultura de queratinócitos de ratos e a presença de insulina aumentou a expressão de queratina 1 e 10

em processo de diferenciação induzida por cálcio nessas células (WERTHEIMER et al., 2000).

Pelegrielli et al. (2001) mostraram que a estimulação aguda da insulina pode induzir fosforilação do receptor de insulina *in vivo* na pele intacta de ratos. Houve detecção dessa atividade de fosforilação de tirosina kinase em células da epiderme, folículos pilosos e fibroblastos da derme após infusão de insulina endovenosa e detecção em intervalo de tempo de 5 minutos.

Flier; Usher; Moses (1986) descrevem a presença de receptores de insulina em cultura de fibroblastos de pele humana e seu efeito na estimulação da síntese de DNA nessas células.

2.6. Biomembrana de Látex Natural

Desde 1994, vem sendo pesquisado pelo Serviço de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, um material biocompatível, à base de látex natural, extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*. Esse material foi desenvolvido com o intuito de produzir uma prótese biocompatível para substituição esofágica, à base de um composto polimerizado com polilisina 0,1% derivado do látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*. MRUÉ (1996, 2000) evidenciou, em seus estudos, ser esse material um importante indutor de cicatrização de paredes esofágicas lesadas de cães experimentais, além de marcante aumento na vascularização, na epitelização, neoformação glandular submucosa e de fibras musculares neoformadas.

Pesquisas foram realizadas com intuito de analisar o papel da biomembrana de látex no processo de cicatrização em diferentes tecidos animais. Sader et al. (2000) mostraram que a membrana de látex foi satisfatória para a substituição parcial do pericárdio de cães. Pinho et al. (2004) observaram que a biomembrana de látex favoreceu a cicatrização conjuntival e neoangiogênese em reconstrução conjuntival de coelhos. Brandão (2006) mostrou que prótese recoberta com composto derivado do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* foi biocompatível no sistema arterial do cão,

apresentando adequada integração tecidual. Domingos (2008) demonstrou que a membrana de látex natural foi biocompatível para ampliações vesicais em coelhos, estimulando a angiogênese, a produção de colágeno e o crescimento de células musculares lisas.

A biocompatibilidade da membrana de látex no tecido esofágico, sua resistência e elasticidade, associadas à capacidade de promover angiogênese e neoformação tecidual, motivaram a produção de uma biomembrana do mesmo material, sendo que atualmente é utilizada em humanos no tratamento de úlceras dos membros inferiores de diversas etiologias. Frade et al. (2001) e Frade (2003), utilizando a biomembrana de látex clinicamente, notaram aumento significativo do tecido de granulação de úlceras flebopáticas de membros inferiores de pacientes e redução concomitante de dor no tratamento.

Oliveira et al. (2003) utilizaram a biomembrana de látex natural com polilisina a 0,1% como implante transitório em miringoplastias com enxerto de fáscia de músculo temporal. Nesse estudo clínico retrospectivo, envolvendo 238 orelhas com perfuração de membrana timpânica por sequela de otite média crônica, foi verificada a cicatrização completa em 90,5% dos casos, melhorando o processo de revascularização da membrana timpânica remanescente.

Com o intuito de determinar os efeitos do uso da insulina e da biomembrana de látex natural, como implante transitório, de forma isolada e em associação, no processo cicatricial de perfurações traumáticas de MT, foi proposto este estudo.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- 1) Determinar os efeitos do uso da insulina tópica e da biomembrana de látex natural, como implante transitório, de forma isolada e em associação, no processo de cicatrização de perfurações traumáticas de MTs.

Estabelecer a influência dos tratamentos propostos:

- 1) Sobre a proliferação epitelial externa da MT, avaliada por sua espessura e por marcação imuno-histoquímica;
- 2) Sobre a lâmina própria da MT, avaliada por sua espessura fibrosa, pela marcação de miofibroblastos por imuno-histoquímica, pela avaliação semi-quantitativa e qualitativa do colágeno tecidual por microscopia de polarização; e pela análise da vascularização por imuno-histoquímica;
- 3) Sobre a camada mucosa da MT, avaliada por sua espessura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 61 ratos albinos machos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, pesando em média 280 g (variação 270 g a 290 g).

Este estudo experimental esteve de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética de Experimentação Animal (CETEA) em 27/08/2007 - protocolo nº 082/2007 (Anexo).

Para avaliar os efeitos da utilização da insulina e da membrana de látex na cicatrização da MT, foi elaborado um experimento capaz de avaliar o efeito de cada uma dessas variáveis isoladamente; o efeito da associação dessas variáveis e a comparação com o grupo controle, que correspondeu ao grupo em que foi avaliada a cicatrização espontânea da MT ao longo do tempo após perfuração traumática. Os animais foram, portanto, aleatoriamente divididos em quatro grupos: Controle, Insulina, Látex, Insulina+Látex.

Padronizou-se o diâmetro da perfuração das membranas timpânicas com a utilização de agulha de 0,8 mm de diâmetro - agulha BD (Becton Dickinson Ind. Cir. Ltda, Minas Gerais, Brasil) 30x0,8 mm (Figura 6A).

Antes do procedimento, todos os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina intramuscular (40 mg/kg) (Ketamin 50 mg/ml, Laboratório Cristália, São Paulo, Brasil) e hidrocloreto de xylazina (5 mg/kg) intramuscular (Dopaser 20 mg/ml, Hertape Calier, Minas Gerais, Brasil). As orelhas de todos os animais foram examinadas com otomicroscópio DFV MU-M19 (DFV, Rio de Janeiro, Brasil) para descartar otites ou qualquer outro tipo de alteração. Dos 61 animais de estudo, 52 bulas foram excluídas por motivo de infecção, que estava presente antes do procedimento. As MTs incluídas no trabalho estavam íntegras e translúcidas, correspondendo a 70 bulas (Figura 6B).

No Grupo Controle (GCon), composto por 12 animais, as perfurações traumáticas da MT foram realizadas com agulha BD 30x0,8 mm anterior e posteriormente ao cabo do martelo na região da *pars tensa* da MT. Para a avaliação histológica, foram sacrificados três animais após três dias da perfuração timpânica (5 bulas), quatro, após cinco dias (5 bulas) e cinco, após sete dias (5 bulas).

No grupo Insulina (GIns), composto por 19 animais, foram realizadas as perfurações da MT com agulha BD 30x0,8 mm anterior e posteriormente ao cabo do martelo na região da *pars tensa* da MT. As perfurações timpânicas foram tratadas com 15 Unidades de Insulina Humana Regular Novolin® R (100 UI/ml) (Novo Nordisk® Brasil, Minas Gerais, Brasil) uma vez ao dia, diariamente (Figura 6C). Para a avaliação histológica, foram sacrificados cinco animais após três dias da perfuração timpânica (5 bulas), cinco, após cinco dias (5 bulas) e nove, após sete dias (9 bulas).

No grupo Látex (GLat), composto por 14 animais, foram realizadas as perfurações da MT com agulha BD 30x0,8 mm anterior e posteriormente ao cabo do martelo na região da *pars tensa* da MT. Foram confeccionados bioimplantes de 1,2 mm de diâmetro de membrana de látex (Figura 6D). Cada membrana de látex foi apoiada externamente aos bordos da perfuração timpânica recém-criada, isto é, foi posicionado um bioimplante sobre a perfuração anterior ao cabo do martelo e outro sobre a perfuração posterior ao cabo do martelo, sob visão de otomicroscopia (Figuras 6E e 6F). Para a avaliação histológica, foram sacrificados cinco animais após três dias da perfuração timpânica (5 bulas), quatro, após cinco dias (5 bulas) e cinco, após sete dias (7 bulas).

No grupo Insulina+Látex (GInsLat), composto por 16 animais, foram realizadas as perfurações da MT com agulha BD 30x0,8 mm anterior e posteriormente ao cabo do martelo na região da *pars tensa* da MT. Foram confeccionados bioimplantes de 1,2 mm de diâmetro de membrana de látex (Figura 6D). Cada membrana de látex foi apoiada externamente aos bordos da perfuração timpânica recém-criada, isto é, foi posicionado um bioimplante sobre a perfuração anterior ao cabo do martelo e outro sobre a perfuração posterior ao cabo do martelo sob visão de otomicroscopia (Figuras 6E e 6F). As perfurações timpânicas foram tratadas com 15 Unidades de Insulina Humana Regular Novolin® R (100 UI/ml) (Novo Nordisk® Brasil, Minas Gerais, Brasil) uma vez ao dia, diariamente (Figura 6C). Para a avaliação histológica, foram sacrificados cinco animais após três dias da perfuração timpânica (5 bulas), quatro, após cinco dias (5 bulas) e sete, após sete dias (9 bulas).

Figura 6. (A) Agulha 30x0,8 mm; (B) MT de rato sob otomicroscopia; (C) Insulina humana regular; (D) Membrana de látex de 1,2 mm de diâmetro; (E e F) Posicionamento de membrana de látex sobre as perfurações de MT.

4.1. Processamento Histológico e Coloração De Rotina

Os animais foram sacrificados por injeção intraperitoneal com dose excessiva de Tiopental (Thionembutal, Abbot, São Paulo, Brasil).

A bula foi removida do segmento cefálico, com uma tesoura de dissecação, que foi colocada na coluna cervical posteriormente, fazendo-se um corte longitudinal e mediano no crânio. Na sequência, usando as mãos, tendo o conduto auditivo externo como orientação, a bula foi localizada com o dedo polegar e, num movimento de dentro para fora, foi separada das outras estruturas; e com ela presa entre os dedos polegar e indicador, foi sendo torcida num movimento suave para que os tecidos se soltassem e a liberassem (ALBUQUERQUE et al., 2009).

O material coletado foi fixado por 24 horas em formalina 10% diluída em tampão fosfato e, em seguida, descalcificado por imersão em solução aquosa contendo 4,13 g de etileno diamino tetra acetato (EDTA) (Laboratório Merck), NaOH 0,55 g (Laboratório Merck) e água destilada 100 ml. As amostras foram envolvidas em gaze e colocadas no agitador magnético, sendo trocada esta solução em dias alternados. O período de descalcificação das bulas ocorreu em torno de 50 dias. Após descalcificação, as amostras foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina para inclusão em blocos.

Os blocos de parafina foram cortados por micrótomo Leica Jung RM2065 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) em fatias de 6 µm de espessura. Os cortes foram realizados no plano perpendicular ao cabo do martelo. O cabo do martelo foi tomado como referência, visto que se tratava de estrutura fixa e presente em todas as membranas timpânicas, sendo o referencial empregado para nortear o desgaste dos blocos de parafina. Para permitir avaliação histológica da mesma região aproximada em todos os blocos, estes foram desgastados até atingir aproximadamente o mesmo nível em relação ao cabo do martelo.

4.1.1. Coloração com hematoxilina e eosina

Os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em série decrescente de etanol e lavados em água destilada. A seguir, foram corados em Hematoxilina de Harris por 10 minutos, lavados em água corrente, imersos em Eosina por cinco minutos, e novamente lavados em água corrente. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas em Permount (EM Sciences, Pennsylvania, EUA).

4.1.2. Coloração com *PicroSirius Red*

Os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em série decrescente de etanol e lavados em água destilada. A seguir, foram corados com uma solução de 0,1 g de *Picrosirius Red* (PSR) em 100 ml de solução de ácido pícrico saturado de pH 2,0, por vinte minutos, e lavados em água corrente por cinco minutos duas vezes e uma vez em água destilada, seguida da contra-coloração com hematoxilina de Harris por um minuto; após, as lâminas foram lavadas em água corrente uma vez, desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas em Permount (EM Sciences, Pennsylvania, EUA).

4.1.3. Avaliação imuno-histoquímica

Os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em série decrescente de etanol, lavados em água destilada e solução de fosfato tamponada (PBS). Foi inibida a peroxidase endógena com água oxigenada em PBS por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Foi realizada lavagem com água destilada três vezes e com PBS três vezes, cinco minutos cada. Foram incubados em PBS+1% albumina de soro bovino (BSA) por 30 minutos à temperatura ambiente, e com anticorpos primários originários de camundongo anti-panqueratina (1:50) (Abcam, Cambridge, UK) e anti-alfa-actina de músculo liso (1:50) (Abcam, Cambridge, UK); e anticorpo primário originário de coelho anti-fator de von Willebrand (FvW) (1:50) (Millipore, Massachusetts, EUA) diluído em 1% de BSA em solução de PBS durante duas

horas à temperatura ambiente em câmara úmida. Foram lavados em PBS seis vezes, por 5 minutos cada em temperatura ambiente, incubados com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano (HRP) anti-camundongo (1:250) (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, EUA) e anti-coelho (1:250) (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, EUA) diluído em PBS+1% de BSA e lavados em PBS seis vezes, cinco minutos cada, em temperatura ambiente. Após, o material foi incubado na solução reveladora de peroxidase de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro, com a utilização do DAB como cromógeno e lavado em PBS três vezes, por 5 minutos cada, em temperatura ambiente. Foi realizada contra-coloração com hematoxilina de Harris por um minuto, e, em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente uma vez. Posteriormente, foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas em Permount (EM Sciences, Pennsylvania, EUA).

Utilizou-se o anticorpo anti-panqueratina para detecção de citoqueratinas, que são constituintes do citoesqueleto das células epiteliais, correspondendo a marcadores epiteliais de eleição (ALMEIDA Jr, 2004; ANANDACOOMARASWAMY et al., 2006); e o anticorpo primário anti-alfa-actina de músculo liso, que reage com a isoforma alfa-actina de músculo liso, expressa por miofibroblastos durante a cicatrização tecidual (LORENA et al., 2002). Também foi utilizado o anticorpo primário anti-FvW como marcador de células endoteliais (WARHOL; SWEET, 1984; YAMAMOTO et al., 1998).

4.2. Microscopia

4.2.1. Análise morfométrica

A avaliação histológica foi realizada com a utilização de microscópio Olympus BX50 (Olympus America, Inc., Pennsylvania, EUA) e as imagens foram capturadas com câmera Spot RT3 (Diagnostic Instruments, Inc., Michigan, EUA) acoplada ao microscópio, fornecendo uma imagem colorida RGB de 8-bit.

Utilizou-se o programa Image Pro-Plus® v. 7.0 (Media Cybernetics, Inc., Maryland, USA) para análise morfométrica de imagens digitais de alta resolução de cortes histológicos de MT corados em Hematoxilina-Eosina (HE), com aferição da espessura das camadas epitelial externa, lâmina própria e mucosa da MT (Figura 7). Quando havia perfuração de MT, as espessuras foram aferidas a distâncias entre 50 e 100 μm da margem da perfuração. Em MT intactas ou cicatrizadas, as espessuras foram aferidas a distâncias de 450 a 500 μm do cabo do martelo. A calibração utilizada pelo sistema digital de análise de imagens foi de 0,5420 *pixel*/ μm com magnificação de 40x; 1,3640 *pixel*/ μm , de 100x; 2,740 *pixel*/ μm , de 200x; e 5,420 *pixel*/ μm , de 400x.

Figura 7: Imagem de alta resolução de MT corada em HE ilustrando aferição da espessura total da MT e de cada camada (epitelial, lâmina própria, mucosa) separadamente. **(CAE)** conduto auditivo externo; **(m)** cabo do martelo (Magnificação de 400x).

As perfurações das membranas timpânicas foram dimensionadas nas porções anterior e posterior ao cabo do martelo, medindo-se a distância linear entre as bordas das perfurações timpânicas (Figura 8). Foram identificadas as regiões anterior e posterior com base no músculo tensor do tímpano, presente em todas as bulas e na porção anterior.

Figura 8. Imagem de alta resolução de MT corada em HE ilustrando as medições das perfurações anterior (**ant**); posterior (**post**) (traços amarelos); (**CAE**) conduto auditivo externo; (**m**) cabo do martelo (Magnificação de 40x).

Utilizou-se o programa Image Pro-Plus® v. 7.0 (Media Cybernetics, Inc., Maryland, EUA) para calcular a Área e Perímetro de cada secção transversal da MT usando a ferramenta de aplicação descrita no tutorial “Wound Healing” (do inglês, cicatrização de feridas), disponível em <<http://www.mediacy.com/Tutorials/WoundHealing/WoundHealing.html>>. Foi

aberta a imagem pelo Image Pro-Plus® v. 7.0; após, utilizando a função *Process, Large Spectral Filters> Edge (-)> Apply* e em seguida, *Filters> Morphological> Close 11x11*. Depois, *Count/Size> Segmentation> Select ranges*. Por meio do Histograma de cores, de maneira automatizada, foi selecionada a variação de cores da região de interesse, determinando as medidas Área e Perímetro da secção transversal da MT, integralmente visualizada com aumento de 20X, fazendo correlação de 0,2720 pixels/ μm em cada medida linear (Figura 9).

Figura 9: Imagem do programa Image Pro-Plus® v. 7.0 ilustrando: **(A)** MT; **(B e C)** determinação das medidas Área e Perímetro; **(B)** com a função “*Filled*” (do inglês “preenchido”) e **(C)** “*Outline*” (do inglês “delineado”).

4.2.2. Análise computadorizada do colágeno de imagens com coloração de *picrosirius red* sob luz polarizada

As imagens foram analisadas usando um microscópio Olympus BX50 (Olympus America, Inc., Pensilvânia, EUA) equipado com filtros polarizadores dispostos de forma cruzada para fornecer iluminação polarizada. Utilizou-se o programa ImageJ versão 1.46 g desenvolvido por *National Institutes of Health* (NIH, EUA) e disponível no site <http://rsbweb.nih.gov/ij/> para análise do colágeno de imagens capturadas de alta resolução de MT.

Nas lâminas coradas com PSR e submetidas à luz polarizada, as fibras colágenas aparecem brilhantes, ou birrefringentes, enquanto o espaço intersticial e os elementos não colágenos aparecem escuros (RICH; WHITTAKER, 2005). As imagens foram obtidas com aumento de 20X, fazendo correlação de 0,2720 pixels/ μm em cada medida linear após calibração.

A etapa seguinte foi determinar a cor (ou “hue”, do inglês) de cada pixel das imagens com luz polarizada. Sabe-se que a cor das fibras colágenas coradas com PSR e visualizadas sob luz polarizada depende da espessura da fibra. À medida que a espessura da fibra aumenta, a cor muda do verde para o amarelo, para o laranja e para o vermelho (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978; JUNQUEIRA; MONTES; SANCHES, 1982; MONTES; JUNQUEIRA, 1991). Para determinar a proporção das diferentes tonalidades de fibras colágenas foi convertida a imagem em HSB (“hue, saturation, brightness”): *Image> Type> HSB Stack*. Em seguida, *Image> Adjust> Threshold*. Apenas o componente “hue” foi retido e um histograma de frequência de cores foi obtido de imagens de 8-bit, que contêm 256 cores (Figura 10). Foram usadas as seguintes definições de cores: vermelho 2-9 e 230-256, laranja 10-38, amarelo 39-51, verde 52-128 (MACKENNA et al., 1994; RICH; WHITTAKER, 2005). A variação de cores de 129-229 consistiu de espaço intersticial e elementos teciduais não-birrefringentes como hemácias (RICH; WHITTAKER, 2005). Foi feita a relação entre a área ocupada pelo colágeno total e a área total da MT, que fora previamente calculada para cada MT.

As frações das diferentes espessuras de fibras colágenas foram determinadas pela divisão do número de pixels de cada área correspondente a cada variação de cores, pelo total de pixels de colágeno avaliado em cada MT (MUÑOZ-PINTO; WHITTAKER; HAHN, 2009).

Figura 10: Ilustração do histograma de cores (à esquerda) identificando as 256 cores de imagem de 8-bit (à direita).

4.2.3. Análise computadorizada de imagens com coloração imuno-histoquímica

Utilizou-se o algoritmo desenvolvido por Ruifrok e Johnston (2001), descrito como “*Color Deconvolution*” (do inglês, decomposição de cores), um método flexível de separação e quantificação de colorações imuno-histoquímicas (IHQ) por análise de imagens coloridas. Este algoritmo de imagem permitiu análise das amostras coradas com Hematoxilina e DAB, usando microscópio e instalação de câmera RGB padrão e um programa de domínio público de imagem ImageJ versão 1.46g (NIH, EUA).

Pelo ImageJ (NIH, EUA), foram abertas imagens de MT com aumento de 20X, com correlação de 0,2720 pixels/ μm em cada medida linear, e foi realizada a seleção da área de interesse correspondendo à MT por inteiro. Em

seguida, função *Process> subtract background>ok*. Após, *Plugins> Colour Deconvolution> Vectors H DAB > ok*. Nesta última ação, foi informada a coloração utilizada, Hematoxilina e DAB. Após a decomposição de cores, foi trabalhado na matriz correspondente à coloração DAB (*Colour_2*) (Figura 11). *Edit> Selection > Restore Selection. Image> Adjust> Threshold > Auto. Analyse> Measure*. Dessa forma, foi determinada a área de superfície corada com DAB. Em seguida, foi calculada a porcentagem de área corada com DAB, isto é, a área da MT corada com DAB, dividido pela área total da MT, que fora previamente calculada.

$$\text{Porcentagem de área corada com DAB} = \frac{\text{Área da MT corada com DAB}}{\text{Área total da MT}}$$

A porcentagem de área corada com DAB, conforme fórmula anterior, foi descrita e analisada por Brey et al. (2003), que compararam o método manual (padrão-ouro) com dois observadores com oito métodos automatizados diferentes.

Figura 11: Imagens de cortes histológicos de MT ilustrando a aplicação do algoritmo *color deconvolution*. **(A)** Corte histológico de MT corado com Hematoxilina e DAB com marcação para anticorpo anti-panqueratina identificado por coloração de tonalidade marrom. **(B)** O mesmo corte histológico após a decomposição de cores, identificando apenas a coloração de tonalidade marrom marcada pelo cromógeno DAB. (Magnificação de 20x, submetidas a zoom de 100%).

4.3. Análise Estatística

Inicialmente, foi realizada análise exploratória dos dados. Apesar de existir independência entre as medidas ao longo do tempo (animais diferentes em cada tempo), foram coletadas informações das orelhas direita e esquerda de alguns animais, o que exigiu o uso de um modelo que contemplasse essa característica no estudo. Assim, para se atingir o objetivo, foi proposto um modelo de efeitos mistos. Os modelos lineares de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) são utilizados na análise das respostas de um mesmo indivíduo na forma de agrupamentos, ou seja, a suposição de independência entre observações num mesmo grupo não é adequada (LITTEL et al., 1996; SCHALL, 1991). Esses modelos têm como pressuposto que seus resíduos tenham distribuição normal com média 0 e variância σ^2 . Para que esse pressuposto fosse atendido, uma transformação logarítmica foi aplicada às variáveis respostas. Foram estimados os contrastes ortogonais para se verificarem as possíveis diferenças entre grupos e tempos. O nível de significância adotado foi de 5%. Foi utilizado o procedimento PROC MIXED do *software* SAS versão 9.2 (SAS Institute Inc., Carolina do Norte, EUA, 2008).

5. RESULTADOS

5.1. Coloração Hematoxilina e Eosina

5.1.1. Três dias após perfuração traumática de MT

5.1.1.1. Grupo controle

A espessura média da MT foi cerca de 39,1 μm (Apêndice A).

Após três dias de perfuração timpânica traumática, observou-se uma camada epitelial mais proliferativa e hiperplásica, com cerca de três a quatro fileiras de células epiteliais, tanto próximo ao cabo do martelo (Figuras 12A e 12B) quanto ao ânulus timpânico (Figuras 12A e 12C). A espessura média da camada epitelial foi de 18,9 μm (Apêndice A).

Na camada média da MT, foram visualizadas células de núcleo basofílico compatíveis com fibroblastos. Esses fibroblastos ocasionais desorganizados não transpuseram o limite das fibras colágenas rompidas na perfuração timpânica. Observou-se edema no tecido conjuntivo subepitelial frouxo e submucoso próximo ao cabo do martelo e no ânulus timpânico. Houve predomínio de processo inflamatório com recrutamento de células polimorfonucleares, localizadas na porção perivascular e no tecido conjuntivo frouxo subepitelial e submucoso. Vasos sanguíneos com pletora ou turgescência estiveram presentes próximos ao cabo do martelo (Figura 12B) e na região do ânulus timpânico. A espessura média da lâmina própria foi de 14,35 μm (Apêndice A).

Observou-se hiperplasia de tecido mucoso nas regiões próximas das bordas da perfuração. Encontrou-se uma fileira de tecido mucoso com células hiperplásicas e com espessura média de 5,86 μm (Apêndice A).

Figura 12. Imagens de corte histológico de MT do grupo Controle após três dias de perfuração traumática corado em HE. Na Figura A, o quadrilátero B corresponde à região da Figura 12B e o quadrilátero C, à região da Figura 12C. **(CAE)** conduto auditivo externo; **(m)** cabo do martelo. **(ep)** camada epitelial. **(Lp)** lâmina própria. **(anulus)** ânulus timpânico. **(A)** com magnificação de 20x; **(B e C)** de 200x.

5.1.1.2. Grupos experimentais três dias

No Glns, a espessura média da MT foi cerca 74,68 μm ; no GLat, foi cerca de 77,8 μm e no GlnsLat, cerca de 80,21 μm (Apêndice A).

No Glns, a camada epitelial apresentou espessura média de 37,21 μm ; no GLat, de 35,65 μm e no GlnsLat, de 36,99 μm (Apêndice A). A avaliação histológica mostrou MTs com regiões de três a quatro fileiras de células epiteliais (Figuras 13A e 13C) e regiões com cinco ou mais fileiras de células (Figuras 13A e 13B). Nos grupos de tratamento, após três dias, algumas perfurações já apresentavam fechamento, iniciado pela camada epitelial.

No Glns, a espessura média da lâmina própria foi de 31,13 μm ; no GLat, foi de 35,76 μm e no GlnsLat, de 37,62 μm (Apêndice A). No estudo histológico da lâmina própria, foram visualizadas células de núcleo basofílico, fibroblastos, presentes em quantidade moderada em mais da metade da MT e dispostos de forma organizada. Foram observadas fibras colágenas espessas, densas e organizadas e vasos capilares, ambos presentes em mais da metade de MT de forma moderada.

No Glns, a camada mucosa apresentou espessura média de 6,34 μm , no GLat, de 6,39 μm e no GlnsLat, de 5,6 μm (Apêndice A). Observou-se uma fileira de células hiperplásicas na maior parte da MT, e duas a três fileiras de células hiperplásicas em porções minoritárias da MT.

Figura 13. Imagens de corte histológico de MT do grupo Insulina após três dias de perfuração traumática corado em HE. Na Figura 13A, o quadrilátero B corresponde à região da Figura 13B e o quadrilátero C, à região da Figura 13C. **(CAE)** conduto auditivo externo; **(m)** cabo do martelo; **(ep)** camada epitelial; **(Lp)** lâmina própria; **(anulus)** ânulus timpânico; **(mucosa)** camada mucosa. **(A)** magnificação de 20x; **(B)** magnificação de 200x; **(C)** magnificação de 100x.

5.1.2. Cinco dias após perfuração traumática de MT

5.1.2.1. Grupo controle

Após cinco dias de perfuração, a espessura média da MT foi cerca de 71,42 μm (Apendice A).

A camada epitelial apresentou hiperplasia em região próxima ao cabo do martelo e ao ânulus. A MT apresentou áreas com três a cinco fileiras de tecido epitelial (Figuras 14A e 14B). Houve formação de ponte epitelial que avançou na direção do fechamento da perfuração timpânica em alguns casos (Figuras 14C e 14D). O fechamento da perfuração no GCon também iniciou pela camada epitelial. A espessura média da camada epitelial foi de 27,13 μm (Apêndice A).

Na camada média, observou-se a proliferação de fibroblastos na região adjacente da perfuração e ultrapassando o limite das fibras colágenas pré-existentes, que foram rompidas no processo traumático de perfuração timpânica (Figuras 14C e 14D). Aglomerados de hemácias, indicando capilares sanguíneos, estavam presentes no tecido conjuntivo em menos da metade da MT. A espessura da camada média foi de 36,18 μm (Apêndice A).

Observou-se hiperplasia de tecido mucoso com cerca de duas a três fileiras de células mucosas. O tecido mucoso também avançou no sentido de preencher o intervalo tecidual da perfuração timpânica (Figuras 14D). A espessura da camada mucosa foi de 8,11 μm (Apêndice A).

Figura 14. Imagens de cortes histológicos de MT do grupo Controle após cinco dias de perfuração traumática corado em HE. Na Figura 14A, o quadrilátero B corresponde à região da Figura 14B. Na Figura 14C, o quadrilátero D corresponde à região da Figura 14D. **(CAE)** conduto auditivo externo; **(m)** cabo do martelo; **(ep)** camada epitelial; **(Lp)** lâmina própria; **(mucosa)** camada mucosa. **(A)** magnificação de 20x; **(B)** magnificação de 100x; **(C)** magnificação de 40x; **(D)** magnificação de 200x.

5.1.2.2. Grupos Experimentais Cinco Dias

No Glns, a espessura média da MT foi cerca 112,33 μm , no GLat, foi cerca de 110 μm e no GlnsLat, cerca de 131,44 μm (Apêndice A).

No Glns, a camada epitelial apresentou espessura média de 44,21 μm , no GLat, de 39,53 μm e no GlnsLat, de 51,64 μm (Apêndice A). A camada epitelial da MT apresentou cinco ou mais fileiras de células epiteliais na maior parte da MT, cobrindo a perfuração timpânica na maioria dos casos (Figuras 15A, 15B, 15C e 15D).

No Glns, a espessura média da lâmina própria foi de 61,42 μm , no GLat, foi de 64,08 μm e no GlnsLat, de 74,55 μm (Apêndice A). Foram visualizados fibroblastos em quantidade intensa em mais da metade da MT e dispostos de maneira organizada preenchendo a perfuração timpânica na maioria dos casos (Figuras 15B e 15D). Foram observadas fibras colágenas espessas, densas e organizadas e vasos capilares, presentes em mais da metade de MT, de forma moderada a intensa.

No Glns, a camada mucosa apresentou espessura média de 6,7 μm , no GLat, de 6,43 μm e no GlnsLat, de 5,25 μm (Apêndice A). A camada mucosa apresentou-se com duas a três fileiras de células mucosas em mais da metade da MT, preenchendo a perfuração na maior parte dos casos (Figura 15D).

Houve cicatrização das perfurações de MT na maioria dos casos nos grupos de tratamento com cinco dias.

Figura 15: (A) Imagens de cortes histológicos de MT do grupo Insulina; (B, C e D) do grupo Insulina+Látex, após cinco dias de perfuração traumática corados em HE. Na Figura 15B, o quadrilátero C corresponde à região da Figura 15C e o quadrilátero D, à região da Figura 15D. (CAE) conduto auditivo externo; (m) cabo do martelo; (ep) camada epitelial; (Lp) lâmina própria; (mucosa) camada mucosa, (A) magnificação de 20x; (B) magnificação de 20x; (C) magnificação de 200x; (D) magnificação de 100x.

5.1.3. Sete dias após perfuração traumática de MT

5.1.3.1. Grupo controle

Após sete dias de perfuração, a MT reconstituída apresentou espessura média de 89,18 µm (Apêndice A).

A camada epitelial da MT apresentou-se hiperplasiada, com três a cinco fileiras em toda a extensão de MT. Houve reação epitelial mais acentuada na porção da MT à meia distância entre ânulus e cabo do martelo, local da

perfuração timpânica (Figuras 16A, 16B e 16C). A espessura da camada epitelial foi de 37,49 μm (Apêndice A).

Na camada média, a proliferação fibroblástica progrediu no sentido de preencher as lacunas teciduais. Observaram-se aglomerados de hemácias, indicando neoformação capilar em mais de 50% da MT de aspecto moderado a intenso, na região de tecido conjuntivo frouxo subepitelial e submucoso. A maior reação proliferativa, bem como a região mais espessa da MT, ocorreu à meia distância entre o ânulus e o cabo do martelo, estando menos espessa próxima ao cabo do martelo e ao ânulus timpânico (Figuras 16A, 16B e 16C). A espessura média da lâmina própria foi de 46,11 μm (Apêndice A).

A camada mucosa apresentou-se com uma fileira de células colunares simples hiperplásicas na maior parte da membrana timpânica (Figura 16C). A espessura da camada mucosa foi de 5,58 μm (Apêndice A).

Figura 16: Imagens de corte histológico de MT do grupo Controle após sete dias de perfuração traumática corado em HE. Na Figura 16A, o quadrilátero B corresponde à região da Figura 16B. **(CAE)** conduto auditivo externo; **(m)** cabo do martelo; **(ep)** camada epitelial; **(Lp)** lâmina própria. **(A)** magnificação de 20x; **(B)** magnificação de 100x; **(C)** magnificação de 400x.

5.1.3.2. Grupos experimentais sete dias

No GIns, a espessura média da MT foi cerca 52,27 µm, no GLat, foi cerca de 66,05 µm e no GInsLat, cerca de 63,74 µm (Apêndice A).

No GIns, a camada epitelial apresentou espessura média de 17,47 µm, no GLat de 17,7 µm e no GInsLat, de 16,59 µm. Houve redução no número de fileiras de células epiteliais de cinco para duas fileiras na maior parte da MT (Apêndice A) (Figuras 17A, 17B, 17C e 17D).

No Glns, a espessura média da lâmina própria foi de 30,98 μm , no GLat, de 43,72 μm e no GlnsLat, de 43,03 μm (Apêndice A). Houve redução da celularidade de fibroblastos acompanhando a diminuição gradativa da espessura da camada fibrosa (Figuras 17A e 17B). As fibras colágenas e os vasos capilares ainda foram encontrados em mais de 50% área de secção transversal da MT.

No Glns, a camada mucosa apresentou espessura média de 3,82 μm , no GLat, de 4,63 μm e no GlnsLat, de 4,12 μm (Apêndice A). Houve redução para uma fileira de células mucosas na maior parte da MT.

Figura 17: Imagens de cortes histológicos de MT após sete dias de perfuração traumática corados em HE. Na Figura 17A, o quadrilátero B corresponde à região da Figura 17B. **(A e B)** grupo Insulina; **(C)** grupo Látex; **(D)** grupo Insulina+Látex, **(CAE)** conduto auditivo externo; **(m)** cabo do martelo; **(ep)** camada epitelial; **(Lp)** lâmina própria. **(A)** magnificação de 40x; **(B)** magnificação de 100x; **(C)** magnificação 20x; **(D)** magnificação de 20x.

5.2. Coloração com *Picrosirius Red*

A combinação de coloração com PSR associada à luz polarizada intensifica a birrefringência do colágeno, sendo um método sensível e específico para localizar colágeno em tecidos de vertebrados (JUNQUEIRA; BRIGNOLAS; BRENTANI, 1979) (Figuras 18 e 19). Nas lâminas coradas com PSR e submetidas à luz polarizada, as fibras colágenas aparecem brilhantes, ou birrefringentes, enquanto o espaço intersticial e elementos não colágenos aparecem escuros (RICH; WHITTAKER, 2005) (Figuras 18 e 19). À medida que a espessura da fibra aumenta, a cor muda do verde para o amarelo, laranja e vermelho (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978; JUNQUEIRA; MONTES; SANCHES, 1982; MONTES; JUNQUEIRA, 1991).

Figura 18. Imagens de cortes histológicos de MT após cinco dias de perfuração traumática com coloração *PicroSirius Red* (PSR). (A) grupo controle; (B) grupo Látex, sob luz polarizada. (C) grupo Insulina com PSR sem luz polarizada (D) grupo Insulina com PSR com luz polarizada, após cinco dias. (E) grupo Insulina+Látex com PSR sem luz polarizada; (F) grupo Insulina+Látex com PSR com luz polarizada, após cinco dias. (CAE) conduto auditivo externo; (m) cabo do martelo. (A, B, C, D, E e F) Imagens com magnificação de 20x.

Figura 19: Imagens de cortes histológicos de MT com coloração *PicroSirius Red* (PSR). (A, B, C e D) grupo Insulina após cinco dias de perfuração. (A) PSR sem luz polarizada (magnificação de 100x); (B, C e D) PSR com luz polarizada (aumento de 400x). (E, F, G e H) grupo Insulina após sete dias de perfuração. (E) PSR sem luz polarizada (magnificação 200x); (G) PSR sem luz polarizada (magnificação 400x); (F e H) PSR com luz polarizada (aumento de 400x). (CAE) conduto auditivo externo; (m) cabo do martelo; (anulus) ânulus timpânico.

5.3. Avaliação Imuno-histoquímica

5.3.1. Anticorpo anti-panqueratina

Utilizou-se o anticorpo primário anti-panqueratina como marcador epitelial. Os anticorpos primários foram incubados com anticorpos secundários conjugados com a enzima peroxidase. O cromógeno DAB reagiu com a peroxidase conjugada com o anticorpo secundário, fornecendo uma coloração marrom. Nas Figuras 20A, 20B, 20C, 20D, 20E, 20F, 20G e 20H, a coloração de tonalidade marrom na MT correspondeu ao tecido epitelial marcado com anticorpo anti-panqueratina.

Figura 20: Cortes histológicos com marcação Imuno-histoquímica para anticorpo anti-panqueratina e contra-coloração com Hematoxilina. (A) grupo Controle; (B) grupo Insulina; (C) grupo Látex; (D) grupo Insulina+Látex. (A, B, C e D) com cinco dias após perfuração (aumento 20x). (E e F) grupo Insulina+Látex, cinco dias (aumento 200x). (G e H) grupo Látex, sete dias (aumentos 40x e 100x, respectivamente). (CAE) conduto auditivo externo; (m) cabo do martelo; (ep) camada epitelial; (mucosa) camada mucosa.

5.3.2. Anticorpo anti-alfa-actina de músculo liso

Utilizou-se o anticorpo primário anti-alfa actina de músculo liso como marcador de miofibroblastos. Os miofibroblastos foram observados na lâmina própria da MT e na região do ânulus timpânico, com tonalidade marrom, após revelação do cromógeno DAB (Figuras 21A, 21B, 21C, 21D, 21E, 21F, 21G e 21H).

Figura 21: Cortes histológicos com marcação Imuno-histoquímica para anticorpo anti-alfa actina de músculo liso e contra-coloração com Hematoxilina. **(A)** grupo Controle; **(B)** grupo Insulina; **(C)** grupo Látex; **(D)** grupo Insulina+Látex **(A, B, C e D)** com cinco dias após perfuração (aumento 20x); **(E)** grupo Insulina, cinco dias (aumento de 400x), mostrando miofibroblastos na junção da MT com osso timpânico; **(F, G e H)** grupo Insulina+Látex, cinco dias (aumento de 400x), mostrando miofibroblastos na lâmina própria. **(CAE)** conduto auditivo externo; **(m)** cabo do martelo; **(anulus)** ânulus timpânico; **(Lp)** lâmina própria.

5.3.3. Anticorpo anti-fator de von Willebrand

Utilizou-se o anticorpo primário anti-FvW como marcador de tecido endotelial. Nas Figuras 22A, 22B, 22C, 22D, 22E, 22F, 22G e 22H, a coloração de tonalidade marrom na MT correspondeu ao tecido endotelial marcado com anticorpo anti-FvW, após revelação do cromógeno DAB.

Figura 22: Cortes histológicos com marcação imuno-histoquímica para anticorpo anti-fator de von Willebrand e contra-coloração com Hematoxilina. **(A)** grupo Controle; **(B)** grupo Insulina; **(C)** grupo Látex; **(D)** grupo Insulina+Látex **(A, B, C e D)** com cinco dias após perfuração (aumento 20x); **(E e F)** grupo Insulina, três dias (aumento 200x e 400x, respectivamente); **(G e H)** grupo Insulina+Látex, sete dias (aumento 100x e 400x, respectivamente). **(CAE)** conduto auditivo externo; **(m)** cabo do martelo.

5.4. Análise Morfométrica

5.4.1. Espessura da camada epitelial externa

Em relação à variável epitelial, em cada grupo isolado, houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos três, cinco e sete dias, com exceção da comparação LatT3 - LatT5 ($p=0,20$) (Apêndice B).

As espessuras da camada epitelial com três e cinco dias foram maiores nos grupos de tratamento quando comparadas com o GCon ($p<0,01$) com pico de valores com cinco dias (Figura 23). Não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento com três dias (Apêndice B). Com cinco dias, observou-se que o GInsLat apresentou valores maiores que o GLat ($p=0,01$). O GIns não apresentou diferença entre os demais grupos de tratamento.

Com sete dias, observou-se que o GCon apresentou espessuras epiteliais maiores que os grupos de tratamento, com $p<0,01$ (Apêndice B). Observou-se aumento gradativo da espessura epitelial no GCon ao longo dos sete dias (Figura 23). Nesse terceiro período, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento, que apresentaram redução da espessura epitelial (Figura 23).

Figura 23- Representação gráfica da espessura epitelial (μm) ao longo do tempo (Dias) (# indica $p \leq 0,01$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).

5.4.2. Espessura da camada fibrosa

Em relação à variável fibrosa, em cada grupo isolado, houve diferença de espessura estatisticamente significativa entre os períodos três, cinco e sete dias, com exceção das comparações InsT3 - InsT7 ($p=0,81$) e InsLatT3 - InsLatT7 ($p=0,15$) (Apêndice C).

Em relação aos tempos três e cinco dias, houve maiores valores das camadas fibrosas dos grupos de tratamento quando comparados com o GCon ($p < 0,01$), com valores mais altos no segundo período (Figura 24). Entre os grupos de tratamento, houve diferença entre InsT3 - InsLatT3 ($p=0,03$) e InsT5 - InsLatT5 ($p=0,03$) (Apêndice C).

Em relação ao terceiro período, o GIns apresentou valores de espessura fibrosa menores que os demais grupos de forma estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Não houve diferença entre GCon, GLat e GInsLat (Apêndice C). Observou-se aumento gradativo dos valores do GCon ao longo dos sete dias e redução dos valores nos grupos de tratamento (Figura 24).

Figura 24- Representação gráfica da espessura fibrosa (μm) ao longo do tempo (Dias) (# indica $p \leq 0,01$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).

5.4.3. Espessura da camada mucosa

Em relação à variável mucosa, dentro de cada grupo, observou-se diferença estatisticamente significativa no GCon: ConT3 – ConT5 ($p = 0,05$); ConT5 - ConT7 ($p = 0,02$); no GIns: InsT3 - InsT7 ($p < 0,01$); InsT5 - InsT7 ($p < 0,01$); no GLat: LatT3- LatT7 ($p = 0,03$); LatT5 - LatT7 ($p = 0,03$) (Apêndice D).

Na variável mucosa verificou-se aumento dos valores do tempo três para o tempo cinco dias, com pico de espessura neste segundo período para todos os grupos (Figura 25). Com cinco dias, houve diferença estatisticamente significativa entre ConT5 - InsLatT5 ($p = 0,01$), com valores menores para GInsLat (Apêndice D).

Com sete dias, houve redução das espessuras mucosas em todos os grupos (Figura 25). Percebeu-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ConT7 - InsT7 ($p = 0,01$) e ConT7 - InsLatT7 ($p = 0,02$), com valores menores para GIns e GInsLat quando comparados aos demais grupos (Apêndice D).

Figura 25- Representação gráfica da espessura mucosa (μm) ao longo do tempo (Dias) (# indica $p \leq 0,01$ e {} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).

5.4.4. Medida linear da perfuração da MT

Observou-se, na Figura 26, que os grupos de tratamento apresentaram menores perfurações com três dias ($p < 0,01$) e com cinco dias ($p < 0,01$) quando comparados com o GCon (Apêndice E). Com cinco dias, houve cicatrização da MT na maior parte dos casos nos grupos de tratamento, que não apresentaram diferenças entre si na evolução do fechamento da perfuração timpânica.

Com sete dias, houve fechamento de todas as perfurações timpânicas do GIns e do GInsLat (Figura 26). No GCon, não houve fechamento de 20% das perfurações, com média de $57,86 \mu\text{m}$ e desvio-padrão de $158,37$. No GLat, não houve fechamento de 20% das perfurações com média de $40,31 \mu\text{m}$ e desvio-padrão de $93,12$ (Apêndice A).

O GCon apresentou evolução de fechamento da MT com diferença estatisticamente significativa entre os dias analisados: ConT3 - ConT5 ($p = 0,04$); ConT3 - ConT7 ($p < 0,01$); ConT5 - ConT7 ($p < 0,01$) (Apêndice E).

Figura 26- Representação gráfica das perfurações timpânicas (µm) ao longo do tempo (Dias) (# indica $p \leq 0,01$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).

5.4.5. Medida das áreas das MTs

A análise descritiva da variável Área encontra-se no Apêndice F. Observou-se tendência de aumento das medidas das áreas do Glns e do GlnsLat com cinco dias e posterior redução com sete dias (Figura 27). No GCon e no GLat, houve tendência de aumento das medidas das áreas ao longo dos sete dias (Figura 27). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento entre si e nem com o GCon. No GCon, isoladamente, houve diferença entre o ConT3 - ConT7 ($p=0,02$), com aumento dos valores de área da MT com sete dias de cicatrização timpânica (Apêndice G).

Figura 27- Representação gráfica das áreas das MTs (μm^2) ao longo do tempo (Dias).

5.4.6. Medida dos perímetros das MTs

A análise descritiva da variável Perímetro encontra-se no Apêndice F.

Observou-se tendência de aumento das medidas de Perímetro do Glns e do GlnsLat com pico em cinco dias e posterior redução com sete dias (Figura 28). No GCon e no GLat, houve tendência de aumento das médias de Perímetro ao longo dos sete dias (Apêndice F) (Figura 28).

Com três dias, houve diferença estatisticamente significativa do Glns, do GLat e do GlnsLat em relação ao GCon, ($p=0,04$), ($p=0,03$), ($p=0,02$), respectivamente (Apêndice H), com maiores valores para os grupos de tratamento.

Com cinco dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Apêndice H).

Com sete dias, houve diferença estatisticamente significativa entre GCon e GlnsLat ($p=0,02$) e GLat e GlnsLat ($p=0,01$), com valores menores de perímetro para GlnsLat (Apêndice H).

Dentro do GCon, do GLat e do GlnsLat, observaram-se diferenças entre os períodos ConT3 - ConT5 ($p<0,01$); ConT3 - ConT7 ($p<0,01$) e LatT3 - LatT7 ($p=0,03$); InsLatT3 - InsLatT5 ($p=0,03$) e InsLatT5 - InsLatT7 ($p=0,01$) (Apêndice H).

Figura 28- Representação gráfica dos perímetros das MTs (μm) do tempo (Dias) ({} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).

5.5. Análise Computadorizada do Colágeno de Imagens com Coloração de *Picrosirius Red* sob Luz Polarizada

5.5.1. Avaliação da birrefringência do colágeno tecidual

A análise descritiva da porcentagem de área de birrefringência do colágeno total encontra-se no Apêndice I.

As médias de porcentagens de birrefringência do colágeno total foram maiores no GIns, no GLat e no GInsLat nos períodos de três e cinco dias quando comparadas com o GCon (Apêndice I). Houve pico de valores com cinco dias e posterior redução das medidas com sete dias nos grupos de tratamento (Figura 29).

A maior birrefringência para colágeno no GIns, quando comparado com o GCon, foi estatisticamente significativa com três dias ($p=0,01$) e cinco dias ($p=0,04$) (Apêndice J) (Figura 29). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento e nem entre os períodos de cada grupo.

Figura 29- Representação gráfica da porcentagem de área de birrefringência do colágeno (%) ao longo do tempo (Dias). Porcentagem de área de birrefringência do colágeno correspondeu à razão da área ocupada pelo colágeno total e a área total da MT (# indica $p \leq 0,01$ e {} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).

5.5.2. Distribuição da birrefringência do colágeno tecidual conforme as tonalidades *red*, *orange*, *yellow* e *green* (vermelho, laranja, amarelo e verde)

A análise descritiva da porcentagem de birrefringência das tonalidades *red*, *orange*, *yellow* e *green* (vermelho, laranja, amarelo e verde) encontram-se no Apêndice I.

Observou-se uma maior média de porcentagem de birrefringência da coloração *red* (vermelha) no GIns, no GLat e no GInsLat, quando comparado com o GCon ao longo do tempo, com tendência de aumento dos valores de porcentagens desta coloração nos grupos de tratamento (Apêndice I) (Figura 30). Houve maior porcentagem de birrefringência da coloração *red*, estatisticamente significativa, no GLat e no GInsLat com cinco dias, ($p=0,03$) e ($p=0,05$) respectivamente, quando comparados com o GCon (Apêndice K) (Figura 30). Com sete dias, a diferença foi estatisticamente significativa quando

comparado o GIns ($p=0,04$) com o GCon (Apêndice K) (Figura 30). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento.

Observou-se maior média de porcentagem de coloração *orange* (laranja) no GCon comparado com os demais grupos. Percebeu-se redução de porcentagem de tonalidade *orange* (laranja) ao longo dos dias de cicatrização nos grupos de tratamento (Apêndice I) (Figura 30). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento comparados com o GCon (Apêndice L).

O GCon também apresentou valores de médias de porcentagem maiores para cores *yellow* (amarela) e *green* (verde), quando comparado com GIns, GLat e GInsLat (Apêndice I). Porém, não houve diferença estatística entre os grupos de tratamento e o GCon, e nem entre os grupos de tratamento em relação às variáveis de tonalidade amarela (Apêndice M) e verde (Apêndice N).

Figura 30- Representação gráfica da porcentagem da birrefringência de tonalidade *red*, *orange*, *yellow* e *green* (vermelho, laranja, amarelo e verde) do colágeno tecidual (%) ao longo do tempo (Dias). A porcentagem de birrefringência de cada tonalidade correspondeu à divisão do número de pixels de cada área correspondente a cada variação de cores pelo total de pixels de colágeno tecidual avaliado em cada MT ({} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).

5.6. Análise Computadorizada de Imagens com Coloração Imuno-histoquímica

5.6.1. Avaliação da porcentagem do anticorpo anti-panqueratina

A análise descritiva da porcentagem de área corada com cromógeno DAB identificando o anticorpo primário anti-panqueratina está relatada no Apêndice O.

A marcação da panqueratina teve o pico com cinco dias e apresentou as médias mais altas nos grupos de tratamento (Apêndice O) (Figura 31).

A diferença entre o GCon e GIns foi estatisticamente significativa com cinco dias ($p=0,02$) e sete dias ($p=0,01$). Entre GCon e GLat, foi significativa a diferença com sete dias ($p=0,01$). Houve diferença estatística entre GCon e GInsLat com cinco dias ($p=0,04$) e sete dias ($p=0,01$). Não houve diferenças estatísticas entre GIns, GLat e GInsLat em relação à variável panqueratina. Entre os períodos do GIns, observou-se diferença entre InsT3 - InsT5 ($p=0,01$) e InsT5 - InsT7 ($p=0,05$) (Apêndice P).

Figura 31- Representação gráfica da porcentagem de área corada com cromógeno DAB identificando o anticorpo primário anti-panqueratina (%) ao longo do tempo (Dias). A porcentagem de área corada com DAB foi calculada dividindo a área da MT corada com DAB dividida pela área total da MT. (# indica $p \leq 0,01$ e {} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).

5.6.2. Avaliação da porcentagem do anticorpo anti-alfa-actina de músculo liso

A análise descritiva da porcentagem de área corada com cromógeno DAB identificando o anticorpo primário anti-alfa-actina de músculo liso está relatada no Apêndice O.

Houve maiores médias de porcentagens anti-alfa-actina de músculo liso no GIns, no GLat e no GInsLat com cinco e sete dias quando comparados com o GCon (Apêndice O) (Figura 32).

Houve maior marcação estatisticamente significativa anti-alfa-actina de músculo liso no GIns e no GLat com cinco dias ($p=0,02$) e ($p=0,03$), respectivamente, e com sete dias ($p=0,02$) e ($p=0,03$), respectivamente, em relação ao GCon. O GInsLat apresentou maior marcação significativa de α -actina de músculo liso com cinco dias ($p=0,03$) quando comparado com o

GCon. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento (Apêndice Q).

Avaliando os períodos de cada grupo, houve diferença entre InsT3 - InsT5 ($p=0,03$) e InsT3 - InsT7 ($p=0,02$) no GIns; e LatT3 - LatT5 ($p=0,04$) e LatT3 - LatT7 ($p=0,02$) no GLat (Apêndice Q).

Figura 32- Representação gráfica da porcentagem de área corada com cromógeno DAB identificando o anticorpo primário anti-alfa-actina de músculo liso (%) ao longo do tempo (Dias). A porcentagem de área corada com DAB foi calculada dividindo a área da MT corada com DAB dividida pela área total da MT ({} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).

5.6.3. Avaliação da porcentagem do anticorpo anti-fator de von Willebrand

A análise descritiva da porcentagem de área corada com cromógeno DAB identificando o anticorpo primário anti-FvW está no Apêndice O.

Houve maiores médias de porcentagens anti-FvW nos grupos de tratamento ao longo dos períodos (Apêndice O) (Figura 33). Nos grupos de tratamento, a marcação anti-FvW apresentou aumento de três para cinco dias,

com pico neste segundo período, e posterior redução de marcação com sete dias (Figura 33).

Não houve diferenças estatísticas entre o GCon, o GIns, GLat e o GInsLat em relação à marcação anti-FvW, que é um marcador de vascularização (Apêndice R).

Figura 33- Representação gráfica da porcentagem de área corada com cromógeno DAB identificando o anticorpo primário anti-fator de von Willebrand (%) ao longo do tempo (Dias). A porcentagem de área corada com DAB foi calculada dividindo a área da MT corada com DAB dividida pela área total da MT.

6. *DISCUSSÃO*

O rato foi o modelo experimental escolhido, pois sua MT apresenta semelhanças estruturais com a MT humana (CASTAGNO, 2003; FACCINI, 2007; SPRATLEY, 2003), com a possibilidade de identificar anticorpos espécie específicos para a análise IHQ. Em cobaias, por exemplo, que também apresentam semelhanças estruturais com as MTs humanas, não foram encontrados anticorpos espécie específicos. A dificuldade encontrada foi a dimensão reduzida do conduto auditivo externo do rato, que limitou abordagens mais complexas das MTs.

A aferição das espessuras das camadas da MT, de 50 a 100 μm da borda da perfuração, permitiu avaliar a atividade cicatricial envolvida próxima à lesão, como padronizado por Guneri et al. (2003). Em MTs íntegras, essa avaliação foi padronizada em uma região com distância aferida em relação ao referencial cabo do martelo, presente em todos os cortes, e correspondente ao local da perfuração timpânica. Dessa forma, determinou-se a distância de 450 a 500 μm do cabo do martelo, que poderia ser aferida com aumento de, no máximo, 100x, com calibração de 1,3640 *pixel*/ μm . As avaliações IHQ e de birrefringência do colágeno, por outro lado, foram capazes de dimensionar eventos cicatriciais que ocorreram em toda a MT. Portanto, este estudo permitiu avaliar eventos cicatriciais, tanto em regiões próximas à perfuração quanto alterações que ocorreram em toda a MT.

A aplicação de insulina tópica e o uso da membrana de látex aceleraram o fechamento da MT com três e cinco dias, de forma estatisticamente significativa em relação ao GCon (Figura 26). A associação insulina mais látex também acelerou a cicatrização com três e cinco dias em relação ao controle, mas não foi superior à aplicação isolada desses tratamentos. Com cinco dias, houve cicatrização da MT na maior parte dos casos nos grupos submetidos ao tratamento. Com sete dias, todas as perfurações do GIns e do GInsLat estavam cicatrizadas, mas 20% das perfurações do GCon e do GLat ainda persistiam. Em todos os casos, houve, inicialmente, a cicatrização da camada epitelial, que antecedeu ao fechamento das demais camadas fibrosa e mucosa (Figuras 14C, 14D, 15B, 15C, 20G e 20H). Não foi possível definir se, entre essas duas últimas camadas, houve tempos diferentes de fechamento.

Perfurações amplas levam mais tempo para cicatrizar do que perfurações menores (KRISTENSEN, 1992; McINTIRE; BENITEZ, 1970) e perfurações maiores têm menor probabilidade de cicatrizar espontaneamente (GRIFFIN, 1979). Esse conceito de que o tempo de fechamento está correlacionado com o tamanho da perfuração parece óbvio, no entanto, von Unge e Hultcrantz (2011) provocaram miringotomias com laser KTP (potássio-titânio-fosfato) com diâmetros de 0,2 mm, 0,4 mm e 0,6 mm e verificaram que o tempo de fechamento não foi diretamente correlacionado com o tamanho da perfuração em MT de ratos, em perfurações menores ou iguais a 0,6 mm. Em experimentos com perfurações realizadas com agulha de 0,6 mm ou 600 µm, as perfurações fecharam em seis a sete dias em ratos (SANTA MARIA et al., 2010), e quando realizadas com agulha de 0,9 mm ou 900 µm, as perfurações em MT de ratos fecharam sete dias após (MONDAIN; RYAN, 1993).

Tanto a insulina quanto o látex, isoladamente e em associação, promoveram maior atividade na camada epitelial externa, com aumento da espessura epitelial nas regiões da perfuração timpânica, e com acentuada marcação por panqueratina, em toda a MT, quando comparadas ao controle. Houve um pico de atividade epitelial com cinco dias seguido de redução com sete dias (Figuras 23 e 31). O pico de cinco dias coincidiu com o fechamento da perfuração timpânica na maioria das orelhas tratadas. A camada epitelial foi a primeira a promover o fechamento da perfuração timpânica. Após o fechamento epitelial, a camada epitelial sofreu um processo de remodelação. Já no GCon, com sete dias, a espessura epitelial foi maior, pois houve fechamento de perfuração mais tardiamente, seguido por remodelação mais tardia. A associação insulina mais látex não foi superior aos demais grupos de tratamento em relação à atividade epitelial da MT.

Devido às características teciduais morfológicas da MT, um evento marcante da fase proliferativa é a reepitelização, com a presença do espessamento da camada epitelial e seu avanço sobre as bordas da perfuração, que ocorre antecipadamente ao avanço da camada fibrosa (AMOILS; JACKLER; LUSTIG, 1992; JOHNSON; SMALLMAN; KENT, 1990). Essa atividade proliferativa da camada epitelial externa da MT foi descrita como

ocorrendo já desde as primeiras horas após a injúria tecidual (KOBAYASHI, 1995; SANTA MARIA et al., 2010; SPRATLEY et al., 2002). Na literatura, há descrições de existência de centros proliferativos epiteliais próximos ao cabo do martelo e na região do ânulus timpânico (GUNERI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 1996; SOMERS et al., 1997; TAYLOR; McMINN, 1967). Identificou-se, contudo, um estudo que descreveu apenas um centro de proliferação epitelial próximo ao cabo do martelo (SANTA MARIA et al., 2010). Distintamente deste, foram encontrados no presente estudo centros proliferativos epiteliais próximos ao cabo do martelo (Figuras 12B e 14B) e na região do ânulus timpânico (Figuras 12C e 13C), em concordância com os estudos anteriores.

A insulina e a membrana de látex são consideradas indutores da proliferação epitelial e da cicatrização. A insulina estimula a migração e proliferação de queratinócitos *in vitro* (LIU et al., 2009); acelera a reepitelização de feridas cutâneas de ratos (APIKOGLU-RABUS et al., 2010; LIU et al., 2009); e estimula a maturação do tecido cicatricial da epiderme em ratos sem diabetes e com diabetes (APIKOGLU-RABUS et al., 2010). Foram identificados na literatura ensaios clínicos prospectivos, randomizados, duplo-cegos e placebo-controlados que detectaram que a insulina tópica acelerou o processo de cicatrização de feridas em pacientes diabéticos (GREENWAY; FILLER; GREENWAY, 1999; LIMA et al., 2012) e em pacientes não diabéticos (GREENWAY; FILLER; GREENWAY, 1999; REZVANI et al., 2009). A biomembrana de látex natural reduziu o período de cicatrização de úlceras venosas crônicas com diminuição do tecido necrótico e organização do reparo tecidual (FRADE, 2003) e com diminuição concomitante de dor no tratamento (FRADE et al., 2001). Em pacientes diabéticos, a biomembrana de látex contribuiu com a remoção de tecido necrótico, com a proliferação do tecido de granulação e com a reepitelização de úlceras crônicas (FRADE et al., 2004). Frade et al. (2006) relataram dois casos de úlceras crônicas de região sacral, em pacientes acamados, que foram refratárias a tratamentos convencionais, mas que responderam a curativos de biomembrana de látex com formação de tecido de granulação e cicatrização adequada de feridas.

A insulina, causando aumento da espessura epitelial e da panqueratina, poderia ser um fator de estímulo para a formação de colesteatomas secundários. Ao longo dos sete dias de observação após perfuração timpânica, não foram observadas alterações colesteatomatosas. Trata-se de um curto período de tempo para se estabelecer que a insulina não estimula a patologia de colesteatoma adquirido. Pesquisas envolvendo modelos de perfurações crônicas (SANTA MARIA; ATLAS; GHASSEMIFAR, 2007) e aplicação de insulina, ou até mesmo, o uso de insulina em modelos experimentais de colesteatomas deverão ser realizados com o propósito de analisar a contribuição ou não da insulina na origem de colesteatomas adquiridos.

A medida de espessura da camada fibrosa foi maior com três dias nos grupos de tratamento em relação ao GCon, com maior espessura após cinco dias, estimulada pela ação da insulina e do látex, isoladamente e em associação (Figura 24). Essa variação da espessura coincidiu com o fechamento da MT com cinco dias na maioria das orelhas submetidas a tratamento. A redução da espessura da camada fibrosa, nos grupos de tratamento com sete dias, coincidiu com a antecipação da fase de remodelação dos grupos de tratamento, em relação ao GCon, nas regiões submetidas à perfuração timpânica. No GCon, a cicatrização da MT ocorreu tardiamente, coincidindo com a maior espessura da camada fibrosa com sete dias neste grupo (Figura 24).

A camada mucosa apresentou pico de espessura com cinco dias em todos os animais e remodelação com sete dias (Figura 25). A insulina, isoladamente e associada ao látex, antecipou a remodelação da camada mucosa com sete dias. Foi relatado em estudo prévio, que a camada mucosa interna contribuiu pouco para o processo cicatricial da MT (JOHNSON; SMALLMAN; KENT, 1990). Por outro lado, para Weinberger, Hawke e Gotlieb (1988), a camada medial mucosa da MT seria das primeiras estruturas a encerrar a perfuração. Não foi possível, por meio da metodologia empregada neste estudo, definir o papel da camada mucosa no processo de cicatrização de MT. Por outro lado, mesmo sendo uma camada com arquitetura histológica menos complexa que as demais, é importante lembrar que os eventos

cicatriciais das três camadas da MT precisam estar harmonicamente ordenados para que a adequada integridade da MT seja restabelecida.

Para identificação do colágeno, foi escolhida a coloração PSR. Outra coloração, como o tricrômio de Masson, também poderia ser usada com essa finalidade. Ao comparar ambas as colorações, Whittaker et al. (1994) constataram que a coloração tricrômio de Masson subestimou a quantidade de colágeno, indicando valores menores, quando comparado com PSR. O colágeno, devido à sua organização molecular anisotrópica, é birrefringente e fica brilhante quando visualizado sob luz polarizada. A coloração PSR também tem uma organização molecular anisotrópica, o que permite realçar a birrefringência do colágeno (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

As diferentes cores de birrefringência do colágeno, identificadas pelo método de coloração PSR com luz polarizada, foram relacionadas, inicialmente, com os diferentes tipos de colágeno (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978; MONTES; JUNQUEIRA, 1991). Os autores demonstraram que o colágeno tipo I, mais espesso, é fortemente birrefringente, com colorações das fibras variando de amarela para vermelha. Por outro lado, o colágeno tipo III, normalmente mais fino, apresenta-se fracamente birrefringente, com coloração das fibras de tom esverdeado. O colágeno tipo II, mais frequente em cartilagens, não forma fibras e se apresenta com birrefringência de coloração variada (JUNQUEIRA; COSSERMELLI; BRENTANI, 1978; MONTES; JUNQUEIRA, 1991).

Na sequência das pesquisas, Junqueira, Montes e Sanchez (1982) observaram que a cor e intensidade da birrefringência variam em função da espessura do colágeno e não necessariamente pelo tipo do colágeno, sendo que, com a redução gradual da espessura da fibra do colágeno, há também redução da intensidade da birrefringência de vermelho para amarelo e verde. Dayan et al. (1989) verificaram, em seus experimentos, que, além da espessura da fibra colágena, o padrão de organização dos feixes de colágeno também determinam a coloração da birrefringência dessas fibras. Apesar de as fibras de colágeno tipo III serem usualmente mais finas que fibras tipo I, não é completamente válido declarar que fibras de coloração verde são tipo III e

fibras de tonalidade laranja são tipo I (MUÑOZ-PINTO; WHITTAKER; HAHN, 2009; RICH; WHITTAKER, 2005).

O método de análise computadorizada de imagens para determinação de diferentes cores (hue) para cada pixel, empregado neste trabalho, permitiu uma análise rápida de áreas extensas; e conseguiu eliminar qualquer subjetividade associada à descrição de cores entre possíveis investigadores diferentes. Rich e Whittaker (2005) avaliaram a reprodutibilidade do método com bons índices de correlação. Uma vez que todas as lâminas foram confeccionadas e analisadas da mesma forma, a comparação entre elas, pelo método de PSR sob luz polarizada, permitiu análise estrutural das fibras colágenas, com inferências sobre a organização e espessura dessas fibras (MUÑOZ-PINTO; WHITTAKER; HAHN, 2009; RICH; WHITTAKER, 2005).

Na lâmina própria, o colágeno tecidual apresentou pico de birrefringência com cinco dias, sendo que o tratamento com Insulina foi o que causou maior acúmulo de colágeno com três e cinco dias (Figura 29). Houve redução do colágeno total com sete dias devido ao processo de remodelação nos grupos submetidos a tratamento. Na literatura, foi descrito que, durante a remodelação tecidual, a produção de colágeno continua em menor escala. Ao mesmo tempo, alguma destruição do colágeno original ocorre, tornando a formação de um novo colágeno mais espesso e que tende a ser orientado de forma mais adequada no tecido (COHEN, JORIZZO, KIRCIK, 2007). Isso explica a maior birrefringência do colágeno de coloração vermelha ao longo do tempo nos grupos de tratamento (Figura 30). Segundo Dayan et al. (1989), a maior coloração vermelha pode indicar feixes de colágeno mais espessos e melhor organizados, principalmente no grupo tratado com insulina tópica na MT. Isso corrobora com os achados de Udupa e Chansouria (1971), que verificaram os efeitos da insulina, em feridas músculo peritoniais de ratos, e observaram que o uso de insulina subcutânea afetou a produção de colágeno na cicatrização, provocando o aparecimento antecipado de fibras colágenas e que as fibras foram mais compactas, densas e melhor orientadas do que as dos animais controles. Além disso, este último estudo verificou que as feridas cicatrizaram mais rápido no grupo tratado com insulina do que nos animais não tratados.

Lima et al. (2012) detectaram que a derme de ratos diabéticos tratados com uso tópico de creme de insulina estava com arranjo de fibras colágenas e células melhor organizadas do que ratos diabéticos não tratados. Eken et al. (2007) utilizaram insulina tópica em MT de cobaias e verificaram maior produção de colágeno e atividade fibroblástica quando comparado com o grupo controle, em perfurações traumáticas de MTs.

Até o presente momento, não foi identificado outro trabalho que descrevesse o processo de cicatrização de MT em ratos utilizando a coloração PSR sob luz polarizada (Figuras 18 e 19). As descrições do colágeno de MT em ratos existentes na literatura foram realizadas com IHQ com marcação para colágeno tipo I, II e III (STENFELDT; JOHANSSON; HELLSTROM, 2006) e colágeno tipo I, II, III e IV (KNUTSSON; BAGGER-SJOBACK; UNGE, 2007). Stenfeldt, Johansson e Hellstrom (2006) verificaram que o colágeno tipo II foi o maior constituinte da lâmina própria da *pars tensa* e que, após miringotomia, colágenos tipo I e III foram encontrados nas bordas da perfuração timpânica e em volta de vasos sanguíneos dilatados no cabo do martelo, em etapas precoces da cicatrização após miringotomia. Knutsson, Bagger-Sjoback e Unge (2007) identificaram que a *pars tensa* da MT foi marcadamente destacada para colágeno tipo II e IV; que a porção externa do ânulus timpânico foi mais marcada por colágeno tipo III e IV; e que a porção interna do ânulus foi mais marcada por colágeno tipo II.

A marcação pela alfa actina de músculo liso apresentou maior intensidade com cinco dias, em todos os grupos de tratamento quando comparados ao GCon (Figura 32). No GIns e GLat, com sete dias, também houve maior marcação em relação ao GCon, sem diferença entre os grupos de tratamento. A insulina e o látex, isoladamente, estimularam mais a marcação de alfa-actina de músculo liso, ou seja, estimularam mais a proliferação de miofibroblastos quando comparados com o GCon ao longo dos sete dias. A associação insulina mais látex não se mostrou superior na proliferação de miofibroblastos em relação à insulina e ao látex, isoladamente. Já a alfa-actina de músculo liso não apresentou redução com sete dias, mostrando que os miofibroblastos têm participação ativa no processo de remodelação do

colágeno tecidual e também da matriz extracelular (LORENA et al., 2002). Os miofibroblastos são o tipo celular mais envolvido na deposição da matriz extracelular - tenascina, fibronectina e colágeno tipo I e III - durante o processo de reparo tecidual. Miofibroblastos são também responsáveis pela síntese de enzimas envolvidas na degradação da matriz tecidual (LORENA et al., 2002). A insulina estimulou a síntese de DNA em culturas de fibroblastos de pele humana *in vitro*, assumindo papel mitogênico (FLIER; USHER; MOSES, 1986). A biomembrana de látex estimulou a fibroplasia em implantes no subcutâneo de camundongos (ANDRADE, 2007; ANDRADE et al., 2011).

A marcação de alfa-actina de músculo liso esteve presente no ânulus (Figura 21E). O ânulus fibrocartilaginoso está conectado com o osso timpânico por tecido conjuntivo especializado. Kuijpers, Peters e Tonnaer (1999) identificaram a presença de miofibroblastos no ânulus timpânico de ratos, que expressaram proteínas do citoesqueleto, entre elas a alfa-actina de músculo liso. Esses autores sugerem que essa rede de fibras e miofibroblastos com propriedades contráteis antagonizam a retração do músculo tensor do tímpano, sendo que a contração deste músculo tensor do tímpano provoca a retração interna da MT. Henson et al. (2005) sugerem que células de músculo liso da região do ânulus timpânico têm influência na manutenção da tensão da MT em mamíferos e/ou no controle do fluxo sanguíneo da MT.

O anticorpo anti-FvW foi utilizado previamente por Hellstrom et al. (2003) em estudo sobre a distribuição de vasos sanguíneos da MT de ratos, o que justificou a escolha desse marcador endotelial. Estatisticamente, não houve diferença de marcação de endotélio vascular entre os grupos Controle, Insulina, Látex e Insulina+Látex por meio do marcador endotelial FvW (Apêndice R). Por outro lado, observou-se, na literatura, que a insulina estimulou a angiogênese em pele de ratos de forma independente da sinalização de VEGF/ VEGFR, mas dependente de receptores de insulina (LIU, PETREACA, MARTINS-GREEN, 2009). Além disso, o Látex estimulou maior angiogênese na cicatrização de esôfago de cães (MRUÉ, 1996, 2000), favoreceu a neoangiogênese em reconstrução conjuntival de coelhos (PINHO et al., 2004) e melhorou o processo de revascularização de MT em

miringoplastias em humanos (OLIVEIRA et al., 2003). Foi constatado aumento de vascularização, quando realizado estudo prospectivo, duplo-cego, randomizado, com 107 pacientes, atribuído ao uso de biomembrana de látex, quando comparado com o uso de membrana de silicone e grupo controle após Timpanoplastia *underlay* (ARAUJO; MASSUDA; HYPPOLITO, 2012). A vascularização foi avaliada por otomicroscopia, sendo atribuída ao enxerto uma classificação semiquantitativa por examinadores que não participaram do procedimento cirúrgico, sem o conhecimento sobre a utilização ou não da membrana de látex (ARAUJO; MASSUDA; HYPPOLITO, 2012).

Pusztaszeri, Seelentag, Bosman (2006) fizeram estudo com os marcadores de células endoteliais CD31, CD34, FvW e Fli-1 em tecidos humanos e verificaram padrões de marcação heterogêneos com variações de positividade de marcadores endoteliais para diferentes órgãos do mesmo indivíduo, e até mesmo em regiões venosas e arteriais do mesmo órgão. Yamamoto et al. (1998) verificaram variações de níveis de RNAm de FvW em diferentes tecidos de rato e em endotélio de leitos venosos e arteriais de mesmo tecido. Rand et al. (1987) identificaram presença de FvW em leitos venosos de endotélio de porcos, o que não aconteceu na maior parte de leitos arteriais desses animais. Devido a essa limitação de análise IHQ de células endoteliais com positividade variada entre os marcadores nos diferentes órgãos, e também em regiões venosas e arteriais no mesmo órgão, seria interessante propor avaliações de outros marcadores endoteliais para se verificar o papel da insulina e do látex na cicatrização de MT em relação à vascularização.

A camada epitelial foi a primeira a fechar a membrana timpânica, o que não torna os eventos das demais camadas menos importantes. No momento em que ocorreu maior proliferação e migração celular, a camada epitelial apresentou maior atividade metabólica, necessitando de suprimento de oxigênio e nutrientes em quantidade maior. (GILES, 2007). Dessa forma, o suprimento vascular aumentado e a angiogênese, ambos ocorrendo na lâmina própria, tiveram papel importante no fornecimento do suprimento molecular necessário para que os eventos cicatriciais se desenvolvessem de forma

satisfatória na MT (JOHNSON; SMALLMAN; KENT, 1990; MAKINO; AMATSU, 1986; MASUTANI et al., 1991). Foi descrito por Hellstrom et al. (2003) que os vasos sanguíneos na região do cabo do martelo e do ânulus timpânico formavam arcadas que se ramificavam em vasos de calibres menores em direção à porção translúcida da MT. As regiões mais vascularizadas da MT, cabo do martelo e ânulus timpânico, foram descritas previamente como sendo os centros proliferativos epiteliais no processo de cicatrização de MT (GUNERI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 1996; SOMERS et al., 1997; TAYLOR; McMINN, 1967).

A lâmina própria é responsável pelas características fibroelásticas da MT, com capacidade de vibração para transmissão sonora e proteção da orelha média. Em alguns casos, a MT neoformada pode cicatrizar com apenas duas camadas, uma epitelial externa e uma mucosa interna, conforme já foi descrito em estudos experimentais (YAMASHITA, 1985). Contudo, é possível que tais neomembranas não apresentem as características ideais de transmissão sonora (O'CONNOR et al., 2008), e nem as características estruturais fibroelásticas que permitam suportar variações de pressões aéreas, como barotraumas ou disfunção tubária, devido à sua estrutura mais frágil que a habitual, por formação deficiente da camada fibrosa. Kristensen (1992) apontou para a possibilidade de ocorrência de atelectasia ou bolsas de retração em neomembranas atróficas por deficiência de camada fibrosa. Para prevenir membranas atróficas por deficiência da lâmina própria, Eken et al. (2007) sugerem que o uso de insulina tópica em perfurações agudas de MT possa ser efetivo porque a insulina aumenta a atividade fibroblástica e a produção do colágeno. Observou-se no presente estudo que a insulina e a biomembrana de látex aumentaram a proliferação de miofibroblastos, e que a insulina também provocou maior formação e melhor arranjo estrutural de colágeno, contribuindo para uma melhor organização da lâmina própria.

Uma limitação deste estudo, em relação à lâmina própria, foi a não mensuração da atividade inflamatória no processo de cicatrização da MT e a não avaliação específica dos efeitos da insulina e do látex na atividade inflamatória. A biomembrana de látex provocou aumento dessa atividade em

um modelo de colesteatoma adquirido em ratos (MASSUDA, 2002) e em implantes subcutâneos dorsais de camundongos (ANDRADE, 2007; ANDRADE, et al., 2011). O papel da insulina na atividade inflamatória é controverso na literatura. Há relatos de que a insulina, atuando por meio do seu receptor e ativando adequadamente a cascata de sinalização, provoque efeito anti-inflamatório em células de músculo liso vascular de ratos diabéticos (ENGBERDING et al., 2009). Por outro lado, a insulina estimulou a migração de neutrófilos, os níveis de IL-1 β , TNF- α e P-selectina quando aplicada no subcutâneo de ratos diabéticos sensibilizados, na fase aguda da reação inflamatória alérgica de vias aéreas (MARTINS et al., 2010a, 2010b). Além disso, a resistência à insulina leva à inflamação e está associada à doença arterial periférica de pacientes (PANDE et al., 2008) e à aterosclerose (ENGBERDING et al., 2009).

A maior espessura fibrosa do GlnsLat em relação ao Glns com três, cinco e sete dias e do GLat em relação ao Glns com sete dias (Figura 24) pode ter ocorrido por causa da atividade inflamatória, que não foi avaliada por este estudo. Esta diferença não pode ser justificada pela marcação de miofibroblastos (Figura 32), ou de colágeno tecidual (Figura 29), ou ainda, pela marcação de vasos sanguíneos pelo FvW (Figura 33). Estudos prévios com a membrana de látex sugerem que o mesmo tenha aumentado a atividade inflamatória no processo de cicatrização (ANDRADE, 2007; ANDRADE, et al., 2011; MASSUDA, 2002). Estudo recente determinou que o uso de insulina tópica em feridas excisionais de ratos provocou infiltração inicial avançada de macrófagos, seguida de resolução antecipada da atividade inflamatória, sendo a insulina um potente acelerador da cicatrização (CHEN; LIU; ZHANG, 2012). Assim, a insulina estimularia inflamação com três e cinco dias, favorecendo o aumento da espessura fibrosa da MT no Glns, e, na sequência, colaboraria para a resolução da atividade inflamatória após sete dias, reduzindo a espessura da MT neste grupo (Figura 24). Para elucidar o efeito da insulina e do látex na atividade inflamatória da MT, outros estudos serão necessários.

A associação insulina mais látex, quando comparada ao GCon, favoreceu a antecipação da cicatrização da MT (Figura 26), estimulando

precocemente a espessura epitelial (Figura 23) e fibrosa (Figura 24), aumentando a marcação da panqueratina (Figura 31) e da alfa actina de músculo liso (Figura 32). No entanto, a associação de insulina mais látex não foi superior ao uso dessas variáveis isoladamente, o que pode ter ocorrido se a membrana de látex não for a matriz ideal de liberação lenta para a insulina. A biomembrana de látex pode ter atuado como suporte vetorial, o que favoreceu a proliferação epitelial (Figuras 23 e 31), estimulando a espessura fibrosa (Figura 24), a proliferação de miofibroblastos (Figura 32); e antecipando o fechamento da perfuração traumática da MT (Figura 26). No entanto, a membrana de látex pode não ter potencializado a insulina, que é uma proteína com meia vida curta, e que precisaria de um meio de liberação lenta para que o seu efeito fosse potencializado. Hrynyk et al. (2010) observaram que a insulina associada a uma matriz de liberação lenta formada por microesferas de PLGA provocaram a migração de células de queratinócitos humanos *in vitro* de forma mais rápida do que o grupo controle de insulina sem matriz liberadora. O fator de crescimento liberado lentamente criaria o gradiente para o crescimento tecidual na direção da fonte liberadora (FERRE-SOUZA, 2007). As células epiteliais, endoteliais, os miofibroblastos e os demais constituintes da cicatrização seriam estimulados a se proliferar na direção da fonte liberadora. Tal processo de regeneração ocorreria ao longo de alguns dias, ao contrário da meia vida biológica da insulina, que é curta, em torno de 5 a 10 minutos.

Na cicatrização da MT, as matrizes de liberação de fator de crescimento foram utilizadas previamente. Kato e Jackler (1996) utilizaram FGF marcado com iodo radioativo e verificaram que membrana de Gelfoam atuou como matriz de liberação lenta do FGF, com 78% de radioatividade no sítio de aplicação 48 horas após o seu uso, e potencializou a cicatrização de perfurações crônicas em chinchilas. Por outro lado, o uso de Gelfoam associado a FGF foi desencorajado por Fina, Baird e Ryan (1993), pois eles verificaram que o mesmo esteve associado a maior tecido inflamatório de orelha média em cobaias. Em outro estudo, Kanemaru et al. (2011) observaram que o FGF aplicado sobre esponja de gelatina derivada de colágeno e coberta com cola de fibrina aceleraram a cicatrização de 96% das perfurações crônicas

de 48 pacientes. Os autores ressaltaram que a esponja de gelatina, além de atuar como suporte de regeneração tecidual, também serviu como matriz de liberação lenta de FGF. Uma matriz de liberação ideal deve se ajustar tridimensionalmente ao tecido a ser regenerado (KANEMARU et al., 2011), deve ser inerte, biocompatível, mecanicamente forte, de baixo custo, confortável para o paciente, capaz de carregar altas cargas de drogas, simples para administração e remoção e fácil de fabricar e esterilizar (FERRE-SOUZA, 2007).

Foram observadas diferenças dentro de cada grupo ao longo do tempo de evolução de três, cinco e sete dias em relação às variáveis epitelial, fibrosa, mucosa e perfuração. A escolha desses dias foi previamente utilizada por Guneri et al. (2003) justificada pelas fases de cicatrização: inflamatória, proliferativa e de remodelação (Figura 3). O ideal seria que os animais fossem avaliados durante todos os dias após a perfuração timpânica. Por outro lado, limitar os tempos de observação não comprometeu a avaliação das diferentes fases de cicatrização. Do ponto de vista da Bioética, é importante a maior preservação dos animais que permitam a obtenção de resultados experimentais consistentes.

Em relação à Área e ao Perímetro da secção transversal da MT, houve aumento de área e de perímetro com pico com cinco dias e remodelação com sete dias no GIns e no GInsLat (Figuras 27 e 28). No GCon e no GLat houve aumento da Área e do Perímetro ao longo dos sete dias. O comportamento da Área e do Perímetro no GIns e no GInsLat foi semelhante aos já explicados para as variáveis de espessura epitelial, fibrosa, mucosa e tem relação com o fechamento da MT com cinco dias e remodelação com sete dias. O comportamento no GCon também se repetiu em relação às demais variáveis, com fechamento com sete dias e manutenção de maior atividade proliferativa até sete dias, sendo a remodelação mais tardia. No GLat, como 20% das perfurações timpânicas ainda não estavam cicatrizadas com sete dias, talvez tenha sido esta a razão da Área e do Perímetro ainda permanecerem elevados neste último período de observação. Outra justificativa talvez tenha relação

com a influência da biomembrana de látex na atividade inflamatória tecidual, levando a maiores valores de Área e Perímetro com sete dias.

A variável Área não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos (Apêndice G). Essa variável foi importante para o cálculo da porcentagem da área de birrefringência do colágeno tecidual (Figura 29) e da porcentagem de área corada com cromógeno DAB, identificando os anticorpos anti-panqueratina, anti-alfa-actina de músculo liso e anti-FvW (Figuras 31, 32 e 33, respectivamente). Não havendo diferenças de Área entre os grupos, isso fez com que as diferenças de porcentagem de birrefringência do colágeno e de área corada com DAB fossem decorrentes da variável em estudo, e não significativamente afetadas pelo viés da Área da MT.

A técnica de IHQ foi utilizada para identificação dos anticorpos anti-panqueratina, anti-alfa-actina de músculo liso e anti-FvW. Em seguida, foi realizada a análise de imagens assistidas por computador para comparação semiquantitativa dos grupos de tratamento com o GCon em relação à intensidade da coloração da variável estudada. Segundo Taylor e Levenson (2006), essa comparação semiquantitativa é possível quando o material analisado é submetido às mesmas técnicas de confecção e análise, e seus resultados são relativos a essa análise.

A IHQ está na quarta década de uso em tecidos fixados com formalina e embebidos em parafina. Essa técnica é não-destrutiva, e a informação obtida tem relação com a morfologia de organelas celulares e protéicas, mantendo a estrutura tecidual. Por outro lado, para as demandas de análise científica, não é suficiente detectar que a coloração esteja presente; mas a questão é quanto da coloração está presente (TAYLOR; LEVENSON, 2006), ou melhor, quanto do antígeno marcado está presente.

Variações subjetivas inter-observador de processos de escores semiquantitativos visuais, para estimar intensidade ou porcentagem de positividade IHQ, podem ocorrer de patologista para patologista, ou mesmo, variações intra-observador - para o mesmo patologista - ao longo de momentos diferentes de avaliações. Métodos de imagem automatizados de avaliação e adequadamente desenvolvidos podem, em situações ideais, ser imunes às

consequências de fadiga e subjetividade, superando o erro humano relacionado à precisão e reprodutibilidade quantitativa. Estudos comparativos mostram que, sob circunstâncias controladas, análises de imagens computadorizadas podem ser superiores a métodos manuais em determinadas situações não controladas (TAYLOR; LEVENSON, 2006).

A peroxidase da raiz de rábano (HRP) é uma enzima marcadora usada com frequência na IHQ. O cromógeno DAB, seguido por contra-coloração de hematoxilina, podem ser usados para identificar o antígeno marcado com HRP. O DAB reage com HRP e fornece uma coloração marrom, e a hematoxilina fornece uma contra-coloração tecidual azul (BREY et al., 2003). Quando os dados de imagem transmitidos são convertidos em unidades de densidade óptica, a linearidade é restabelecida, permitindo a separação de colorações (RUIFROK; JOHNSTON, 2001), ou seja, o isolamento do sinal óptico de cada cromógeno, e sua posterior quantificação, podem ser atingidos com sucesso. O desafio da quantificação é a separação do cromógeno DAB da contra-coloração hematoxilina. Segundo Taylor e Levenson (2006), essa associação pode ser separada com sucesso usando imagens RGB se houver conversão para densidade óptica, como indicado por Ruifrok e Johnston (2001).

Brey et al. (2003) desenvolveram um estudo de comparação de oito métodos automatizados de análise de imagens conhecidos, comparando o grau de concordância de cada um desses métodos com a análise manual de dois observadores diferentes, sendo esta análise considerada padrão-ouro. Dezoito imagens coradas com DAB foram utilizadas, as quais apresentavam variações de níveis de proteínas. A acurácia foi calculada com porcentagem de *pixels* classificados erroneamente, usando técnicas automatizadas comparadas com análises manuais de porcentagem de área corada com DAB no tecido. O método de deconvolução de colorações descrito por Ruifrok e Johnston (2001) foi tão acurado quanto o manual, considerado como padrão-ouro, com baixo nível de *pixels* classificados erroneamente. Brey et al. (2003) realizaram a validação do método de deconvolução de cores para avaliar a porcentagem de área corada com DAB no tecido. Dessa forma, utilizou-se neste estudo o método de deconvolução de cores para análise de imagens assistidas por

computador para comparação semiquantitativa dos grupos de tratamento com o GCon em relação à porcentagem de área corada com cromógeno DAB, que identificou os anticorpos primários pesquisados.

Em estudo recente, o método “*color deconvolution*” (RUIFROK; JOHNSTON, 2001) foi comparado com o método ELISA na detecção da substância P, um neurotransmissor, em parênquimas cerebrais de ratos e permitiu estimar de forma confiável, e em concordância com o método ELISA, a quantidade de antígeno visualizado (HELPS et al., 2012).

A insulina, em perfurações timpânicas traumáticas, acelerou a cicatrização da MT (Figura 26), estimulou precocemente a espessura epitelial (Figura 23) e fibrosa (Figura 24), com maior formação de colágeno tecidual (Figura 29), melhor organizado em feixes de fibras colágenas mais espessas (Figura 30), contribuindo para o aumento de marcação pela panqueratina (Figura 31) e pela alfa-actina de músculo liso (Figura 32).

Uma manifestação clínica frequentemente observada no diabetes é o reparo tecidual deficiente (LIMA et al., 2012; VRABEC, 1998). Linhagens de ratos geneticamente diabéticos apresentaram tempo de cicatrização de MT prolongado quando comparados com ratos não diabéticos e ratos com diabetes induzida por streptozotocina (VRABEC, 1998). Uma extensão da linha de pesquisa deste estudo seria a investigação dos efeitos da insulina na cicatrização de MT de ratos diabéticos.

Para iniciar as investigações do mecanismo de ação da insulina na MT, é necessário elucidar a presença do receptor da insulina e, para isso, teria que se utilizar anticorpo anti-receptor de insulina para confirmar sua presença na camada epitelial externa, em células da lâmina própria ou na camada mucosa da MT. Já foram identificados receptores de outros fatores de crescimento em MT (MA; ZHAO; ZHOU, 2002), porém não foram identificados estudos que descrevessem receptores de insulina em MT. Como exemplo de identificação do receptor da insulina em tecido humano, Rocha et al. (2002) utilizaram anticorpo anti-subunidade β do receptor da insulina em superfície ocular de pacientes, sendo detectada a presença desse receptor em células de epitélio de córnea e de conjuntiva, sugerindo o papel da insulina na superfície ocular.

A insulina foi testada quanto à sua ototoxicidade, quando aplicada em orelhas médias de ratos via transtimpânica, e não provocou lesão ototóxica às células ciliadas do Órgão de Corti. A citoarquitetura ciliar foi avaliada por meio de microscopia eletrônica de Varredura, e a análise funcional foi testada por emissões otoacústicas produto de distorção e por potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PIAIA; HYPPOLITO, 2011).

A Insulina Humana Regular Novolin ® R é fornecida pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para tratamento do Diabetes Melitus. Ela é aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso subcutâneo e endovenoso, sem referências a efeitos carcinogênicos (LIU et al., 2009).

Sobre a relação de insulinoterapia e câncer, Wolf et al. (2005) comentaram que não há associação do tratamento com insulina para Diabetes com o risco para câncer de mama; sem relação com duração do tratamento e nem com a dose da insulina. Outros autores também não observaram relação de aumento de câncer de mama com Diabetes tipo I, que necessariamente utiliza tratamento de insulina a longo prazo (HJALGRIM et al., 1997; ZENDEHDEL et al., 2003). Comparando pacientes não diabéticos com diabéticos, Kath et al. (2000) verificaram que não havia relação de risco alterado para malignidade em função da dosagem e nem da duração de insulinoterapia.

Por outro lado, há estudos que discutem a associação de hiperinsulinismo com câncer colorretal, quando associado ao Diabetes tipo II, resistência à insulina, obesidade e aumento da biodisponibilidade de IGF-I. O IGF-I tem papel antiapoptótico (SANDHU; DUNGER; GIOVANNUCCI, 2002). Foram identificadas regiões diferentes dos receptores de IGF-I e insulina, onde os primeiros eram capazes de gerar efeitos antiapoptóticos em sua forma de genótipo selvagem (CHEN; YAN; GISHIZKY, 1998).

Gunter et al. (2009) descreveram em seu estudo prospectivo controlado, que a hiperinsulinemia, quando associada ao Diabetes tipo II e à síndrome metabólica, é um fator de risco independente para câncer de mama pós menopausa. Vigneri et al. (2009), em correspondência aos autores do estudo prospectivo controlado citado, argumentaram que a insulina pode provocar

proliferação celular do câncer de mama, por exercer atividade mitogênica. Mas, não há evidência de que a insulina promova a iniciação do câncer de mama, ou seja, ela não apresenta atividade mutagênica descrita. Ressaltaram também que a associação da hiperinsulinemia seria na progressão de células tumorais pré-existentes e não no efeito da insulina causando início de câncer de mama. Foi destacado que essa hiperinsulinemia estaria relacionada ao Diabetes tipo II, associada com obesidade, maior biodisponibilidade de IGF-I, presença de receptores de insulina híbridos com afinidade aumentada para IGF-I, sedentarismo e dieta não balanceada.

Como já existe patente de creme de insulina para lesões ulceradas de pele em pacientes diabéticos (LIMA et al., 2012; LIMA; SAAD, 2009) e de colírio de insulina para xerofthalmia (ROCHA et al., 2004, 2005), é aconselhado que tais produtos não sejam aplicados em lesões onde haja a possibilidade de células tumorais. Seriam evitadas as lesões pós-cirurgias oncológicas ou pós-radioterapia, por exemplo, por causa do efeito potencial da insulina como mitogênico. A segurança da administração tópica da insulina na cicatrização timpânica ainda precisaria ser testada em perfurações crônicas e modelos de colesteatomas antes de serem iniciados os estudos clínicos em humanos.

A biocompatibilidade e as propriedades de regeneração tecidual do látex natural (FRADE et al., 2001; FRADE, 2003; FRADE et al., 2006; MRUÉ et al., 2004) permitiram o reconhecimento desta biomembrana pela autoridade governamental brasileira reguladora em saúde (ANVISA) para tratamento de úlceras cutâneas crônicas, sob patente de número PI0405995-6 (MRUÉ; COUTINHO-NETTO, 2005, 2006).

Avaliando o mecanismo de cicatrização habitual da MT, observou-se que o processo de cicatrização se iniciou na camada epitelial externa, com posterior regeneração da lâmina própria e da camada mucosa. A insulina e a biomembrana de látex natural aceleraram o processo de cicatrização traumática de MT; anteciparam o fechamento da camada epitelial externa, sem causar sua estimulação demasiada em direção à orelha média; estimularam os processos cicatriciais que ocorrem na lâmina própria, de forma madura, segura e eficaz, com o aumento da espessura da camada fibrosa e proliferação de

miofibroblastos. No caso da insulina, também houve maior formação de colágeno e os feixes de fibras colágenas apresentaram-se mais espessos e melhor organizados.

7. CONCLUSÕES

Como efeitos dos diferentes tratamentos propostos em perfurações traumáticas de MTs, verificou-se que:

- 1) A insulina e a biomembrana de látex natural, de forma isolada e em associação, aceleram o processo de cicatrização de perfurações traumáticas de MTs.
 - 1.1) A associação insulina mais látex não foi superior ao uso isolado desses tratamentos.
- 2) A insulina e a biomembrana de látex natural anteciparam o fechamento da camada epitelial externa da MT, promovendo a sua proliferação precoce;
- 3) A insulina e a biomembrana de látex natural promoveram o aumento precoce da espessura da camada fibrosa e maior proliferação de miofibroblastos na lâmina própria da MT.
 - 3.1) A insulina, isoladamente, provocou maior formação do colágeno tecidual, com fibras colágenas mais espessas e melhor organizadas.
 - 3.2) A insulina e a biomembrana de látex, isoladamente ou em associação, não aumentaram a vascularização da MT em cicatrização de perfurações traumáticas, quando analisadas pela identificação do anticorpo anti-FvW como marcador endotelial.
- 4) Não foi possível definir o papel dos tratamentos propostos sobre a camada mucosa da MT, por meio da avaliação da espessura dessa camada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, A. A. S.; ROSSATO, M.; OLIVEIRA, J. A. A.; HYPPOLITO, M. A. Conhecimento da anatomia da orelha de cobaias e ratos e sua aplicação na pesquisa otológica básica. **Rev Bras Otorrinolaringol**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 1, p. 43-49, Jan/Fev. 2009.

ALMEIDA JR., H. L. Citoqueratinas/ Cytokeratins. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 2, p. 135-145, Mar./Apr. 2004.

AMOILS, C. P.; JACKLER, R. K.; LUSTIG, L. R. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor. **Otolaryngology – Head and Neck Surgery**, Rochester, v.107, n. 5, p. 669-683, 1992.

ANANDACOOMARASWAMY, K. S.; DUTTON, N.; RAJAN, G. P.; EIKELBOOM, R. H.; ATLAS, M. D.; ROBERSON, T. Utilization of fresh human tympanic membranes for structural analysis and cytokeratin immunocytochemistry implementing resin techniques. **Acta Otolaryngologica**, Stockholm, v. 126, n. 2, p. 149-153, Feb. 2006.

ANDRADE, T. A. M. **Atividade da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na neoformação tecidual em camundongos**. 2007. 138f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

ANDRADE, T. A. M.; IYER, A.; DAS, P. K.; FOSS, N. T.; GARCIA, S. B.; COUTINHO-NETTO, J.; JORDÃO-Jr., A. A.; FRADE, M. A. C. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 10, p. 1036-1047, Oct. 2011.

APIKOGLU-RABUS, S.; IZZETTIN, F. V.; TURAN, P.; ERCAN, F. Effect of topical insulin on cutaneous wound healing in rats with or without acute diabetes. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 180-185, March. 2010.

ARAUJO, M. M.; MASSUDA, E. T.; HYPPOLITO, M. A. Anatomical and functional evaluation of tympanoplasty using a transitory natural latex biomembrane implant from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 27, n. 8, p. 566-571. Ago. 2012.

ARONHEIM, A.; ENGELBERG, D.; LI, N.; AL-ALAWI, N.; SCHLESSINGER, J.; KARIN, M. Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. **Cell**, Cambridge, v. 78, n. 6, p. 949-961, Sep. 1994.

BLUNDELL, T. L.; HUMBEL, R. E. Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. **Nature**, London, v. 287, n. 5785, p. 781-787, Oct 30. 1980.

BRANDÃO, M.L. **Análise comparativa entre um novo substituto vascular derivado do látex da seringueira (Hevea brasiliensis) e uma prótese vascular de politetrafluoretileno expandido implantadas em artérias femorais de cães.** 2006. 170f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

BREY, E. M.; LALANI, Z.; JOHNSTON, C.; WONG, M.; McINTIRE, L. V.; DUKE, P. J.; PATRICK, C. W. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. **J Histochem Cytochem**, Baltimore, v. 51, n. 5, p. 575-584, May. 2003.

BURGERING, B. M.; COFFER, P. J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. **Nature**, London, v. 376, n. 6541, p. 599-602. Aug. 1995.

CASTAGNO, L. A. **Cicatrização da membrana timpânica na timpanocentese com laser de argônio comparado a técnica com microlanceta:** estudo experimental em ratos. 2003. 68f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2003.

CHANDRASEKHAR, S.; HOUSE, J. W.; DEVGAN, U. Pediatric tympanoplasty: a 10 year experience. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, Chicago, v. 121, n. 8, p. 873-878, Aug. 1995.

CHAUVIN, KATHY; BRAITON, CLAY; PARKINS, C. Healing large tympanic membrane perforations using hyaluronic acid, basic fibroblast growth factor, and epidermal growth factor. **Otolaryngol Head and Neck Surgery**, Rochester, v. 121, n. 1, p. 43-47, July. 1999.

CHEN, H.; YAN, G. C.; GISHIZKY, M. L. Identification of structural characteristics that contribute to a difference in antiapoptotic function between human insulin and insulin-like growth factor 1 receptors, **Cell Growth Differ**, Philadelphia, v. 9, n. 11, p. 939- 947, Nov. 1998.

CHEN, X.; LIU, Y.; ZHANG, X. Topical insulin application improves healing by regulating the wound inflammatory response. **Wound Repair Regeneration**, Saint Louis, v. 20, n. 3, p. 425- 434, May. 2012.

COHEN, J. L.; JORIZZO, J. L.; KIRCIK, L. H. Use of a topical emulsion for wound healing. **J Support Oncol**, Huntington, v. 5, n. 10 Suppl 5. p. 1-9, Nov-Dec. 2007.

COSTA, S. S.; CRUZ, O. L. M.; KLUWE, L. H. S.; SMITH, M. M.. Timpanoplastias. In: CRUZ, O. L. M.; COSTA, S. S.. **Otologia clínica e cirúrgica**. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. Cap 14, p.245-270.

DAUGHADAY, W. H.; HALL, K.; RABEN, M. S.; SALMON, W. D. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature*, London, v. 235, n. 5333, p. 107, Jan 14. 1972.

DAYAN, D.; HISS, Y.; HIRSHBERG, A.; BUBIS, J. J.; WOLMAN, M. Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry**, Berlin, v. 93, n. 1, p. 27-29, 1989.

DOMINGOS, A. L. A. **Estudo da biocompatibilidade da membrana de látex natural nas ampliações vesicais em coelhos**. 2008. 81f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

DVORAK, D. W.; ABBAS, G.; ALI, T.; STEVENSON, S.; WELLING, B. Repair of chronic tympanic membrane perforations with long-term epidermal growth factor. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 105, n. 12 Pt 1, p. 1300- 1304, Dec. 1995.

EKEN, M.; ATES, G.; SANLI, A.; EVREN, C.; BOZKURT, S. The effect of topical insulin application on the healing of acute tympanic membrane perforations: a histopathologic study. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, Heidelberg, v. 264, n. 9, p. 999-1002, Sep. 2007.

ELLSWORTH, D. L.; HEWETT-EMMETT, D.; LI, W. H. Evolution of base composition in the insulin an insulin-like growth factor genes. **Mol Biol Evol**, Chicago, v. 11, n. 6, p. 875-885, Nov. 1994.

ENGBERDING, N.; SAN MARTIN, A.; MARTIN-GARRIDO, A.; KOGA, M.; POUNKOVA, L.; LYONS, E.; LASSEGUE, B.; GRIENDLING, K. K. Insulin-like growth factor 1 receptor expression masks the anti-inflammatory and glucose uptake capacity of insulin in vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, Dallas, v. 29, n. 3, p. 408-415, Mar. 2009.

FACCINI, V. C. G. **Miringotomia pelo método de microeletrocautério por radiofrequência associado à mitomicina em modelo animal**. 2007. 41f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FERRE-SOUZA, V. **Liberção controlada do fator de crescimento angiogênico extraído do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*, encapsulado em microesferas de ácido hialurônico para utilização na terapia angiogênica e engenharia tecidual**. 2007. 123f. Dissertação de Mestrado – Área de concentração: Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FINA, M.; BAIRD, A.; RYAN, A. Direct application of basic fibroblast growth factor improves membrane perforation healing. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 103, n. 7, p. 804-809, Jul. 1993.

FLIER, J. S.; USHER, P.; MOSES, A. C. Monoclonal antibody to the type I insulin-like growth factor (IGF-I) receptor blocks IGF-I receptor mediated DNA synthesis: clarification of the mitogenic mechanisms of IGF-I and insulin in human skin fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 83, n. 3, p. 664-668, Feb. 1986.

FRADE, M. A.; VALVERDE, R. V.; ASSIS, R. V.; COUTINHO-NETTO, J.; FOSS, N. T. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. **Int J Dermatol**, Philadelphia, v. 40, n. 3, p. 238-240, Mar. 2001.

FRADE, M. A. C. **Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico da cicatrização na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. 2003. 164f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

FRADE, M. A. C.; CURSI, I. B.; ANDRADE, F. F.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBETTA, F. M.; FOSS, N. T. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, Barcelona, v. 32, n. 4, p. 157-162, Jan-Feb. 2004.

FRADE, M. A. C.; SALATHIEL, A. M.; MAZZUCATO, E. L.; COUTINHO-NETTO, J.; FOSS, N. T. A natural biomembrane as a new proposal for the treatment of pressure ulcers. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, Barcelona, v. 34, n. 3, p. 133-138. May-Jun. 2006.

GILES, B. Wound healing in spontaneous perforation or myringotomy and middle ear reconstruction. **Ear, Nose & Throat Journal**, New York, v. 86, Suppl 1, p. 30-32, Nov. 2007.

GLADSTONE, H. B.; JACKLER, R. K.; VARAV, K. Tympanic membrane wound healing - an Overview. **Otolaryngologic Clinics of North America**, Philadelphia, v. 28, n. 5, p. 913-932, Oct. 1995.

GOLZ, A.; GOLDENBERG, D.; NETZER, A.; FRADIS, M.; WESTERMAN, S. T.; WESTERMAN, L. M.; JOACHIMS, H. Z. Paper patching for chronic tympanic membrane perforations. **Otolaryngol Head Neck Surg**, Rochester, v. 28, n. 4, p. 565- 570, Apr. 2003.

GREENWAY, S. E.; FILLER, L. E.; GREENWAY, F. L. Topical insulin in wound healing: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Journal of Wound Care**, London, v. 8, n. 10, p. 526-528, Nov. 1999.

GRIFFIN, W. L. A retrospective study of traumatic tympanic membrane perforations in a clinical practice. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 82, n. 2, Pt 1, p. 261-282, Feb. 1979.

GUNERI, E. A.; TEKIN, S.; YILMAZ, O.; OZKARA, E.; ERDAG, T. K.; IKIZ, A. O.; SARIOGLU, S.; GUNERI, A. The effects of hyaluronic acid, epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. **Otol Neurotol**, Hagerstown, v. 24, n. 3, p. 371-376, May. 2003.

GUNTER, M. J.; HOOVER, D. R.; YU, H.; WASSERTHEIL-SMOLLER, S.; ROHAN, T. E.; MANSON, J. E.; LI, J.; HO, G. Y.; XUE, X.; ANDERSON, G. L.; KAPLAN, R. C.; HARRIS, T. G.; HOWARD, B. V.; WYLIE-ROSETT, J.; BURK,

R. D.; STRICKLER, H. D. Insulin, insulin-like growth factor-I, and risk of breast cancer in postmenopausal women. **J Natl Cancer Inst**, Cary, v. 101, n. 1, p. 48-60, Jan. 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. H. Insulina, Glucagon e Diabete Melito. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. 10^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap 78, p. 827-840.

HAKUBA, N.; TANIGUCHI, M.; SHIMIZU, Y.; SUGIMOTO, A.; SHINOMORI, Y.; GYO, K. A new method for closing tympanic membrane perforations using basic fibroblast growth factor. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 113, n. 8, p. 1352-1355, Aug. 2003.

HAKUBA, N.; IWANAGA, M.; TANAKA, S.; HIRATSUKA, Y.; KUMABE, Y.; KONISHI, M.; OKANOUE, Y.; HIWATASHI, N. WADA, T. Basic fibroblast growth factor combined with atelocollagen for closing chronic tympanic membrane perforations in 87 patients. **Otol Neurotol**, Hagerstown, v. 31, n. 1, p. 118-121, Jan. 2010.

HANAM, S. R.; SINGLETON, C. E.; RUDEK, W. The effect of topical insulin on infected cutaneous ulcerations in diabetic and nondiabetic mice. **J Foot Surg**, Baltimore, v. 22, n. 4, p. 298-301, Winter. 1983.

HELLSTROM, S.; SPRATLEY, J.; ERIKSSON, P. O.; PAIS-CLEMENTE, M. Tympanic membrane vessel revisited: a study in an animal model. **Otol Neurotol**, Hagerstown, v. 24, n. 3, p. 494-499, May. 2003.

HELPS, S. C.; THORNTON, E.; KLEINIG, T. J.; MANAVIS, J.; VINK, R. Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, Hagerstown, v. 20(1):82-90, Jan. 2012.

HENSON, M. M.; MADDEN, V. J.; RASK-ANDERSEN, H.; HENSON, O. W. Smooth muscle in the annulus fibrosus of the tympanic membrane in bats, rodents, insectivores, and humans. **Hearing Research**, Amsterdam, v. 200, n. 1-2, p. 29-37, Feb. 2005.

HILL, C. S.; TREISMAN, R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. **Cell**, Cambridge, v. 80, n. 2, p. 199-211, Jan. 1995.

HINTZ, R. L.; CLEMMONS, D. R. Competitive binding of somatomedin to the insulin receptors of adipocytes, chondrocytes, and liver membranes. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 69, n. 8, p. 2351-2353, Aug. 1972.

HJALGRIM, H.; FRISCH, M.; EKBOM, A.; KYVIK, K. O.; MELBYE, M.; GREEN, A. Cancer and diabetes – a follow-up study of two population-based cohorts of diabetic patients. **J Intern Med**, Oxford, v. 241, n. 6, p. 471-475, Jun. 1997.

HOM, D. B. Growth factors in wound healing. **Otolaryngologic Clinics of**

HOM, D. B.; SUN, G. H.; ELLURU, R. G. A contemporary review of wound healing in Otolaryngology: current state and future promise. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 119, n. 11, p. 2099-2110, Nov. 2009.

HONGYING, C.; YAN, G. C.; GISHIZKY, M. L. Identification of structural characteristics that contribute to a difference in antiapoptotic function between human Insulin and Insulin-like Growth Factor I responses. **Cell Growth & Differentiation**, Birmingham, v. 9, p. 939-947, Nov. 1998.

HRYNNYK, M.; MARTINS-GREEN, M.; BARRON, A. E.; NEUFELD, R. J. Sustained prolonged topical delivery of bioactive human insulin for potential treatment of cutaneous wounds. **International Journal of Pharmaceutics**, London, v. 398, n. 1-2, p. 146-154, Oct. 2010.

JOHNSON, A. P.; SMALLMAN, L. A.; KENT, S. E. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations: a two-dimensional histological study in Guinea Pigs. **Acta Otolaryngol (Stockh)**, Stockholm, v. 109, n. 5-6, p. 406-415, May-Jun. 1990.

JOHNSON, A.; HAWKE, M. The function of migratory epidermis in the healing of tympanic membrane perforations in guinea-pig. A photographic study. **Acta Otolaryngol (Stockh)**, Stockholm, v. 103, n. 1-2, p. 81-86, Jan-Feb. 1987.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius red staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, London, v. 11, n. 4, p. 447-455, Jul. 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U.; COSSERMELLI, W. S.; BRENTANI, R. R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn**, Okayama, v. 41, n. 3, p. 267-274, Jun. 1978.

JUNQUEIRA, L. C.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. **Histochemistry**, Berlin, v. 74, n. 1, p. 153-156, 1982.

KAFTAN, H.; HERZOG, M.; MIEHE, B.; HOSEMANN, W. Topical application of transforming growth factor- β 1 in acute traumatic tympanic membrane perforations: an experimental study in rats. **Wound Repair and Regeneration**, Saint. Louis, v. 14, n. 4, p. 453-456, Jul-Aug. 2006.

KANEMARU, S.; UMEDA, H.; KITANI, Y.; NAKAMURA, T.; HIRANO, S.; ITO, J. Regenerative treatment for tympanic membrane perforation. **Otol Neurotol**, Hagerstown, v. 32, n. 8, p. 1218-1223, Oct. 2011.

KATH, R.; SCHIEL, R.; MULLER, U. A.; HOFFKEN, K. Malignancies in patients with insulin-treated diabetes mellitus. **J Cancer Res Clin Oncol**, Berlin, v. 126, n. 7, p. 412-417, Jul. 2000.

KATO, M.; JACKLER, R. K. Repair of chronic tympanic membrane perforations with fibroblast growth factor. **Otolaryngol Head Neck Surg**, Rochester, v. 115, n. 6, p. 538-547, Dec. 1996.

KIM, J.; KIM, C. H.; PARK, C. H.; SEO, J. N.; KWEON, H. Y.; KANG, S. W.; LEE, K. G. Comparison of methods for the repair of acute tympanic membrane perforations: Silk patch vs. paper patch. **Wound Repair and Regeneration**, Saint Louis, v. 18, n. 1, p. 132-138, Jan-Feb. 2010.

KNUTSSON, J.; BAGGER-SJOBACK, D.; von UNGE, M. Distribution of different collagen types in the rat's tympanic membrane and its suspending structures. **Otol Neurotol**, Hagerstown, v. 28, n. 4, p. 486-491, Jun. 2007.

KOBA, R. Epidermal cell migration and healing of the tympanic membrane: an immunohistochemical study of cell proliferation using bromodeoxyuridine labelling. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, St. Louis, v. 104, n. 3, p. 218-225, Mar. 1995.

KOBA, R.; YAGI, M.; TABE, H.; KAWABATA, I. Kinetic analysis of cell proliferation using Bromodeoxyuridine labeling *in situ* detection of dying cells in the tympanic membrane and middle ear cholesteatoma. **Arch Histol Cytol**, Niigata, v. 59, n. 4, p. 339-346, Oct. 1996.

KOOPMANN, C. F. JR. Cutaneous wound healing. **Otolaryngologic Clinics of North America**, Philadelphia, v. 28, n. 5, p. 835-845, Oct. 1995.

KRISTENSEN, S. Spontaneous healing of traumatic tympanic membrane perforations in man: A century of experience. **J Laryngol Otol**, London, v. 106, n. 12, p. 1037-1050, Dec. 1992.

KRISTENSEN, S.; JUUL, A.; GAMMELGAARD, N. P.; RASMUSSEN, O. R. Traumatic tympanic membrane perforations: Complications and Management. **Ear Nose Throat J**, New York, v. 68, n. 7, p. 503-516, Jul. 1989.

KUIJPERS, W.; PETERS, T. A.; TONNAER, E. L. G. M. Nature of the tympanic membrane insertion into the tympanic bone of the rat. **Hearing Research**, Amsterdam, v. 128, n. 1-2, p. 80-88, Feb. 1999.

LIM, D. J. Tympanic membrane. Electron microscopic observation. I: pars tensa. **Acta Otolaryngol**, Stockholm, v. 66, n. 3, p. 181-198, 1968.

LIM, D. J. Human tympanic membrane. **Acta Otolaryngol**, Stockholm, v. 70, n. 3, p. 176-186, Sep. 1970.

LIM, D. J. Structure and function of the tympanic membrane: a review. **Acta Otorhinolaryngol Belg**, Bruxelles, v. 49, n. 2, p. 101-115, 1995.

LIMA, M. H. M.; SAAD, M. J. A. **Processo de obtenção de uma preparação farmacêutica, preparação farmacêutica e seu uso como medicamento para lesões ulceradas**. PI0705370-3A2, 22 dez. 2009.

LIMA, M. H. M.; CARICILLI, A. M.; ABREU, L. L.; ARAUJO, E. P.; PELEGRINELLI, F. F.; THIRONE, A. C. P.; TSUKUMO, D. M.; PESSOA, A. F. M.; SANTOS, M. F.; MORAES, M. A.; CARVALHEIRA, J. B. C.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. A. Topical insulin accelerates wound healing in diabetes by enhancing the AKT and ERK pathways: a double-blind placebo-controlled clinical trial. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 1-13, May. 2012.

LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; WOLFINGER, R. D. SAS system for mixed models, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1996.

LITTON, W. B. Epithelial migration over tympanic membrane and external canal. **Arch Otolaryngol**. Chicago, v. 77, p. 254- 257, Mar. 1963.

LITTON, W. B. Epidermal migration in the ear: The location and characteristics of the generation center revealed by utilizing radioactive desoxyribose nucleic acid precursor. **Acta Otolaryngologica (Suppl.)**, Stockholm, v. 240, p. 5-39, 1968.

LIU, Y.; PETREACA, M.; MARTINS-GREEN, M. Cell and molecular mechanisms of insulin-induced angiogenesis. **J. Cell. Mol. Med**, Bucharest, v. 13, n. 11-12, p. 4492-4504, Nov-Dec. 2009.

LIU, Y.; PETREACA, M.; YAO, M.; MARTINS-GREEN, M. Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. **BioMedCentral Cell Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 1-15, Jan. 2009.

LORENA, D.; UCHIO, K.; COSTA, A. M. A.; DESMOULIÈRE, A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. **Wound Repair and Regeneration**, Saint Louis, v. 10, n. 2, p. 86-92, March-April. 2002.

LYNCH, S. E.; COLVIN, R. B.; ANTONIADES, H. N. Growth factors in wound healing: single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. **J Clin Invest**, New York, v. 84, n. 2, p. 640-646, Aug. 1989.

MA, Y.; ZHAO, H.; ZHOU, X. Topical treatment with growth factors for tympanic membrane perforations: progress towards clinical application. **Acta Otolaryngol (Stockh)**, Estocolmo, v. 122, p. 586-599, 2002.

MACKENNA, D. A.; OMENS, J. H.; MCCULLOCH, A. D.; COVELL, J. W. Contribution of collagen matrix to passive left ventricular mechanics in isolated rat hearts. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 266, n. 3 Pt 2, p. H1007-1018, Mar. 1994.

MADIBALLY, S. V.; SOLOMON, V.; MITCHELL, R. N.; VAN DE WATER, L.; YARMUSH, M. L.; TONER, M. Influence of insulin therapy on burn wound healing in rats. **J Surg Res**, New York, v. 109, n. 2, p. 92-100, Feb. 2003.

MAKINO, K.; AMATSU, M. Epithelial migration on the tympanic membrane and external canal. **Arch Otorhinolaryngol**, Berlim, v. 243, n. 1, p. 39-42, 1986.

MARTINS, J. O.; CAMPOS, C. A.; CRUZ, J. W.; MANZOLLI, S.; ALVES, V. A.; VIANNA, E. O.; JANCAR, S.; SANNOMIYA, P. Insulin modulates cytokine release and selectin expression in the early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats. **BMC Pulm Med**, London, v. 10, p. 39-47, 2010a.

MARTINS, J. O.; WITTLIN, B. M.; ANGER, D. B. C.; MARTINS, D. O.; SANNOMIYA, P.; JANCAR, S. Early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats: role of insulin on the signaling pathways and mediators. **Cell Physiol Biochem**, Basel, v. 26, n. 4-5, p. 739-748, 2010b.

MASSUDA, E. T. **Colesteatoma adquirido, um novo modelo experimental**. 2002. 66f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

MASUTANI, H; NAKAI, Y.; SUGITA, M.; OHASHI, K.; MORIGUCHI, M.; MATSUNAGA, K. Microvasculature of the tympanic membrane. **Acta Otolaryngol Suppl**, Stockholm, v. 486, p. 99-104, 1991.

McINTIRE, C.; BENITEZ, J. T. Spontaneous repair of the tympanic membrane. Histopathological studies in the cat. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, St. Louis, v. 79, n. 6, p. 1129-1131, Dec. 1970.

McMINN, R. M.; TAYLOR, M. The cytology of repair in experimental perforations of the tympanic membrane. **British Journal of Surgery**, Bristol, v. 53, n. 3, p. 222-232, Mar. 1966.

MILLS, R.; LEE, P. Surgical skills training in middle-ear surgery. **J Laryngol Otol**, London, v. 117, n. 3, p. 159-163, Mar. 2003.

MITCHELL, R. N.; COTRAN, R. S. Hemodynamic disorders, thrombosis, and shock. **Robbins- Pathologic basis of disease**. 6^o ed. Philadelphia: Saunders, 1999, cap. 5, p. 113- 138.

MONDAIN, M; RYAN, A. Histological study of the healing of traumatic tympanic membrane perforation after basic fibroblast growth factor application. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 103, n. 3, p. 312-318, Mar. 1993.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, suppl. III, p. 1-11, 1991.

MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex. Estudo experimental em cães.** 1996. 109f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

MRUÉ, F. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina: aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães.** 2000. 112f. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MRUÉ, F.; COUTINHO-NETTO, J.; CENEVIVA, R.; LACHAT, J. J.; THOMAZINI, J. A.; TAMBELLINI, H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research**, São Carlos, v. 7, n. 2, p. 277-283, 2004.

MRUÉ, F.; COUTINHO-NETTO, J. **Bio-membrana composto para reforço, correção ou reconstituição de órgãos ou tecidos corporais de animais e uso de bio-membrana composta.** PI0405995-6. 09 Fev. 2005, 22 Ago. 2006.

MUDRY, A. History of myringoplasty and tympanoplasty type I. **Otolaryngol Head Neck Surg**, Rochester, v. 139, n. 5, p. 613-614, Nov. 2008.

MUÑOZ-PINTO, D.; WHITTAKER, P.; HAHN, M. Lamina propria cellularity and collagen composition: an integrated assessment of structure in humans. **Annals of Otology, Rhinology & Laryngology**, St. Louis, v. 118, n. 4, p. 299-306, Apr. 2009.

NAKAE, J.; KIDO, Y; ACCILI, D. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-Receptors. **Endocr Rev**, Baltimore, v. 22, n. 6, p. 818-835, Dec. 2001.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 79, n. 2, p. 319-326, Feb 1987.

NÓBREGA, M. Anatomia e fisiologia da orelha média. In: CAMPOS, C. A. H.; COSTA, H. O. O. **Tratado de Otorrinolaringologia**. São Paulo: Roca, 2003. v. 1. cap. 28, p. 377-381.

NOGUEIRA JÚNIOR, J. F.; HERMANN, D. R.; AMÉRICO, R. R.; BARAUNA FILHO, I. S.; STAMM, A. E. C.; PIGNATARI, S. S. N. A brief history of otorhinolaryngology: otology, laryngology and rhinology. **Braz J Otorhinolaryngol**, São Paulo, v. 73, n. 5, p. 693-703, Sep/Oct. 2007.

O'CONNOR, K. N.; TAM, M.; BLEVINS, N. H.; PURIA, S. Tympanic membrane collagen fibers: a key to high frequency sound conduction. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 118, n. 3, p. 483-490, Mar. 2008.

OLIVEIRA, J. A. A.; BERNAL, T. M. O. Fatores neurotróficos de crescimento. In: CAMPOS, C. A. H.; COSTA, H. O. O. **Tratado de Otorrinolaringologia**. São Paulo: Roca, 2003. v. 1. cap. 9, p. 137-155.

OLIVEIRA, J. A. A.; HYPPOLITO, M. A.; COUTINHO NETTO, J.; MRUÉ, F. Myringoplasty using a new biomaterial allograft. **Braz J Otorhinolaryngol**, São Paulo, v. 69, n. 5, p. 649-655, Set/ Oct. 2003.

PÁEZ-ESPINOSA, V.; CARVALHO, C. R. O.; ALVAREZ-ROJAS, F.; JANERI, L. VELLOSO, L. A.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J. A. Insulin induces tyrosine phosphorylation of Shc and stimulates Shc/ Grb2 association in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **Endocrine**, Totowa, v. 8, n. 2, p. 193-200, Apr. 1998.

PANDE, R. L.; PERLSTEIN, T. S.; BECKMAN, J. A.; CREAGER, M. A. Association of insulin resistance and inflammation with peripheral arterial disease: the National Health and Nutrition Examination Survey, **Circulation**, Dallas, v. 118, n. 1, p. 33-41, Jul 1. 2008.

PAUL, T. N. Treatment by local application of insulin of an infected wound in a diabetic. **Lancet**, London, v. 288, n. 7463, p. 574-576, Sep 10. 1966.

PELEGRIANELLI, F. F. F. **Regulação da transmissão do sinal insulínico em pele intacta e em cicatrização de ratos controles e diabéticos**. 2002. 81f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

PELEGRINELLI, F. F. F.; THIRONE, A. C. P.; GASPARETTI, A. L.; ARAUJO, E. P.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. A. Early steps of insulin action in the skin of intact rats. **Journal of Investigative Dermatology**, Dallas, v. 117, n. 4, p. 971-976, Oct. 2001.

PELICCI, G.; LANFRANCONE, L.; GRIGNANI, F.; CAVALLO, F.; NICOLETTI, I.; GRIGNANI, F.; PAWSON, T.; PELICCI, P.G. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. **Cell**, Cambridge, v. 70, n. 1, p. 93-104, Jul. 1992.

PIAIA, A. R.; HYPPOLITO, M. A. Toxicidade da insulina ao sistema auditivo periférico: estudo anatômico e funcional. In: 19º Congresso Brasileiro e 8º Internacional de Fonoaudiologia, 2011, São Paulo. **Anais**. p. 1389.

PICCINATO, C. E.; COUTINHO NETTO, J. ; CHERRI, J. Cicatrização. In: CAMPOS, C. A. H.; COSTA, H. O. O. **Tratado de Otorrinolaringologia**. São Paulo: Roca, 2003. v. 1. cap. 12, p. 189-200.

PINHO, E. C. C. M.; SOUSA, J. F.; SCHAUD, F.; LACHAT, J. J.; COUTINHO-NETTO, J. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival/ Experimental use of latex biomembrane in conjuntival reconstruction. **Arq Bras Oftalmol**, São Paulo, v. 67, n. 1, p. 27-32, Jan-Fev. 2004.

PIRES, A. C.; CHACRA, A. R. A evolução da insulinoterapia no diabetes melito tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 268-278, Mar. 2008.

PODOSHIN, L.; FRADIS, M.; MALATSKEY, S.; BEN-DAVID, J. Tympanoplasty in adults: a five-year survey. **Ear, Nose & Throat Journal**, New York, v. 75, n. 3, p. 149-156, March. 1996.

PUSZTASZERI, M. P.; SEELENTAG, W.; BOSMAN, F. T. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. **J Histochem Cytochem**, Baltimore, v. 54, n. 4, p. 385-395, Apr. 2006.

RAMALHO, J. R. O. **Cicatrização de perfurações subagudas de membrana timpânica de chinchilas tratadas com fator de crescimento epitelial e**

pentoxifilina. 2005. 88f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RAND, J. H.; BADIMON, L.; GORDON, R. E.; USON, R. R.; FUSTER, V. Distribution of von Willebrand factor in porcine intima varies with blood vessel type and location. **Arteriosclerosis**, Dallas, v. 7, n. 3, p. 287-291, May-Jun. 1987.

REIJNEN, C.J.; KUIJPERS, W. The healing pattern of the drum membrane. **Acta Otolaryngologica (Suppl.)**, v. 287, p. 1-74, 1971.

REZVANI, O.; SHABBAK, E.; ASLANI, A.; BIDAR, R.; JAFARI, M.; SAFARNEZHAD, S. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial to determine the effects of topical insulin on wound healing. **Ostomy wound management**, King of Prussia, v. 55, n. 8, p. 22- 28. Aug. 2009.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Braz. J. Morphol. Sci.**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 97-104. Apr.-Jun. 2005.

RINDERKNECHT, E.; HUMBEL, R. E. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 73, n. 12, p. 4379-4381, Dec. 1976.

RIZER, F. M. Overlay versus underlay tympanoplasty. Part II: the study. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 107, n. 12, Pt 2, p. 26-36, Dec. 1997.

ROBERTS, T. M. Cell biology. A signal chain of events. **Nature**, London, v. 360, n. 6404, p. 534-535, Dec. 1992.

ROCHA, E. M.; CUNHA, D. A.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J. A.; VELLOSO, L. A. Identification of insulin in the tear film and insulin receptor and IGF-I receptor on the human ocular surface. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, St. Louis, v. 43, n. 4, p. 963-967, Apr. 2002.

ROCHA, E. M.; BOSCHERO, A. C.; CUNHA, D. A.; CARNEIRO, E. M.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. A. **Formulação de medicamento na forma de colírio de insulina para olho seco**. PI0401186-4, 13 julho 2004, 22 nov. 2005.

RUIFROK, A. C.; JOHNSTON, D. A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. **Anal Quant Cytol Histol**, St. Louis, v. 23, n. 4, p. 291-299, Aug. 2001.

SAAD, M. J.; ARAKI, E.; MIRALPEIX, M.; ROTHENBERG, P. L.; WHITE, M. F.; KAHN, C. R. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **J Clin Invest**, New York, v. 90, n. 5, p. 1839-1849, Nov. 1992.

SADER, S. L.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBIERI-NETO, J.; MAZZETTO, S. A.; ALVES-JR, P.; VANINI, J. C.; SADER, A. A. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 338-344, Out-Dez. 2000.

SANDHU, M. S.; DUNGER, D. B.; GIOVANNUCCI, E. L. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst**, Cary, v. 94, n. 13, p. 972- 980, Jul 3. 2002.

SANTA MARIA, P. L.; ATLAS, M. D.; GHASSEMIFAR, R. Chronic tympanic membrane perforation: a better animal model is needed. **Wound Repair Regen**, Saint Louis, v. 15, n. 4, p. 450- 458, Jul-Aug. 2007.

SANTA MARIA, P. L.; REDMOND, S. L.; ATLAS, M. D.; GHASSEMIFAR, R. Histology of the healing tympanic membrane following perforation in rats. **The Laryngoscope**, St. Louis, v. 120, n. 10, p. 2061-2070, 2010.

SAS Institute Inc., *SAS/STAT® User's Guide, Version 9.2*, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2008.

SCHALL, R. Estimation in generalized linear models with random effects. **Biometrika**, London, v. 78, n. 4, p. 719- 727, Dec. 1991.

SKOLNIK, E. Y.; BATZER, A.; LI, N.; LEE, C. H.; LOWENSTEIN, E.; MOHAMMADI, M.; MARGOLIS, B.; SCHLESSINGER, J. The function of GRB2

in linking the insulin to Ras signaling pathways. **Science**, Washington, v. 260, n. 5116, p. 1953-1955, Jun. 1993.

SOMERS, T. H.; HOUBEN, V.; GOOVAERTS, G.; GOVAERTS, P. J.; OFFECIERS, E. E. Histology of the perforated tympanic membrane and its muco-epithelial junction. **Clinical Otolaryngology & Allied Sciences**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 162-166, Apr. 1997.

SOMERS, T; GOOVAERTS, G.; SCHELFHOUT, L.; PEETERS, S.; GOVAERTS, P. J.; OFFECIERS, E. Growth factors in tympanic membrane perforations. *Am J Otol*, Philadelphia, v. 19, n. 4, p. 428-434, Jul. 1998.

SPANDOW, O.; HELLSTROM, S.; DAHLSTROM, M. Structural characterization of persistent tympanic membrane perforations in man. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 106, p.346-352, Mar. 1996.

SPRATLEY, J. E. F. **Otite media aguda. Estudo clínico na criança e experimental no rato:** interações entre ouvido médio e ouvido interno, miringotomia e aspectos da cicatrização da membrana timpânica. 2003. 219f. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, 2003.

SPRATLEY, J.; HELLSTROM, S.; ERIKSSON, P.O.; PAIS-CLEMENTE, M. Early structural tympanic membrane reactions to myringotomy: a study in an acute otitis media model. **Acta Otolaryngol**, Stockholm, v. 122, n. 5, p. 479-487, Jul. 2002.

STEED, D. L. The role of growth factors in wound healing. **Surgical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 77, n. 3, p. 575-586, Jun. 1997.

STENFELDT, K.; JOHANSSON, C.; HELLSTROM, S. The collagen structure of the tympanic membrane. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, Chicago, v. 132, n. 3, p. 293-298, Mar. 2006.

STRAUS, D. S. Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo. **Endocr Rev**, Baltimore, v. 5, n. 2, p. 356-369, 1984.

STUCK, W. G. The effect of insulin on the healing of experimental fractures in the rabbit. **J Bone Joint Surg Am**, Boston, v. 14, n. 1, p. 109-115, Jan. 1932.

TAYLOR, M.; McMINN, R. M. H. Cytology of repair in experimental perforations of the tympanic membrane and its relationship to chronic perforations in man. **Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol**, Rochester, v. 71, n. 5, p. 802-812, Sep-Oct. 1967.

TAYLOR, C. R.; LEVENSON, R. M. Quantification of immunohistochemistry - issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. **Histopathology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 411-424, Oct. 2006.

TOMITA, S.; KÓS, A. O.; RODRIGUES, F. A. Timpanoplastia e Reconstrução da cadeia ossicular. In: CAMPOS, C. A. H.; COSTA, H. O. O. **Tratado de Otorrinolaringologia**. São Paulo: Roca, 2003. v. 5. cap. 4, p. 45-63.

TSAO, M. C.; WALTHALL, B. J.; HAM, R. G. Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. **J Cell Physiol**, Philadelphia, v. 110, n. 2, p. 219-229, Feb. 1982.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em: <<http://www.fda.gov/>>. Acesso em: 29 de Maio de 2012.

UDUPA, K. N.; CHANSOURIA, J. P. The role of protamine zinc insulin in accelerating wound healing in the rat. **Br J Surg**, Bristol, v. 58, n. 9, p. 673-675, Sep. 1971.

VAN DEN BRANDE, J. L. A personal view on the early history of the insulin-like growth factors. **Horm Res**, Basel, v. 51, n. Suppl 3, p. 149-175, 1999.

VARTIAINEN, E. The results of chronic ear surgery in a training programme. **Clin Otolaryngol Allied Sci**, Oxford, v. 23, n. 2. p. 177-180, Apr. 1998.

VERRANDO, P.; ORTONNE, J.P. Insulin binding properties of normal and transformed human epidermal keratinocytes. **J Invest Dermal**, Baltimore, v. 85, n. 4. p. 328-332, Oct. 1985.

VIGNERI, R.; FRASCA, F.; SCIACCA, L.; VIGNERI, P.; FRITTITTA, L. RE: Insulin, insulin-like growth factor-I, and risk of breast cancer in postmenopausal women. **J Natl Cancer Inst**, Cary, v. 101, n. 14, p. 1030-1031, Jul. 15. 2009. Author reply 1031-1032.

VON UNGE, M.; HULTCRANTZ, M. The early events in the healing of laser-produced tympanic membrane perforation. **Acta Otolaryngol**, Stockholm, v. 131, n. 5, p. 480-487. May. 2011.

VRABEC, J. T. Tympanic membrane perforations in the diabetic rat: a model of impaired wound healing. **Otolaryngol Head Neck Surg**, Rochester, v. 118, n. 3 Pt 1, p. 304-308, Mar. 1998.

WANG, M.; YU, E. C.; SHIAO, A.; LIAO, W.; LIU, C. The costs and quality of operative training for residents in tympanoplasty type I. **Acta Otolaryngologica**, Stockholm, v. 129, n. 5, p. 512-514. May. 2009.

WARHOL, M. J.; SWEET, J. M. The ultrastructural localization of von Willebrand factor in endothelial cells. **Am J Pathol**, New York, v. 117, n. 2, p. 310-315, Nov. 1984.

WEINBERGER, J. M.; HAWKE, M.; GOTLIEB, A. I. Repair of the wounded guinea pig tympanic membrane: organization of filamentous actin and spatial cellular reorganization. **J Otolaryngol**, Toronto, v. 17, n. 7, p. 352- 358, Dec. 1988.

WENIG, B. M.; MICHAELS, L. The Ear and Temporal Bone. In: MILLS, S.E. **Histology for Pathologists**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Cap. 14, p. 372-400.

WERTHEIMER, E.; TREBICZ, M.; ELDAR, T.; GARTSBEIN, M.; NOFEN-MOSES, S.; TENNENBAUM, T. Differential roles of insulin receptor and insulin-like growth factor-1 receptor in differentiation of murine skin keratinocytes. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v. 115, n. 1, p. 24-29, Jul. 2000.

WHITE, M. F. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Mol Cell Biochem**, The Hague, v. 182, n. 1-2, p. 3-11, May. 1998.

WHITTAKER, P.; KLONER, R. A.; BOUGHNER, D. R.; PICKERING, J. G. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. **Basic Res Cardiol**, Darmstadt, v. 89, n. 5, p. 397-410, Sep-Oct. 1994.

WILSON, J. M.; BAINES, R.; BABU, E. D.; KELLEY, C. J. A role for topical insulin in the management problematic surgical wounds. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, London, v. 90, n. 2, p. 160, Mar. 2008.

WITTE, M. B; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 77, n. 3, p. 509-528, Jun. 1997.

WOLF, I.; SADETZKI, S.; CATANE, R.; KARASIK, A.; KAUFMAN, B. Diabetes mellitus and breast cancer. **Lancet Oncology**, London, v. 6, n. 2, p. 103-111, Feb. 2005.

WOUND HEALING. Image-Pro Plus. Video Tutorials. Application videos. Disponível em: <<http://www.mediacy.com/index.aspx?page=IPPTours>>. Acesso em 14 jan. 2012.

WULLSTEIN, H. Theory and practice of tympanoplasty. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 66, n. 8, p. 1076-1093. Aug. 1956.

YAMAMOTO, K.; WAARD, V.; FEARNES, C.; LOSKUTOFF, D. J. Tissue distribution and regulation of murine von Willebrand factor gene expression in vivo. **Blood**, New York, v. 92, n. 8, p. 2791-2801, Oct 15. 1998.

YAMASHITA, T. Histology of the tympanic perforation and the replacement membrane. **Acta Otolaryngol**, Stockholm, v. 100, n. 1-2, p. 66-71, Jul-Aug. 1985.

YEO, S. W.; KIM, S. W.; SUH, B. D.; CHO, S. H. Effects of platelet-derived growth factor-AA on the healing process of tympanic membrane perforation. **Am J Otolaryngol**, Philadelphia, v. 21, n. 3, p. 153- 160, May-Jun. 2000.

YOUNGREN, J. F. Regulation of insulin receptor function: Review. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 64, n. 7-8, p. 873-891, April. 2007.

ZENDEHDEL, K.; NYREN, O.; OSTENSON, C. G.; ADAMI, H. O.; EKBOM, A.; YE, W. Cancer incidence in patients with type 1 diabetes mellitus: a population-based cohort study in Sweden. **J Natl Cancer Inst**, Cary, v. 95, n. 23, p. 1797-1800, Dec 3. 2003.

9. APÊNDICES

APÊNDICE A

Descrição das espessuras das camadas Epitelial, Fibrosa e Mucosa da MT (μm), e evolução da medida linear da perfuração timpânica (μm) ao longo do tempo (Dias) dos grupos Controle, Insulina, Látex e Insulina + Látex.

Grupo	Tempo	Variável	Média	Desvio padrão	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Controle	3	Epitelial	18,9	3,09	14,37	15,64	18,85	21,4	23,5
		Fibrosa	14,35	3,46	10,17	10,44	14,93	16,85	19,62
		Mucosa	5,86	1,38	3,94	4,84	5,57	6,6	8,52
		Perfuração	524,32	101,25	376,05	471,44	503,29	553,43	728,77
	5	Epitelial	27,13	2,61	22,35	25,48	27,01	28,71	31,99
		Fibrosa	36,18	3,75	28,62	33,05	37,35	39,24	40,16
		Mucosa	8,11	1,78	5,29	6,99	8,48	9,42	10,89
		Perfuração	408,1	205,55	0	339,5	407,43	480,61	723,07
	7	Epitelial	37,49	3,44	30,63	34,95	38,15	40,01	41,32
		Fibrosa	46,11	6,02	38,16	40,59	45,67	51,77	54,5
		Mucosa	5,58	1,85	3,87	4,14	4,75	7,17	8,87
		Perfuração	57,86	158,37	0	0	0	0	503,56
Insulina	3	Epitelial	37,21	5,08	30,29	31,75	37,48	41,24	44,84
		Fibrosa	31,13	4,7	23,59	26,96	31,06	35,45	38,1
		Mucosa	6,34	2,01	3,76	5,07	6,05	7,84	9,9
		Perfuração	115,01	191,13	0	0	0	297,9	493,9
	5	Epitelial	44,21	5,19	35,56	40,38	44,98	48,61	50,93
		Fibrosa	61,42	4,45	54,74	58,18	60,47	64,91	67,95
		Mucosa	6,7	1,48	4,75	5,06	6,77	8,25	8,61
		Perfuração	52,16	84,96	0	0	0	142,68	191,68
	7	Epitelial	17,47	4,85	10,1	14,94	16,89	21,41	25,04
		Fibrosa	30,98	6,49	19,23	28,16	31,74	36,5	39,57
		Mucosa	3,82	1,23	2,14	2,88	3,64	4,68	6,43
		Perfuração	0	0	0	0	0	0	0
Latex	3	Epitelial	35,65	5,11	30,75	31,79	33,01	40,56	43,7
		Fibrosa	35,76	6,35	24,3	31,63	35,19	41,37	45,14
		Mucosa	6,39	1,39	3,66	5,18	6,91	6,95	8,2
		Perfuração	168,98	206,55	0	0	86,1	272,4	544,93
	5	Epitelial	39,53	2,36	36,36	37,59	39,06	42,19	42,89
		Fibrosa	64,08	3,57	56,42	62,87	64,35	66,67	68,82
		Mucosa	6,43	1,74	3,74	4,69	6,93	7,79	8,58
		Perfuração	91,96	103,82	0	0	65,42	187,99	266,41
	7	Epitelial	17,7	4,03	13,47	14,12	16,35	19,9	25,75
		Fibrosa	43,72	10,16	29,93	35,71	40,7	52,39	59,47
		Mucosa	4,63	1,14	3,11	3,73	4,42	5,75	6,22
		Perfuração	40,31	93,12	0	0	0	0	260,7

continua

conclusão

Ins+Lat	3	Epitelial	36,99	6,44	25,38	33,08	36,29	42,32	48,56
		Fibrosa	37,62	3,31	32,45	35,13	37,46	41,31	41,8
		Mucosa	5,6	3,67	2,07	3,73	4,19	5,75	14,66
		Perfuração	133,3	195,53	0	0	0	379,59	470,6
	5	Epitelial	51,64	4,27	45,21	47,54	51,88	54,75	56,7
		Fibrosa	74,55	4,57	66,09	71,5	74,82	78,54	80,46
		Mucosa	5,25	2,09	2,93	3,66	5,11	6,55	9,53
		Perfuração	76,08	109,27	0	0	0	156,66	275,3
	7	Epitelial	16,59	1,89	13,78	15,18	16,43	17,56	20,73
		Fibrosa	43,03	10,6	25,06	33,08	44,18	51,86	60,5
		Mucosa	4,12	1,78	2,2	2,64	3,71	5,18	7,89
		Perfuração	0	0	0	0	0	0	0

APÊNDICE B

Resultados do modelo de efeitos mistos - Epitelial (log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	-0,37	< 0,01	-0,54	-0,19
ConT3 - ConT7	-0,70	< 0,01	-0,87	-0,53
ConT5 - ConT7	-0,33	< 0,01	-0,50	-0,17
InsT3 - InsT5	-0,17	0,03	-0,33	-0,02
InsT3 - InsT7	0,79	< 0,01	0,65	0,93
InsT5 - InsT7	0,96	< 0,01	0,82	1,10
LatT3 - LatT5	-0,11	0,20	-0,28	0,06
LatT3 - LatT7	0,73	< 0,01	0,56	0,89
LatT5 - LatT7	0,84	< 0,01	0,68	1,00
InsLatT3 - InsLatT5	-0,34	< 0,01	-0,51	-0,17
InsLatT3 - InsLatT7	0,79	< 0,01	0,65	0,94
InsLatT5 - InsLatT7	1,13	< 0,01	0,97	1,29
ConT3 - InsT3	-0,69	< 0,01	-0,86	-0,52
ConT5 - InsT5	-0,50	< 0,01	-0,66	-0,33
ConT7 - InsT7	0,80	< 0,01	0,66	0,94
ConT3 - LatT3	-0,65	< 0,01	-0,83	-0,46
ConT5 - LatT5	-0,39	< 0,01	-0,56	-0,22
ConT7 - LatT7	0,78	< 0,01	0,63	0,94
ConT3 - InsLatT3	-0,68	< 0,01	-0,85	-0,50
ConT5 - InsLatT5	-0,65	< 0,01	-0,82	-0,47
ConT7 - InsLatT7	0,81	< 0,01	0,67	0,96
InsT3 - LatT3	0,04	0,60	-0,13	0,21
InsT5 - LatT5	0,11	0,19	-0,06	0,27
InsT7 - LatT7	-0,02	0,79	-0,15	0,12
InsT3 - InsLatT3	0,01	0,88	-0,15	0,17
InsT5 - InsLatT5	-0,15	0,08	-0,32	0,02
InsT7 - InsLatT7	0,02	0,80	-0,11	0,14
LatT3 - InsLatT3	-0,03	0,70	-0,20	0,14
LatT5 - InsLatT5	-0,26	0,01	-0,44	-0,08
LatT7 - InsLatT7	0,03	0,62	-0,11	0,17

APÊNDICE C

Resultados do modelo de efeitos mistos - Fibrosa (log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	-0,95	< 0,01	-1,12	-0,78
ConT3 - ConT7	-1,19	< 0,01	-1,36	-1,02
ConT5 - ConT7	-0,24	0,01	-0,41	-0,07
InsT3 - InsT5	-0,69	< 0,01	-0,86	-0,52
InsT3 - InsT7	0,02	0,81	-0,13	0,17
InsT5 - InsT7	0,71	< 0,01	0,56	0,86
LatT3 - LatT5	-0,60	< 0,01	-0,77	-0,43
LatT3 - LatT7	-0,19	0,02	-0,35	-0,03
LatT5 - LatT7	0,41	< 0,01	0,25	0,56
InsLatT3 - InsLatT5	-0,69	< 0,01	-0,86	-0,51
InsLatT3 - InsLatT7	-0,11	0,15	-0,26	0,04
InsLatT5 - InsLatT7	0,58	< 0,01	0,43	0,73
ConT3 - InsT3	-0,79	< 0,01	-0,96	-0,62
ConT5 - InsT5	-0,53	< 0,01	-0,70	-0,36
ConT7 - InsT7	0,41	< 0,01	0,26	0,56
ConT3 - LatT3	-0,93	< 0,01	-1,10	-0,75
ConT5 - LatT5	-0,58	< 0,01	-0,75	-0,40
ConT7 - LatT7	0,07	0,37	-0,09	0,23
ConT3 - InsLatT3	-0,99	< 0,01	-1,16	-0,82
ConT5 - InsLatT5	-0,73	< 0,01	-0,90	-0,56
ConT7 - InsLatT7	0,09	0,22	-0,06	0,24
InsT3 - LatT3	-0,13	0,11	-0,30	0,04
InsT5 - LatT5	-0,04	0,60	-0,21	0,13
InsT7 - LatT7	-0,34	< 0,01	-0,48	-0,21
InsT3 - InsLatT3	-0,20	0,03	-0,37	-0,03
InsT5 - InsLatT5	-0,19	0,03	-0,36	-0,02
InsT7 - InsLatT7	-0,32	< 0,01	-0,45	-0,19
LatT3 - InsLatT3	-0,06	0,45	-0,23	0,11
LatT5 - InsLatT5	-0,15	0,08	-0,32	0,02
LatT7 - InsLatT7	0,02	0,74	-0,11	0,16

APÊNDICE D

Resultados do modelo de efeitos mistos - Mucosa (log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	-0,323	0,05	-0,643	-0,003
ConT3 - ConT7	0,074	0,63	-0,244	0,392
ConT5 - ConT7	0,397	0,02	0,081	0,713
InsT3 - InsT5	-0,079	0,60	-0,393	0,235
InsT3 - InsT7	0,509	< 0,01	0,232	0,786
InsT5 - InsT7	0,588	< 0,01	0,311	0,865
LatT3 - LatT5	0,006	0,97	-0,310	0,322
LatT3 - LatT7	0,329	0,03	0,036	0,622
LatT5 - LatT7	0,323	0,03	0,028	0,618
InsLatT3 - InsLatT5	-0,013	0,93	-0,329	0,303
InsLatT3 - InsLatT7	0,243	0,08	-0,036	0,521
InsLatT5 - InsLatT7	0,255	0,07	-0,025	0,536
ConT3 - InsT3	-0,053	0,73	-0,371	0,266
ConT5 - InsT5	0,192	0,22	-0,125	0,508
ConT7 - InsT7	0,383	0,01	0,106	0,660
ConT3 - LatT3	-0,082	0,59	-0,401	0,236
ConT5 - LatT5	0,247	0,12	-0,071	0,565
ConT7 - LatT7	0,173	0,23	-0,121	0,466
ConT3 - InsLatT3	0,174	0,26	-0,144	0,493
ConT5 - InsLatT5	0,485	0,01	0,167	0,803
ConT7 - InsLatT7	0,343	0,02	0,064	0,621
InsT3 - LatT3	-0,030	0,84	-0,344	0,284
InsT5 - LatT5	0,055	0,72	-0,261	0,371
InsT7 - LatT7	-0,210	0,10	-0,463	0,043
InsT3 - InsLatT3	0,227	0,15	-0,087	0,541
InsT5 - InsLatT5	0,293	0,07	-0,023	0,609
InsT7 - InsLatT7	-0,040	0,73	-0,276	0,196
LatT3 - InsLatT3	0,257	0,10	-0,057	0,571
LatT5 - InsLatT5	0,238	0,13	-0,080	0,556
LatT7 - InsLatT7	0,170	0,18	-0,084	0,425

APÊNDICE E

Resultados do modelo de efeitos mistos - Perfuração (log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	-0,309	0,04	-0,614	-0,003
ConT3 - ConT7	-1,065	< 0,01	-1,365	-0,765
ConT5 - ConT7	-0,756	< 0,01	-1,050	-0,462
InsT3 - InsT5	-0,128	0,36	-0,417	0,160
InsT3 - InsT7	-0,202	0,11	-0,456	0,052
InsT5 - InsT7	-0,074	0,55	-0,328	0,181
LatT3 - LatT5	-0,170	0,24	-0,463	0,124
LatT3 - LatT7	-0,235	0,09	-0,508	0,038
LatT5 - LatT7	-0,066	0,63	-0,345	0,213
InsLatT3 - InsLatT5	-0,127	0,38	-0,420	0,167
InsLatT3 - InsLatT7	-0,232	0,08	-0,490	0,027
InsLatT5 - InsLatT7	-0,105	0,42	-0,369	0,159
ConT3 - InsT3	-0,972	< 0,01	-1,272	-0,672
ConT5 - InsT5	-0,792	< 0,01	-1,085	-0,498
ConT7 - InsT7	-0,109	0,38	-0,363	0,145
ConT3 - LatT3	-0,873	< 0,01	-1,173	-0,573
ConT5 - LatT5	-0,734	< 0,01	-1,033	-0,434
ConT7 - LatT7	-0,043	0,74	-0,316	0,230
ConT3 - InsLatT3	-0,943	< 0,01	-1,243	-0,643
ConT5 - InsLatT5	-0,760	< 0,01	-1,060	-0,461
ConT7 - InsLatT7	-0,109	0,39	-0,367	0,149
InsT3 - LatT3	0,099	0,48	-0,189	0,388
InsT5 - LatT5	0,058	0,68	-0,236	0,352
InsT7 - LatT7	0,066	0,57	-0,171	0,303
InsT3 - InsLatT3	0,029	0,83	-0,259	0,318
InsT5 - InsLatT5	0,031	0,83	-0,263	0,325
InsT7 - InsLatT7	0,000	1,00	-0,219	0,219
LatT3 - InsLatT3	-0,070	0,62	-0,358	0,218
LatT5 - InsLatT5	-0,027	0,85	-0,326	0,272
LatT7 - InsLatT7	-0,066	0,57	-0,307	0,175

APÊNDICE F

Descrição de área e perímetro, por grupo e tempo.

Grupo	Tempo	Variável	Média	Desvio padrão	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Controle	3	AREA	142041,5	43885,28	103211,5	119458,3	134704,8	135988,9	216844,2
		PERIMETRO	7253,9	1422,62	5362,56	6363,5	7330,01	8434,32	8779,1
	5	AREA	223218,5	50912,7	167793	179227,9	220155,7	267355,1	281560,9
		PERIMETRO	11893,75	2838,18	9196,35	10881,88	11188,05	11486,15	16716,31
	7	AREA	328152	135652,7	145315,2	310607,7	320380,1	336978,3	527478,9
		PERIMETRO	14173,04	3668,03	10661,38	11688,22	13379,08	15157,24	19979,3
Insulina	3	AREA	206104	74582,98	135272,5	166130,5	174375,5	230090,3	324651,3
		PERIMETRO	10032,69	1925,94	7419,4	8979,92	10446,19	10810,75	12507,17
	5	AREA	304092,8	86305,79	219358,2	252216,7	293712,2	310459	444717,8
		PERIMETRO	13175,83	3681,6	9025,02	11511,12	12491,13	13913,87	18938
	7	AREA	282034,1	127057,8	138016,3	214478,8	268125,5	310594,2	552376,2
		PERIMETRO	11471,89	1874,83	8701,61	10328,92	11342,9	12951,85	14368,15
Latex	3	AREA	182801,7	67253,48	118228,3	127122,1	177673,6	207179,9	283804,6
		PERIMETRO	10372,47	2655,78	7520,73	8611,13	9344,17	13130,17	13256,16
	5	AREA	251289,5	140097	99872,95	180566,1	206355,4	304525,3	465127,6
		PERIMETRO	13470,16	2436,19	10995,06	11045,78	14270,96	14358,58	16680,43
	7	AREA	303907,4	159498,5	157034	199326,9	266327,8	356171,6	631528,4
		PERIMETRO	14406,68	3854,38	10357,08	11168,82	12466,52	17843,1	20736,27
Ins+Lat	3	AREA	214057,1	51370,86	157047,5	198542,9	206598,7	210396,8	297699,5
		PERIMETRO	10258,59	1387,48	9087,56	9200,27	10184,7	10280,81	12539,62
	5	AREA	349699,9	162402,8	128352,1	255717,5	398532,1	413035,2	552862,8
		PERIMETRO	14866,61	3830,8	11202,27	12276,7	14325,68	15508,74	21019,68
	7	AREA	223266	110416,7	94912,41	139624,8	230414,7	314419,3	392165,9
		PERIMETRO	9905,11	1482,08	8648,95	8956,53	9672,24	9840,54	13309,59

APÊNDICE G

Resultados do modelo de efeitos mistos - Área (log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	-0,47	0,13	-1,10	0,16
ConT3 - ConT7	-0,79	0,02	-1,42	-0,17
ConT5 - ConT7	-0,32	0,27	-0,94	0,30
InsT3 - InsT5	-0,41	0,17	-1,02	0,21
InsT3 - InsT7	-0,28	0,28	-0,82	0,26
InsT5 - InsT7	0,13	0,60	-0,41	0,67
LatT3 - LatT5	-0,23	0,43	-0,85	0,39
LatT3 - LatT7	-0,46	0,10	-1,04	0,11
LatT5 - LatT7	-0,24	0,38	-0,82	0,34
InsLatT3 - InsLatT5	-0,38	0,20	-1,00	0,24
InsLatT3 - InsLatT7	0,06	0,82	-0,49	0,60
InsLatT5 - InsLatT7	0,44	0,11	-0,11	0,99
ConT3 - InsT3	-0,36	0,23	-0,98	0,27
ConT5 - InsT5	-0,30	0,31	-0,92	0,32
ConT7 - InsT7	0,16	0,53	-0,38	0,70
ConT3 - LatT3	-0,23	0,42	-0,86	0,39
ConT5 - LatT5	0,01	0,98	-0,62	0,63
ConT7 - LatT7	0,09	0,72	-0,48	0,67
ConT3 - InsLatT3	-0,42	0,16	-1,05	0,20
ConT5 - InsLatT5	-0,34	0,25	-0,96	0,29
ConT7 - InsLatT7	0,43	0,11	-0,12	0,97
InsT3 - LatT3	0,12	0,66	-0,49	0,74
InsT5 - LatT5	0,30	0,30	-0,31	0,92
InsT7 - LatT7	-0,06	0,78	-0,56	0,43
InsT3 - InsLatT3	-0,06	0,82	-0,68	0,55
InsT5 - InsLatT5	-0,04	0,89	-0,66	0,58
InsT7 - InsLatT7	0,27	0,22	-0,19	0,73
LatT3 - InsLatT3	-0,19	0,50	-0,80	0,42
LatT5 - InsLatT5	-0,34	0,24	-0,97	0,28
LatT7 - InsLatT7	0,33	0,17	-0,17	0,83

APÊNDICE H

Resultados do modelo de efeitos mistos - Perímetro (log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	-0,49	<0,01	-0,79	-0,19
ConT3 - ConT7	-0,66	<0,01	-0,96	-0,36
ConT5 - ConT7	-0,17	0,23	-0,47	0,13
InsT3 - InsT5	-0,26	0,08	-0,56	0,04
InsT3 - InsT7	-0,14	0,27	-0,40	0,13
InsT5 - InsT7	0,12	0,33	-0,14	0,38
LatT3 - LatT5	-0,27	0,07	-0,57	0,02
LatT3 - LatT7	-0,33	0,03	-0,60	-0,05
LatT5 - LatT7	-0,05	0,69	-0,33	0,23
InsLatT3 - InsLatT5	-0,35	0,03	-0,65	-0,06
InsLatT3 - InsLatT7	0,04	0,76	-0,23	0,30
InsLatT5 - InsLatT7	0,39	0,01	0,13	0,65
ConT3 - InsT3	-0,33	0,04	-0,62	-0,03
ConT5 - InsT5	-0,09	0,50	-0,39	0,21
ConT7 - InsT7	0,20	0,12	-0,06	0,46
ConT3 - LatT3	-0,35	0,03	-0,65	-0,05
ConT5 - LatT5	-0,13	0,34	-0,43	0,17
ConT7 - LatT7	-0,01	0,92	-0,29	0,26
ConT3 - InsLatT3	-0,36	0,02	-0,65	-0,06
ConT5 - InsLatT5	-0,22	0,13	-0,52	0,08
ConT7 - InsLatT7	0,34	0,02	0,08	0,61
InsT3 - LatT3	-0,02	0,87	-0,32	0,28
InsT5 - LatT5	-0,04	0,78	-0,34	0,26
InsT7 - LatT7	-0,21	0,08	-0,45	0,03
InsT3 - InsLatT3	-0,03	0,82	-0,33	0,27
InsT5 - InsLatT5	-0,13	0,36	-0,42	0,17
InsT7 - InsLatT7	0,14	0,18	-0,08	0,37
LatT3 - InsLatT3	-0,01	0,95	-0,31	0,29
LatT5 - InsLatT5	-0,09	0,52	-0,39	0,21
LatT7 - InsLatT7	0,35	0,01	0,12	0,59

APÊNDICE I

Descrição em porcentagem de Colágeno total, Red, Orange, Yellow e Green por grupo e tempo.

Grupo	Tempo	Variável	Média	Desvio padrão	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Controle	3	Colágeno total	6,25	2,96	3,53	4,1	5,18	7,78	10,67
		RED	63,18	25,6	30,89	40,78	75,29	81,04	87,92
		ORANGE	32,55	20,61	12,07	17,84	24,41	48,79	59,62
		YELLOW	1,32	1,69	0	0,12	0,15	2,91	3,4
		GREEN	2,95	3,58	0	0,15	0,99	6,09	7,52
	5	Colágeno total	8,54	4,77	4,29	5,84	7,5	8,51	16,57
		RED	65,89	28,95	23,38	53,34	72,46	80,92	99,35
		ORANGE	25,95	17,84	0,65	18,8	26,12	36,56	47,62
		YELLOW	2,62	4,18	0	0,09	0,51	2,65	9,85
		GREEN	5,54	8,21	0	0,19	0,91	7,45	19,15
	7	Colágeno total	7,79	4,67	4,23	4,74	4,84	10,23	14,91
		RED	65,52	16,04	48,65	53,34	66,35	69,7	89,55
		ORANGE	31,52	14,81	10,44	24,24	32,58	43,37	46,97
		YELLOW	0,98	0,95	0	0,23	0,94	1,35	2,38
		GREEN	1,98	1,53	0	0,85	2,35	3,02	3,68
Insulina	3	Colágeno total	15,8	3,74	12,59	13,16	13,75	18,51	21,01
		RED	84,47	8,84	74,38	79,36	81,94	90,12	96,57
		ORANGE	15,32	8,67	3,43	9,88	18,01	19,85	25,42
		YELLOW	0,07	0,12	0	0	0	0,06	0,27
		GREEN	0,13	0,21	0	0	0,04	0,13	0,5
	5	Colágeno total	16,37	5,23	11,85	12,96	13,88	18,66	24,5
		RED	78,24	15,1	54,56	73,65	81,61	88,65	92,75
		ORANGE	20,59	13,68	7,19	11,35	18,29	23,91	42,22
		YELLOW	0,34	0,45	0	0,03	0,06	0,61	1,01
		GREEN	0,82	1,1	0	0	0,06	1,83	2,2
	7	Colágeno total	10,46	4,11	4,81	7,11	9,15	13,64	16,9
		RED	90,4	13,47	65,05	80,77	98,11	100	100
		ORANGE	9,24	13,1	0	0	1,89	18,7	33,85
		YELLOW	0,08	0,12	0	0	0	0,1	0,31
		GREEN	0,28	0,34	0	0	0,06	0,64	0,78
Latex	3	Colágeno total	9,23	3,64	6,84	7,06	7,38	9,37	15,49
		RED	89,48	13,28	66,95	88,23	95,47	97,42	99,33
		ORANGE	10,21	13,24	0	2,41	4,36	11,7	32,56
		YELLOW	0,06	0,1	0	0	0	0,07	0,24
		GREEN	0,25	0,25	0	0,16	0,17	0,24	0,67
	5	Colágeno total	13,9	4,86	8,97	9,37	13,94	16,97	20,25
		RED	92,5	4,3	87,11	89,65	92,69	95,07	97,98
		ORANGE	6,6	3,78	2,02	4,66	6,81	7,25	12,25
		YELLOW	0,38	0,34	0	0,27	0,27	0,44	0,92
		GREEN	0,52	0,94	0	0	0,06	0,36	2,17

continua

conclusão

	7	Colágeno total	10,17	3,63	5,32	8,63	9,43	13	14,45
		RED	92,65	11,77	71,97	94,26	97,88	99,15	100
		ORANGE	7,02	11,04	0	0,85	2,12	5,74	26,37
		YELLOW	0,12	0,26	0	0	0	0	0,59
		GREEN	0,21	0,47	0	0	0	0	1,06
	3	Colágeno total	11,12	5,96	6,28	6,59	9,53	15,65	19,13
		RED	83,34	15,93	62,02	72,12	85,8	94,56	99,74
		ORANGE	15,32	14,21	0,25	5,13	13,54	25,51	33,96
		YELLOW	0,41	0,59	0	0,06	0,18	0,77	1,29
		GREEN	0,93	1,22	0	0,24	0,49	1,61	2,73
Ins+Lat	5	Colágeno total	11,11	8,36	3,62	4,42	7,45	18,23	21,82
		RED	87,45	12,06	70,4	81,62	87,68	98,75	98,81
		ORANGE	11,19	10,24	0,68	1,24	12	18,16	23,87
		YELLOW	0,39	0,64	0	0	0,14	0,31	1,52
		GREEN	0,96	1,83	0	0	0,07	0,51	4,2
	7	Colágeno total	7,62	2,25	4,23	6	7,59	9,25	11,08
		RED	87,68	14,43	54,87	86,23	89,86	97,19	100
		ORANGE	9,73	9,1	0	2,81	8,94	13,2	27,99
		YELLOW	0,9	2,13	0	0	0,08	0,44	6,16
		GREEN	1,68	3,8	0	0	0	1,25	10,97

APÊNDICE J

Resultados do modelo de efeitos mistos - Colágeno total (log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	-0,29	0,34	-0,96	0,38
ConT3 - ConT7	-0,17	0,56	-0,84	0,50
ConT5 - ConT7	0,12	0,69	-0,55	0,79
InsT3 - InsT5	-0,02	0,95	-0,69	0,65
InsT3 - InsT7	0,47	0,11	-0,13	1,06
InsT5 - InsT7	0,48	0,09	-0,11	1,08
LatT3 - LatT5	-0,41	0,19	-1,08	0,26
LatT3 - LatT7	-0,09	0,76	-0,76	0,58
LatT5 - LatT7	0,32	0,30	-0,35	0,99
InsLatT3 - InsLatT5	0,15	0,63	-0,56	0,86
InsLatT3 - InsLatT7	0,31	0,29	-0,33	0,96
InsLatT5 - InsLatT7	0,16	0,54	-0,44	0,77
ConT3 - InsT3	-0,99	0,01	-1,66	-0,32
ConT5 - InsT5	-0,72	0,04	-1,39	-0,05
ConT7 - InsT7	-0,35	0,20	-0,94	0,24
ConT3 - LatT3	-0,42	0,18	-1,09	0,25
ConT5 - LatT5	-0,54	0,10	-1,21	0,13
ConT7 - LatT7	-0,34	0,27	-1,01	0,33
ConT3 - InsLatT3	-0,56	0,11	-1,27	0,15
ConT5 - InsLatT5	-0,12	0,69	-0,79	0,55
ConT7 - InsLatT7	-0,07	0,79	-0,67	0,53
InsT3 - LatT3	0,57	0,08	-0,10	1,24
InsT5 - LatT5	0,18	0,55	-0,49	0,85
InsT7 - LatT7	0,01	0,96	-0,58	0,60
InsT3 - InsLatT3	0,43	0,19	-0,28	1,15
InsT5 - InsLatT5	0,60	0,07	-0,07	1,27
InsT7 - InsLatT7	0,28	0,23	-0,23	0,80
LatT3 - InsLatT3	-0,13	0,67	-0,84	0,58
LatT5 - InsLatT5	0,43	0,17	-0,24	1,10
LatT7 - InsLatT7	0,27	0,32	-0,33	0,88

APÊNDICE K

Resultados do modelo de efeitos mistos - *Red* (log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	0,02	0,91	-0,40	0,45
ConT3 - ConT7	-0,06	0,72	-0,47	0,35
ConT5 - ConT7	-0,09	0,62	-0,48	0,31
InsT3 - InsT5	0,09	0,60	-0,29	0,47
InsT3 - InsT7	-0,06	0,68	-0,40	0,27
InsT5 - InsT7	-0,15	0,32	-0,48	0,18
LatT3 - LatT5	-0,04	0,83	-0,43	0,35
LatT3 - LatT7	-0,04	0,82	-0,42	0,34
LatT5 - LatT7	0,0002	1,00	-0,39	0,39
InsLatT3 - InsLatT5	-0,06	0,74	-0,48	0,35
InsLatT3 - InsLatT7	-0,06	0,71	-0,44	0,32
InsLatT5 - InsLatT7	-0,001	1,00	-0,37	0,37
ConT3 - InsT3	-0,34	0,09	-0,75	0,07
ConT5 - InsT5	-0,27	0,15	-0,66	0,12
ConT7 - InsT7	-0,33	0,04	-0,67	-0,0003
ConT3 - LatT3	-0,39	0,06	-0,80	0,02
ConT5 - LatT5	-0,45	0,03	-0,85	-0,04
ConT7 - LatT7	-0,36	0,06	-0,74	0,02
ConT3 - InsLatT3	-0,31	0,13	-0,74	0,12
ConT5 - InsLatT5	-0,40	0,05	-0,80	0,01
ConT7 - InsLatT7	-0,31	0,08	-0,66	0,04
InsT3 - LatT3	-0,05	0,76	-0,43	0,33
InsT5 - LatT5	-0,18	0,32	-0,57	0,21
InsT7 - LatT7	-0,03	0,85	-0,36	0,31
InsT3 - InsLatT3	0,02	0,89	-0,38	0,43
InsT5 - InsLatT5	-0,13	0,47	-0,52	0,27
InsT7 - InsLatT7	0,02	0,86	-0,28	0,33
LatT3 - InsLatT3	0,08	0,67	-0,33	0,48
LatT5 - InsLatT5	0,05	0,77	-0,35	0,46
LatT7 - InsLatT7	0,05	0,74	-0,30	0,41

APÊNDICE L

Resultados do modelo de efeitos mistos - *Orange* (log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	0,73	0,46	-1,53	2,99
ConT3 - ConT7	-0,05	0,96	-2,25	2,16
ConT5 - ConT7	-0,78	0,41	-2,91	1,35
InsT3 - InsT5	-0,32	0,72	-2,39	1,75
InsT3 - InsT7	0,21	0,81	-1,86	2,28
InsT5 - InsT7	0,53	0,56	-1,54	2,60
LatT3 - LatT5	0,29	0,76	-1,96	2,55
LatT3 - LatT7	0,67	0,50	-1,64	2,99
LatT5 - LatT7	0,38	0,70	-1,88	2,63
InsLatT3 - InsLatT5	0,14	0,88	-2,11	2,40
InsLatT3 - InsLatT7	0,11	0,90	-1,97	2,19
InsLatT5 - InsLatT7	-0,03	0,97	-2,05	1,98
ConT3 - InsT3	0,75	0,44	-1,45	2,96
ConT5 - InsT5	-0,29	0,75	-2,42	1,84
ConT7 - InsT7	1,01	0,28	-1,06	3,08
ConT3 - LatT3	1,21	0,25	-1,12	3,53
ConT5 - LatT5	0,77	0,42	-1,42	2,96
ConT7 - LatT7	1,93	0,08	-0,27	4,12
ConT3 - InsLatT3	1,46	0,18	-0,86	3,78
ConT5 - InsLatT5	0,88	0,36	-1,31	3,07
ConT7 - InsLatT7	1,62	0,09	-0,33	3,57
InsT3 - LatT3	0,45	0,63	-1,74	2,65
InsT5 - LatT5	1,07	0,27	-1,06	3,20
InsT7 - LatT7	0,92	0,35	-1,28	3,11
InsT3 - InsLatT3	0,71	0,46	-1,49	2,90
InsT5 - InsLatT5	1,17	0,23	-0,96	3,30
InsT7 - InsLatT7	0,61	0,47	-1,34	2,56
LatT3 - InsLatT3	0,25	0,80	-2,06	2,57
LatT5 - InsLatT5	0,10	0,91	-2,09	2,29
LatT7 - InsLatT7	-0,31	0,73	-2,39	1,77

APÊNDICE M

Resultados do modelo de efeitos mistos - Yellow (log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	-0,73	0,55	-4,12	2,67
ConT3 - ConT7	-0,61	0,60	-3,88	2,66
ConT5 - ConT7	0,12	0,92	-3,15	3,39
InsT3 - InsT5	-0,36	0,79	-4,21	3,49
InsT3 - InsT7	-0,16	0,90	-4,01	3,69
InsT5 - InsT7	0,20	0,85	-2,94	3,34
LatT3 - LatT5	-1,16	0,41	-5,01	2,68
LatT3 - LatT7	-1,52	0,44	-6,96	3,92
LatT5 - LatT7	-0,35	0,84	-5,32	4,61
InsLatT3 - InsLatT5	-0,19	0,88	-3,82	3,44
InsLatT3 - InsLatT7	-0,50	0,68	-4,01	3,02
InsLatT5 - InsLatT7	-0,30	0,80	-3,82	3,21
ConT3 - InsT3	1,36	0,35	-2,59	5,32
ConT5 - InsT5	1,73	0,19	-1,54	5,00
ConT7 - InsT7	1,81	0,16	-1,33	4,95
ConT3 - LatT3	1,34	0,36	-2,61	5,30
ConT5 - LatT5	0,91	0,44	-2,36	4,18
ConT7 - LatT7	0,44	0,80	-4,53	5,40
ConT3 - InsLatT3	0,40	0,74	-3,11	3,91
ConT5 - InsLatT5	0,93	0,46	-2,58	4,45
ConT7 - InsLatT7	0,51	0,65	-2,76	3,78
InsT3 - LatT3	-0,02	0,99	-4,46	4,42
InsT5 - LatT5	-0,82	0,47	-3,96	2,32
InsT7 - LatT7	-1,37	0,44	-6,34	3,59
InsT3 - InsLatT3	-0,96	0,50	-5,02	3,09
InsT5 - InsLatT5	-0,79	0,51	-4,19	2,60
InsT7 - InsLatT7	-1,30	0,30	-4,57	1,97
LatT3 - InsLatT3	-0,95	0,51	-5,00	3,11
LatT5 - InsLatT5	0,03	0,98	-3,37	3,42
LatT7 - InsLatT7	0,07	0,97	-4,98	5,12

APÊNDICE N

Resultados do modelo de efeitos mistos - *Green* (log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	-0,59	0,66	-5,60	4,41
ConT3 - ConT7	-0,60	0,64	-5,38	4,18
ConT5 - ConT7	-0,01	1,00	-4,79	4,77
InsT3 - InsT5	-1,51	0,34	-6,76	3,74
InsT3 - InsT7	-1,03	0,45	-5,72	3,67
InsT5 - InsT7	0,48	0,70	-4,21	5,18
LatT3 - LatT5	-0,34	0,80	-5,25	4,57
LatT3 - LatT7	-1,42	0,49	-8,60	5,77
LatT5 - LatT7	-1,08	0,60	-8,50	6,34
InsLatT3 - InsLatT5	0,48	0,73	-4,76	5,73
InsLatT3 - InsLatT7	-1,08	0,47	-6,32	4,17
InsLatT5 - InsLatT7	-1,56	0,33	-6,81	3,69
ConT3 - InsT3	2,16	0,21	-2,97	7,29
ConT5 - InsT5	1,24	0,41	-3,89	6,37
ConT7 - InsT7	1,73	0,23	-2,58	6,04
ConT3 - LatT3	1,53	0,30	-3,25	6,31
ConT5 - LatT5	1,79	0,27	-3,34	6,92
ConT7 - LatT7	0,72	0,71	-6,47	7,90
ConT3 - InsLatT3	0,32	0,81	-4,80	5,45
ConT5 - InsLatT5	1,40	0,36	-3,73	6,53
ConT7 - InsLatT7	-0,15	0,91	-5,06	4,76
InsT3 - LatT3	-0,63	0,64	-5,54	4,28
InsT5 - LatT5	0,55	0,70	-4,70	5,79
InsT7 - LatT7	-1,02	0,60	-8,06	6,02
InsT3 - InsLatT3	-1,84	0,27	-7,08	3,41
InsT5 - InsLatT5	0,16	0,91	-5,09	5,41
InsT7 - InsLatT7	-1,89	0,23	-6,58	2,81
LatT3 - InsLatT3	-1,21	0,40	-6,12	3,70
LatT5 - InsLatT5	-0,39	0,78	-5,64	4,86
LatT7 - InsLatT7	-0,87	0,66	-8,29	6,55

APÊNDICE O

Descrição em porcentagem das variáveis alfa actina de músculo liso, fator de von Willebrand e panqueratina por grupo e tempo.

Grupo	Tempo	Variável	Média	Desvio padrão	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Controle	3	Alfa_Actina	37,25	16,91	13,7	26,39	41,67	51,37	53,12
		Von_Willebrand	20,62	6,95	11,18	16,2	22,88	23,9	28,92
		Pan_keratina	14,58	3,27	10,53	12,42	14,78	16,25	18,92
	5	Alfa_Actina	36,24	10,66	23,45	28,67	36,18	43,81	49,15
		Von_Willebrand	21,69	7,69	15,52	15,87	19,59	27,52	32,08
		Pan_keratina	17,28	4,93	13,53	13,64	14,25	20,7	24,28
	7	Alfa_Actina	41,04	17,17	26,44	27,76	33,99	50,47	66,56
		Von_Willebrand	21,46	3,37	17,73	18,57	21,57	23,74	25,71
		Pan_keratina	13,4	7,79	4,32	6,71	14,06	20,21	21,68
Insulina	3	Alfa_Actina	40,43	11,89	26,61	29,16	44	49,93	52,45
		Von_Willebrand	28,16	7,4	20,13	21,98	27,22	35,31	36,18
		Pan_keratina	16,02	5,75	9,91	11,65	14,75	20,3	23,49
	5	Alfa_Actina	63,98	2,53	60,86	62,69	64,08	64,58	67,7
		Von_Willebrand	32,42	8,58	24,32	25,63	28,87	41,34	41,95
		Pan_keratina	32,35	2,33	29,8	31,63	32,08	32,1	36,16
	7	Alfa_Actina	64,06	6,58	51,84	59,87	65,96	68,22	72,46
		Von_Willebrand	28,3	10,1	13,8	21,62	28,52	35,11	44,64
		Pan_keratina	22,17	8,46	9,25	17,7	20,76	27,57	36,6
Latex	3	Alfa_Actina	37,22	16,67	18,72	18,72	41,84	51,09	51,09
		Von_Willebrand	29,48	6,06	21,55	24,88	30,53	34,09	35,33
		Pan_keratina	15,86	2,31	13,56	14,36	15,12	16,89	19,35
	5	Alfa_Actina	60,84	10,13	52,84	54,16	56,83	62,74	77,63
		Von_Willebrand	29,76	9,55	15,97	24,94	31,14	37,86	38,9
		Pan_keratina	25,23	7,75	17,75	20,26	22,68	28,25	37,23
	7	Alfa_Actina	64,72	5,29	58,81	60,03	65,16	68,52	71,06
		Von_Willebrand	22,32	9,46	13,44	13,7	23,94	24,11	36,42
		Pan_keratina	23,82	6,11	18,47	19,35	22,94	24,57	33,79
Ins+Lat	3	Alfa_Actina	53,45	20,02	32,01	37,84	51,9	69,07	78
		Von_Willebrand	31,12	11,57	14,54	24,06	34,27	38,19	41,41
		Pan_keratina	24,18	5,77	17,18	19,19	25,94	27,91	30,69
	5	Alfa_Actina	62,53	8,48	52	56,21	63,69	67,85	72,89
		Von_Willebrand	31,84	3,33	27,65	30,52	30,67	34,34	36
		Pan_keratina	30,53	4,16	26,02	26,9	30,86	32,84	36,04
	7	Alfa_Actina	55,4	9,55	41,74	47,52	56,63	61,87	69,41
		Von_Willebrand	25,36	10,52	10,83	14,79	28,17	33,49	39,2
		Pan_keratina	22,34	5,84	14,78	17,78	21,22	28,34	29,27

APÊNDICE P

Resultados do modelo de efeitos mistos - Panqueratina(log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	-0,16	0,54	-0,72	0,41
ConT3 - ConT7	0,23	0,36	-0,32	0,78
ConT5 - ConT7	0,38	0,13	-0,14	0,91
InsT3 - InsT5	-0,75	0,01	-1,26	-0,25
InsT3 - InsT7	-0,30	0,15	-0,75	0,14
InsT5 - InsT7	0,45	0,05	0,01	0,89
LatT3 - LatT5	-0,43	0,09	-0,95	0,09
LatT3 - LatT7	-0,39	0,11	-0,89	0,11
LatT5 - LatT7	0,04	0,86	-0,48	0,56
InsLatT3 - InsLatT5	-0,23	0,33	-0,75	0,29
InsLatT3 - InsLatT7	0,09	0,67	-0,38	0,56
InsLatT5 - InsLatT7	0,32	0,17	-0,18	0,81
ConT3 - InsT3	-0,08	0,75	-0,63	0,47
ConT5 - InsT5	-0,67	0,02	-1,20	-0,15
ConT7 - InsT7	-0,61	0,01	-1,05	-0,16
ConT3 - LatT3	-0,11	0,65	-0,66	0,44
ConT5 - LatT5	-0,38	0,14	-0,93	0,16
ConT7 - LatT7	-0,73	0,01	-1,23	-0,23
ConT3 - InsLatT3	-0,52	0,06	-1,07	0,03
ConT5 - InsLatT5	-0,59	0,04	-1,13	-0,05
ConT7 - InsLatT7	-0,66	0,01	-1,13	-0,18
InsT3 - LatT3	-0,03	0,88	-0,54	0,47
InsT5 - LatT5	0,29	0,23	-0,23	0,81
InsT7 - LatT7	-0,12	0,54	-0,56	0,32
InsT3 - InsLatT3	-0,44	0,08	-0,94	0,06
InsT5 - InsLatT5	0,08	0,72	-0,44	0,61
InsT7 - InsLatT7	-0,05	0,79	-0,46	0,36
LatT3 - InsLatT3	-0,41	0,10	-0,91	0,10
LatT5 - InsLatT5	-0,20	0,40	-0,75	0,34
LatT7 - InsLatT7	0,07	0,73	-0,40	0,54

APÊNDICE Q

Resultados do modelo de efeitos mistos – Alfa Actina (log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	-0,10	0,63	-0,60	0,39
ConT3 - ConT7	-0,20	0,35	-0,67	0,28
ConT5 - ConT7	-0,09	0,65	-0,57	0,38
InsT3 - InsT5	-0,50	0,03	-0,94	-0,05
InsT3 - InsT7	-0,49	0,02	-0,89	-0,10
InsT5 - InsT7	0,003	0,98	-0,39	0,40
LatT3 - LatT5	-0,57	0,04	-1,09	-0,04
LatT3 - LatT7	-0,64	0,02	-1,15	-0,12
LatT5 - LatT7	-0,07	0,73	-0,53	0,39
InsLatT3 - InsLatT5	-0,21	0,32	-0,70	0,27
InsLatT3 - InsLatT7	-0,08	0,67	-0,52	0,36
InsLatT5 - InsLatT7	0,13	0,47	-0,29	0,56
ConT3 - InsT3	-0,21	0,32	-0,68	0,26
ConT5 - InsT5	-0,60	0,02	-1,07	-0,13
ConT7 - InsT7	-0,51	0,02	-0,90	-0,11
ConT3 - LatT3	-0,08	0,73	-0,62	0,46
ConT5 - LatT5	-0,54	0,03	-1,03	-0,06
ConT7 - LatT7	-0,52	0,03	-0,96	-0,07
ConT3 - InsLatT3	-0,47	0,06	-0,97	0,03
ConT5 - InsLatT5	-0,58	0,03	-1,06	-0,10
ConT7 - InsLatT7	-0,35	0,08	-0,77	0,06
InsT3 - LatT3	0,13	0,56	-0,38	0,64
InsT5 - LatT5	0,06	0,76	-0,40	0,52
InsT7 - LatT7	-0,01	0,94	-0,41	0,38
InsT3 - InsLatT3	-0,26	0,22	-0,73	0,21
InsT5 - InsLatT5	0,02	0,91	-0,43	0,48
InsT7 - InsLatT7	0,15	0,34	-0,20	0,51
LatT3 - InsLatT3	-0,39	0,12	-0,93	0,15
LatT5 - InsLatT5	-0,04	0,85	-0,51	0,43
LatT7 - InsLatT7	0,16	0,37	-0,25	0,58

APÊNDICE R

Resultados do modelo de efeitos mistos - Von Willebrand (log).

Comparações	Estimativa	p-valor	IC95%	
			LI	LS
ConT3 - ConT5	-0,08	0,76	-0,67	0,52
ConT3 - ConT7	-0,10	0,68	-0,67	0,46
ConT5 - ConT7	-0,02	0,92	-0,61	0,56
InsT3 - InsT5	-0,14	0,55	-0,69	0,41
InsT3 - InsT7	0,03	0,89	-0,45	0,51
InsT5 - InsT7	0,17	0,42	-0,31	0,65
LatT3 - LatT5	0,002	0,99	-0,59	0,59
LatT3 - LatT7	0,33	0,21	-0,25	0,91
LatT5 - LatT7	0,33	0,20	-0,22	0,89
InsLatT3 - InsLatT5	-0,08	0,74	-0,67	0,51
InsLatT3 - InsLatT7	0,24	0,32	-0,30	0,77
InsLatT5 - InsLatT7	0,32	0,17	-0,19	0,83
ConT3 - InsT3	-0,35	0,18	-0,92	0,21
ConT5 - InsT5	-0,42	0,13	-1,00	0,16
ConT7 - InsT7	-0,22	0,30	-0,71	0,26
ConT3 - LatT3	-0,41	0,14	-1,01	0,19
ConT5 - LatT5	-0,33	0,22	-0,92	0,26
ConT7 - LatT7	0,02	0,92	-0,53	0,57
ConT3 - InsLatT3	-0,41	0,14	-1,01	0,19
ConT5 - InsLatT5	-0,42	0,13	-1,01	0,17
ConT7 - InsLatT7	-0,07	0,73	-0,57	0,43
InsT3 - LatT3	-0,06	0,82	-0,64	0,52
InsT5 - LatT5	0,09	0,72	-0,47	0,64
InsT7 - LatT7	0,25	0,26	-0,24	0,73
InsT3 - InsLatT3	-0,06	0,82	-0,64	0,52
InsT5 - InsLatT5	0,00	1,00	-0,55	0,56
InsT7 - InsLatT7	0,15	0,42	-0,28	0,58
LatT3 - InsLatT3	0,00	1,00	-0,61	0,61
LatT5 - InsLatT5	-0,09	0,72	-0,65	0,48
LatT7 - InsLatT7	-0,10	0,66	-0,60	0,41

10. ANEXO

ANEXO

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 082/2007, sobre o projeto intitulado “*Os efeitos da utilização de insulina e de implante transitório (biomembrana natural de látex) em um modelo experimental de perfuração traumática de membrana timpânica*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Miguel Ângelo Hyppolito**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de 27 de agosto de 2007.

(We certify that the protocol nº 082/2007, about “*Use of the insulin and natural latex biomembrane in an experimental model of traumatic tympanic membrane perforation repair*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 08/27/2007 meeting).

Ribeirão Preto, 28 de agosto de 2007.

Profa. Dra. CLÁUDIA MARIA LEITE MAFFEI
Presidente, em exercício, da Comissão de Ética
em Experimentação Animal

ANEXO DE PUBLICAÇÃO

Otologia/base de crânio média e posterior

Marcos Miranda de Araujo; Adriana Andrade Batista Murashima; Vani Maria Alves;
Maria Rossato; Miguel Angelo Hyppolito

Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Miguel Angelo Hyppolito - Departamento de Oftalmologia,
Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Av. Bandeirantes, 3900 - 14049-900 -
Ribeirão Preto - SP - Fone: 16-36022862 - Fax: 16-3602-2860
e-mail: mahyppo@fmrp.usp.br

Trabalho Experimental

Otologia/base de crânio média e posterior

Código de fluxo: 9365 (42º Congresso Brasileiro de Otorrinolaringologia)

Efeitos da utilização de insulina e de um implante transitório de biomembrana de látex natural, derivado da seringueira *Hevea brasiliensis*, em um modelo experimental de perfuração traumática de membrana timpânica.

Effects of the treatment using insulin and a transitory natural latex biomembrane implant from rubber tree *Hevea brasiliensis*, in an experimental model of traumatic perforation of tympanic membrane.

Autores

Marcos Miranda de Araújo: Pós-graduação nível Doutorado pelo Departamento de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Médico Otorrinolaringologista formado pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Adriana Andrade Batista Murashima: Pós- graduação nível Mestrado - Técnica de nível superior do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HC da FMRP-USP.

Vani Maria Alves: Técnica de nível superior - Técnica do Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP

Maria Rossato: Técnica de nível superior - Técnica do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HC da FMRP-USP.

Miguel Angelo Hyppolito: Professor Doutor - Professor Doutor do Departamento de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Descritores (Português)

Perfuração da Membrana Timpânica;
Cicatrização; Insulina; Látex; Histologia

Descritores (Inglês)

Tympanic Membrane Perforation;
Wound Healing; Insulin; Latex;
Histology

Resumo

Nos últimos anos, houve uma tendência na busca por substâncias reguladoras que pudessem otimizar o processo de cicatrização de membranas timpânicas (MTs) perfuradas. Objetivos: Determinar os efeitos da utilização da insulina tópica e da biomembrana de látex natural, de forma isolada e em associação, no processo de cicatrização de perfurações traumáticas de MTs. Materiais e

Abstract

In recent years, there has been a tendency to search for regulatory substances that can optimize the healing process of tympanic membranes (TMs). Objectives: To determine the effects of using topical insulin and latex natural biomembrane, alone or in association, in the healing process of traumatic perforations of TMs. Methods: For this experimental study, TMs of 61 Wistar

Métodos: MTs de 61 ratos Wistar foram perfuradas nas porções anterior e posterior ao cabo do martelo. Os animais foram divididos em 4 grupos: Controle, Insulina, Látex e Insulina+Látex. As MTs foram avaliadas histologicamente com 3, 5 e 7 dias após perfuração, por análise morfométrica de espessuras das camadas epitelial, fibrosa e mucosa; tamanho da perfuração; área da MT; avaliação semiquantitativa da produção de colágeno e avaliação imuno-histoquímica da atividade epitelial, de miofibroblastos e da vascularização. **Resultados:** A insulina e a biomembrana de látex anteciparam o fechamento da camada epitelial externa da MT, promoveram aumento precoce da espessura da camada fibrosa e maior proliferação de miofibroblastos na lâmina própria da MT. A insulina isoladamente provocou maior formação do colágeno tecidual, com fibras colágenas mais espessas e melhor organizadas. **Conclusões:** A insulina e a biomembrana de látex natural, de forma isolada e em associação, aceleraram o processo de cicatrização de perfurações traumáticas de MTs, o que permite estudos futuros em perfurações timpânicas em humanos.

rats were perforated in two sections, anterior and posterior to the malleus. The rats were divided into 4 groups: Control, Insulin, Latex, and Insulin+Latex. The TMs were examined histologically after 3, 5, and 7 days by morphometric evaluation of the thickness of the epithelial, fibrous, and mucosal layers; size of the perforation; area of the TM; semiquantitative evaluation of the collagen production and the immunohistochemical markers of the epithelial activity, myofibroblasts, and vascularization. **Results:** Insulin and latex biomembrane accelerated the closing of the external epithelial layer of the TM, promoted a premature increase in the thickness of the fibrous layer and greater proliferation of myofibroblasts in the lamina propria of the TM. When insulin was used alone, it resulted in greater formation of collagen tissue, with thicker and better-organized collagen fibers. **Conclusion:** Insulin and natural latex biomembrane, alone and in association, accelerated the healing process of traumatic perforations of TMs.

Trabalho submetido em 15/7/2012 20:50:20

Instituição: Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Correspondência: Marcos Miranda de Araujo, médico Otorrinolaringologista e Pós Graduando do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HC-FMRP-USP. Av. Bandeirantes, 3900 - 12º Andar. - Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brasil. CEP:14049-900. Fone:55 (16) 36022862. E-mail: drmarcosorl@usp.br; mahyppo@fmrp.usp.br.

Suporte Financeiro: FAPESP

Carta ao Editor

Ribeirão Preto, 20 de Julho de 2012.

Editores do Brazilian Journal of Otorhinolaryngology

Senhores,

Nós estamos submetendo o artigo "Efeitos da utilização de insulina e de um implante transitório de biomembrana de látex natural, derivado da seringueira *Hevea brasiliensis*, em um modelo experimental de perfuração traumática de membrana timpânica" como uma contribuição original para ser apresentado como Tema Livre para o Congresso Brasileiro de ORL- Recife 2012. Nesse artigo, nós analisamos e discutimos os efeitos do uso tópico de uma substância reguladora do processo de cicatrização (insulina), de forma isolada e associada, com o uso de um implante transitório (biomembrana de látex natural) em perfurações traumáticas de membranas timpânicas (MTs). O uso de um fator de crescimento associado a um implante transitório foi utilizado previamente por Hakuba et al. (2003), quando foi proposto o uso de bFGF combinado com o uso de uma membrana composta por colágeno e silicone. Este ensaio clínico foi realizado em 9 pessoas adultas que apresentavam perfuração crônica de MT, obtendo resultado efetivo no tratamento conservador de MT perfurada. Tal estudo foi ampliado para 87 pacientes, sendo atingido o fechamento completo das perfurações timpânicas em 80 pacientes (92%), sendo bFGF combinado com atelocolágeno considerado efetivo no tratamento conservador de perfurações de MT (HAKUBA et al., 2010).

Após revisão de literatura, não foram encontrados trabalhos prévios que estudassem os efeitos da utilização de insulina e da biomembrana de látex natural, derivado da seringueira *Hevea brasiliensis*, em associação, no processo cicatricial de tecidos animais em geral e, conseqüentemente, nem em modelo experimental de perfurações de membranas timpânicas.

Outra contribuição original do nosso trabalho foi a avaliação da birrefringência do colágeno na cicatrização de MT com uso de coloração *Picrosirius Red* (PSR) sob microscopia de polarização. Até o presente momento, não foi identificado outro trabalho que descrevesse o processo de cicatrização de MT em ratos utilizando a coloração PSR sob luz polarizada.

Além do efeito da insulina no metabolismo energético, uma revisão de literatura aduz que o hormônio da insulina pode influenciar o processo de cicatrização de feridas. Os primeiros estudos do uso de insulina no processo de cicatrização remontam à primeira metade do século XX. Stuck (1932) percebeu que o uso de insulina sistêmica em coelhos submetidos a fraturas de tíbia provocou a aceleração do processo de cicatrização óssea, sem necessariamente alterar o tecido ósseo histologicamente. Em MTs, foi encontrado o primeiro trabalho do uso de insulina em 2007 (EKEN et al., 2007). Na época dessa publicação, já havíamos iniciado nosso trabalho e mantivemos a proposta inicial. A vontade de avançar no entendimento dos efeitos da insulina e da biomembrana de látex nos motivou a aperfeiçoar nossa metodologia, fornecendo resultados animadores do uso desses tratamentos como indutores da cicatrização.

As técnicas microcirúrgicas (miringoplastias) requerem investimento de capital e treinamento especializado. Por isso, há um grande interesse em desenvolver métodos minimamente invasivos, menos dispendiosos e que acelerem a

cicatrização de MT de uma forma segura e eficaz.

Atenciosamente,

Marcos Miranda de Araujo, médico Otorrinolaringologista e Pós Graduando nível Doutorado

Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMRP- USP, Av. Bandeirantes, 3900 - 12º andar - Monte Alegre, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. CEP: 14049-900. Fone: 55 (16) 36022862. E-mail: drmarcosorl@usp.br.

Referências:

1. EKEN, M.; ATES, G.; SANLI, A.; EVREN, C.; BOZKURT, S. The effect of topical insulin application on the healing of acute tympanic membrane perforations: a histopathologic study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, Heidelberg, v. 264, n. 9, p. 999-1002, Sep. 2007.
2. HAKUBA, N.; TANIGUCHI, M.; SHIMIZU, Y.; SUGIMOTO, A.; SHINOMORI, Y.; GYO, K. A new method for closing tympanic membrane perforations using basic fibroblast growth factor. *Laryngoscope*, St. Louis, v. 113, n. 8, p. 1352-1355, Aug. 2003.
3. HAKUBA, N.; IWANAGA, M.; TANAKA, S.; HIRATSUKA, Y.; KUMABE, Y.; KONISHI, M.; OKANOUE, Y.; HIWATASHI, N. WADA, T. Basic fibroblast growth factor combined with atelocollagen for closing chronic tympanic membrane perforations in 87 patients. *Otol Neurotol*, Hagerstown, v. 31, n. 1, p. 118-121, Jan. 2010.
4. STUCK, W. G. The effect of insulin on the healing of experimental fractures in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am*, Boston, v. 14, n. 1, p. 109-115, Jan. 1932.

1. Introdução

Nas últimas décadas, tem se buscado substâncias reguladoras para otimizar o processo de cicatrização de membrana timpânica (MT), o que possibilitaria uma abordagem terapêutica com procedimentos mais simples e menos onerosos, que acelerem a cicatrização timpânica de forma madura, segura e eficaz¹. Com o advento das técnicas de biologia molecular, os fatores de crescimento passaram a ser empregados em pesquisas envolvendo mecanismos de cicatrização de diferentes tecidos².

A insulina é um hormônio que regula a homeostase da glicose e as funções de absorção de nutrientes, bem como a síntese de glicogênio, de lipídios, de determinados aminoácidos e de proteínas³. Esse hormônio também tem sido estudado como promotor do processo de cicatrização em cultura de células *in vitro*^{4, 5, 6}, em modelos animais^{6, 7, 8, 9} e em humanos^{9, 10, 11, 12}, tanto com uso tópico quanto injetável. Tais estudos reforçam a possibilidade de que a insulina pode atuar como fator de crescimento⁶ pertencente à família insulina-símile na cicatrização tecidual. A insulina regular utilizada topicamente em modelo experimental de perfuração traumática de MT promoveu o aumento da atividade fibroblástica e da produção do colágeno no processo de cicatrização de MT de cobaias¹³.

Outra linha de pesquisa envolvendo abordagem minimamente invasiva e ambulatorial de miringoplastia está associada ao uso de implantes transitórios sobre perfurações timpânicas com o propósito de servir de suporte vetorial temporário para regeneração do tímpano¹⁴. Dentre esses materiais, houve a utilização de implante de papel, derivado de arroz¹⁴; biomembrana de látex natural, derivado da seringueira *Hevea brasiliensis*¹; bioimplante derivado do bicho da seda, *Bombyx mori*¹⁵.

A biomembrana de látex, da seringueira *Hevea brasiliensis*, atua como indutor de cicatrização em diferentes tecidos^{16, 17}. Estudos preliminares retrospectivos sugerem maior vascularização dos enxertos de membranas timpânicas quando é utilizada a membrana de látex natural como implante transitório em miringoplastias¹.

O propósito do presente estudo foi associar o uso tópico de uma substância reguladora do processo de cicatrização com o método ambulatorial de implante transitório, e verificar o papel de cada elemento, isoladamente e em associação, no

processo cicatricial de perfurações agudas de membranas timpânicas.

Os objetivos deste estudo foram determinar os efeitos da utilização da insulina regular e da biomembrana de látex natural, de forma isolada e em associação, no processo de cicatrização de perfurações traumáticas de MTs.

2. Materiais e Métodos

O estudo foi realizado com ratos albinos machos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, pesando em média 280g (variação 270g a 290g). Após exame com otomicroscópio, 61 animais com membranas timpânicas íntegras e translúcidas foram incluídos no estudo. Este estudo experimental esteve de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética de Experimentação Animal (CETEA) em 27/08/2007 - protocolo para uso de animais em experimentação nº 082/2007.

Antes do procedimento, todos os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina intramuscular (40mg/kg) e hidrocloreto de xylazina (5mg/kg) intramuscular.

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos: Controle, Insulina, Látex, Insulina+Látex.

No grupo Controle (GCon), composto por 12 animais, procederam-se as perfurações traumáticas da MT com agulha BD (Becton Dickinson Ind. Cir. Ltda, Minas Gerais, Brasil) 30x0,8 mm anterior e posteriormente ao cabo do martelo na região da *pars tensa* da MT. Para a avaliação histológica, foram sacrificados três animais após três dias da perfuração timpânica (5 bulas), quatro após cinco dias (5 bulas) e cinco após sete dias (5 bulas).

No grupo Insulina (GIns), composto por 19 animais, foram realizadas as perfurações da MT com agulha BD 30x0,8 mm anterior e posteriormente ao cabo do martelo na região da *pars tensa* da MT. As perfurações timpânicas foram tratadas com 15 Unidades de Insulina Humana Regular Novolin ® R (100 UI/ml) (Novo Nordisk ® Brasil, Minas Gerais, Brasil) uma vez ao dia, diariamente. Para avaliação histológica, foram sacrificados cinco animais após três dias da perfuração timpânica (5 bulas), cinco após cinco dias (5 bulas) e nove após sete dias (9 bulas).

No grupo Látex (GLat), composto por 14 animais, foram realizadas as

perfurações da MT com agulha BD 30x0,8 mm anterior e posteriormente ao cabo do martelo na região da *pars tensa* da MT. Foram confeccionados bioimplantes de 1,2 mm de diâmetro de membrana de látex, apoiados externamente aos bordos da perfuração timpânica, anterior e posteriormente ao cabo do martelo, sob visão de otomicroscopia. Para a avaliação histológica, foram sacrificados cinco animais após três dias da perfuração timpânica (5 bulas), quatro após cinco dias (5 bulas) e cinco animais após sete dias (7 bulas).

No grupo Insulina+Látex (GInsLat), composto por 16 animais, foram realizadas as perfurações da MT com agulha BD 30x0,8 mm anterior e posteriormente ao cabo do martelo na região da *pars tensa* da MT. Foram confeccionados bioimplantes de 1,2 mm de diâmetro de membrana de látex. Cada membrana de látex foi apoiada externamente aos bordos da perfuração timpânica, sobre a perfuração anterior e posteriormente ao cabo do martelo, sob visão de otomicroscopia. As perfurações timpânicas foram tratadas com 15 Unidades de Insulina Humana Regular Novolin ® R (100 UI/ml) (Novo Nordisk ® Brasil, Minas Gerais, Brasil) uma vez ao dia, diariamente. Para avaliação histológica, foram sacrificados cinco animais após três dias da perfuração timpânica (5 bulas), quatro após cinco dias (5 bulas) e sete após sete dias (9 bulas).

Os animais foram sacrificados por injeção intraperitoneal com dose excessiva de Tiopental e as bulas removidas. As bulas foram fixadas em formalina 10%, descalcificadas em EDTA e incluídas em parafina.

Foram realizados cortes histológicos de 6 µm de espessuras, corados em Hematoxilina e Eosina (HE), *Picrosirius Red* (PSR) e marcação Imuno-histoquímica (IHQ).

Na avaliação IHQ, foram utilizados anticorpos primários originários de camundongo anti-panqueratina (1:50) (Abcam, Cambridge, UK) e anti-alfa-actina de músculo liso (1:50) (Abcam, Cambridge, UK); e anticorpo primário originário de coelho anti-fator de von Willebrand (FvW) (1:50) (Millipore, Massachusetts, EUA). Após, foram utilizados os anticorpos secundários, conjugados com peroxidase de rábano, anti-camundongo (1:250) (Jackson Immunoresearch, Pennsylvania, EUA) e anti-coelho (1:250) (Jackson Immunoresearch, Pennsylvania, EUA). Incubados na solução reveladora de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), como cromógeno, e contra-

coloração com hematoxilina de Harris.

Utilizou-se o anticorpo anti-panqueratina para detecção de citoqueratinas, que são constituintes do citoesqueleto das células epiteliais, correspondendo a marcadores epiteliais de eleição^{18,19}. Utilizou-se o anticorpo primário anti-alfa-actina de músculo liso que reage com a isoforma alfa-actina de músculo liso expressa por miofibroblastos durante a cicatrização tecidual²⁰. Utilizou-se o anticorpo primário anti-FvW como marcador de células endoteliais^{21, 22}.

2.1. Microscopia

2.1.1. Análise morfométrica

A avaliação histológica foi realizada com a utilização de microscópio Olympus BX50 (Olympus America, Inc., Pennsylvania, EUA) e as imagens foram capturadas com câmera Spot RT3 (Diagnostic Instruments, Inc., Michigan, EUA) acoplada ao microscópio, fornecendo uma imagem colorida RGB de 8-bit.

Utilizou-se o programa Image Pro-Plus ® v. 7.0 (Media Cybernetics, Inc., Maryland, USA) para análise morfométrica de imagens digitais de alta resolução de cortes histológicos de MT corados em HE, com aferição da espessura das camadas epitelial externa, lâmina própria e mucosa da MT. Quando havia perfuração de MT, as espessuras foram aferidas a distâncias entre 50 e 100 µm da margem da perfuração. Em MT intactas ou cicatrizadas, as espessuras foram aferidas a distâncias de 450 a 500 µm do cabo do martelo. A calibração utilizada pelo sistema digital de análise de imagens foi de 0,5420 *pixel*/µm com magnificação de 40x; 1,3640 *pixel*/µm, de 100x; 2,740 *pixel*/µm, de 200x; e 5,420 *pixel*/µm, de 400x.

As perfurações das membranas timpânicas também foram dimensionadas nas porções anterior e posterior ao cabo do martelo, medindo-se a distância linear entre as bordas das perfurações timpânicas.

Utilizou-se o programa Image Pro-Plus ® v. 7.0 (Media Cybernetics, Inc., Maryland, EUA) para calcular a Área de secção transversal de cada MT usando a ferramenta de aplicação descrita no tutorial: “Wound Healing” (do inglês, cicatrização de feridas), disponível em

<<http://www.mediacy.com/Tutorials/WoundHealing/WoundHealing.html>>. Foi aberta a imagem pelo Image Pro-Plus ® v. 7.0; em seguida, utilizando a função *Process, Large Spectral Filters> Edge (-)> Apply*. Em seguida, *Filters> Morphological> Close 11x11*. Após, *Count/Size> Segmentation> Select ranges*. Pelo histograma de cores, de maneira automatizada, foi selecionada a variação de cores da região de interesse, determinando a medida Área da MT, integralmente visualizada com aumento de 20X, realizando correlação de 0,2720 pixels/ μ m em cada medida linear.

2.1.2. Análise computadorizada do colágeno de imagens com coloração de picrosirius red sob luz polarizada

As imagens foram analisadas usando um microscópio Olympus BX50 (Olympus America, Inc., Pensilvânia, EUA) equipados com filtros polarizadores dispostos de forma cruzada para fornecer iluminação polarizada. Utilizou-se o programa ImageJ versão 1.46g desenvolvido por National Institutes of Health (NIH, EUA) e disponível no site <http://rsbweb.nih.gov/ij/> para análise do colágeno de imagens capturadas de alta resolução de MT.

Nas lâminas coradas com PSR e submetidas à luz polarizada, as fibras colágenas aparecem brilhantes, ou birrefringentes, enquanto o espaço intersticial e elementos não colágenos aparecem escuros²³. As imagens foram obtidas com aumento de 20X, fazendo uma correlação de 0,2720 pixels/ μ m em cada medida linear após calibração.

A etapa seguinte foi determinar a cor (ou “hue”, do inglês) de cada pixel das imagens com luz polarizada. É conhecido que a cor das fibras colágenas coradas com PSR e visualizadas sob luz polarizada depende da espessura da fibra. À medida que a espessura da fibra aumenta, a cor muda do verde para o amarelo, laranja e vermelho^{24,25}. Para determinar a proporção das diferentes tonalidades de fibras colágenas foi convertida a imagem em HSB (“hue, saturation, brightness”): *Image> Type> HSB Stack*. Em seguida, *Image> Adjust> Threshold*. Apenas o componente “hue” foi retido e um histograma de frequência de cores foi obtido de imagens de 8-bit, que contêm 256 cores. Foram usadas as seguintes definições de cores: vermelho 2-9 e 230-256, laranja 10-38, amarelo 39-51, verde 52-128²³. A variação de cores de 129-229 consistiu de espaço intersticial e elementos teciduais não-birrefringentes como hemácias²³. Foi feita

a relação entre a área ocupada pelo colágeno total e a área total da MT, que fora previamente calculada para cada MT.

As frações das diferentes espessuras de fibras colágenas foram determinadas pela divisão do número de pixels de cada área correspondente a cada variação de cores, pelo total de pixels de colágeno avaliado em cada MT²⁶.

2.1.3. Análise computadorizada de imagens com coloração imuno-histoquímica

Utilizou-se o algoritmo desenvolvido por Ruifrok e Johnston²⁷ (2001), descrito como “*Color Deconvolution*” (do inglês, decomposição de cores), um método flexível de separação e quantificação de colorações imuno-histoquímicas por análise de imagens coloridas. Este algoritmo de imagem permitiu análise das amostras coradas com Hematoxilina e DAB, usando microscópio e instalação de câmera RGB padrão e um programa de domínio público de imagem ImageJ versão 1.46g (NIH, EUA).

Pelo ImageJ (NIH, EUA), foram abertas imagens de MT com aumento de 20X, com uma correlação de 0,2720 pixels/ μm em cada medida linear, e foi realizada a seleção da área de interesse correspondendo à MT por inteiro. Em seguida, função *Process > subtract background > ok*. Após, *Plugins > Colour Deconvolution > Vectors H DAB > ok*. Nesta última ação, foi informada a coloração utilizada, Hematoxilina e DAB. Após a decomposição de cores, foi trabalhado na matriz correspondente à coloração DAB (*Colour_2*). *Edit > Selection > Restore Selection. Image > Adjust > Threshold > Auto. Analyse > Measure*. Dessa forma, foi determinada a área de superfície corada com DAB.

Em seguida, foi calculada a porcentagem de área corada com DAB, isto é, a área da MT corada com DAB, dividido pela área total da MT, que fora previamente calculada.

A porcentagem de área corada com DAB, conforme fórmula anterior, foi descrita e analisada por Brey et al.²⁸, que compararam o método manual (padrão-ouro) com dois observadores com oito métodos automatizados diferentes.

2.2. Análise Estatística

Inicialmente, foi realizada uma análise exploratória dos dados. Apesar de existir

independência entre as medidas ao longo do tempo (animais diferentes em cada tempo), foram coletadas informações das orelhas direita e esquerda de alguns animais, o que exigiu o uso de um modelo que contemple essa característica no estudo. Assim, para se atingir o objetivo, foi proposto um modelo de efeitos mistos. Os modelos lineares de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) são utilizados na análise das respostas de um mesmo indivíduo na forma de agrupamentos, ou seja, a suposição de independência entre observações num mesmo grupo não é adequada²⁹. Esses modelos têm como pressuposto que seus resíduos tenham distribuição normal com média 0 e variância σ^2 . Para que esse pressuposto fosse atendido, uma transformação logarítmica foi aplicada às variáveis respostas. Foram estimados os contrastes ortogonais para se verificar onde estão as possíveis diferenças entre grupos e tempos. Foi utilizado o procedimento PROC MIXED do software SAS versão 9.2 (SAS Institute Inc., Carolina do Norte, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. Análise Morfométrica

3.1.1. Espessura da camada epitelial externa

As espessuras da camada epitelial com três e cinco dias foram maiores nos grupos de tratamento quando comparadas com o grupo Controle (GCon) ($p<0,01$) com pico de valores com cinco dias (Gráfico 1). Não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento com três dias. Com cinco dias, observou-se que o GInsLat apresentou valores maiores que o GLat ($p=0,01$). O GIns não apresentou diferença entre os demais grupos de tratamento.

Com sete dias, observou-se que o GCon apresentou espessuras epiteliais maiores que os grupos de tratamento, com $p<0,01$. Observou-se aumento gradativo da espessura epitelial no GCon ao longo dos sete dias (Gráfico 1). Nesse terceiro período, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento, que apresentaram redução da espessura epitelial (Gráfico 1).

Observaram-se centros proliferativos epiteliais na região do cabo do martelo (Figura 1A e 1B) e ânulus timpânico (Figuras 1A e 1C). Verificou-se que a camada

epitelial foi a primeira a fechar a perfuração (Figuras 2A e 2B).

3.1.2. Espessura da camada fibrosa

Em relação aos tempos três e cinco dias, houve maiores valores das camadas fibrosas dos grupos de tratamento quando comparados com o GCon ($p<0,01$, com 3 e com 5 dias), com valores mais altos no segundo período (Gráfico 2). Entre os grupos de tratamento, houve diferença entre InsT3 - InsLatT3 ($p=0,03$) e InsT5 - InsLatT5 ($p=0,03$).

Com sete dias, o GIns apresentou valores de espessura fibrosa menores que os demais grupos de forma estatisticamente significativa ($p<0,01$). Não houve diferença entre GCon, GLat e GInsLat. Observou-se aumento gradativo dos valores do grupo controle ao longo dos sete dias e redução dos valores nos grupos de tratamento (Gráfico 2).

3.1.3. Espessura da camada mucosa

O comportamento da variável mucosa foi o de aumento dos valores do tempo três para o tempo cinco dias, com pico de atividade neste segundo período para todos os grupos (Gráfico 3). Com cinco dias, houve diferença estatisticamente significativa entre ConT5 - InsLatT5 ($p=0,01$), com valores menores para InsLat.

Com sete dias, houve redução das espessuras mucosas em todos os grupos (Gráfico 3). Percebeu-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ConT7 - InsT7 ($p=0,01$) e ConT7 - InsLatT7 ($p=0,02$), com valores menores para GIns e GInsLat quando comparados aos demais grupos.

3.1.4. Medida linear da perfuração da MT

Os grupos de tratamento apresentaram menores perfurações com três dias ($p<0,01$) e com cinco dias ($p<0,01$) quando comparados com o GCon (Gráfico 4). Com cinco dias, houve cicatrização da MT na maior parte dos casos nos grupos de tratamento, que não apresentaram diferenças entre si na evolução do fechamento da perfuração timpânica.

Com sete dias, houve fechamento de todas as perfurações timpânicas do GIns e GInsLat (Gráfico 4). No GCon, não houve fechamento de 20% das perfurações, com

média de 57,86 μm e desvio-padrão de 158,37. No GLat, não houve fechamento de 20% das perfurações com média de 40,31 μm e desvio-padrão de 93,12.

3.1.5. Medida das áreas das MT

Houve uma tendência de aumento das medidas das áreas do GIns e do GInsLat com 5 dias e posterior redução com sete dias (Gráfico 5). No GCon e no GLat, houve a tendência de aumento das medidas das áreas ao longo dos sete dias (Gráfico 5). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento e nem com o GCon.

3.2. Análise Computadorizada do Colágeno de Imagens com Coloração de *Picrosirius Red* sob Luz Polarizada

As médias de porcentagens de birrefringência do colágeno total foram maiores no GIns, no GLat e no GInsLat nos períodos de três e cinco dias quando comparadas com o GCon. Houve pico de valores com cinco dias e posterior redução das medidas com sete dias nos grupos de tratamento (Gráfico 6).

A maior birrefringência para colágeno no GIns quando comparado com o GCon foi estatisticamente significativa com três dias ($p=0,01$) e cinco dias ($p=0,04$) (Gráfico 6) (Figuras 3A, 3B, 4A, 4B, 4C e 4D). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento entre si e nem entre os períodos de cada grupo.

Houve maior média de porcentagem de birrefringência da coloração *red* (vermelha) no GIns, no GLat e no GInsLat quando comparado com o GCon ao longo do tempo, com tendência de aumento dos valores de porcentagens desta coloração nos grupos de tratamento (Gráfico 7). Houve maior porcentagem de birrefringência desta coloração *red* estatisticamente significativa no GLat e no GInsLat com cinco dias ($p=0,03$) e ($p=0,05$), respectivamente, quando comparado com o GCon (Gráfico 7). Com sete dias, a diferença foi estatisticamente significativa quando comparado o GIns ($p=0,04$) com o GCon (Gráfico 7) (Figuras 4E, 4F, 4G e 4H). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de tratamento.

Observou-se uma maior média de porcentagem de coloração *Orange* (laranja), *Yellow* (amarela) e *Green* (verde) no GCon comparado com os demais grupos. Não

houve diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento comparados com o grupo controle ou entre os grupos de tratamento.

3.3. Análise Computadorizada de Imagens com Coloração Imuno-histoquímica

3.3.1. Avaliação da porcentagem do anticorpo anti-panqueratina

A marcação da panqueratina teve o pico com cinco dias e apresentou as médias mais altas nos grupos de tratamento (Gráfico 8).

A diferença entre o GCon e GIns foi estatisticamente significativa com cinco dias ($p=0,02$) e sete dias ($p=0,01$). Entre GCon e GLat, foi significativa a diferença com sete dias ($p=0,01$). Houve diferença estatística entre GCon e GInsLat com cinco dias ($p=0,04$) e sete dias ($p=0,01$). Não houve diferenças estatísticas entre GIns, GLat e GInsLat em relação à variável panqueratina.

A marcação anti panqueratina está ilustrada na Figura 5.

3.3.2. Avaliação da porcentagem do anticorpo anti-alfa-actina de músculo liso

Houve maiores médias de porcentagens anti-alfa-actina de músculo liso no GIns, no GLat e no GInsLat com cinco e sete dias quando comparados com o GCon (Gráfico 9).

Houve maior marcação estatisticamente significativa anti-alfa-actina de músculo liso no GIns e no GLat com cinco dias ($p=0,02$) e ($p=0,03$), respectivamente, e com sete dias ($p=0,02$) e ($p=0,03$), respectivamente, em relação ao GCon. O GInsLat apresentou maior marcação significativa de α -actina de músculo liso com cinco dias ($p=0,03$) quando comparado com o GCon. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento.

A marcação anti-alfa-actina de músculo liso está ilustrada na Figura 6.

3.3.3. Avaliação da porcentagem do anticorpo anti-fator de Von Willebrand

Houve maiores médias de porcentagens anti-FvW nos grupos de tratamento ao longo dos períodos (Gráfico 10). Nos grupos de tratamento, a marcação anti-FvW apresentou aumento de três para cinco dias, com pico neste segundo período, e posterior

redução de marcação com sete dias (Gráfico 10).

Não houve diferenças estatísticas entre o GCon, o GIns, GLat e o GInsLat em relação à marcação anti-FvW, que é um marcador de vascularização.

A marcação anti-FvW está ilustrada na Figura 7.

4. Discussão

A aplicação de insulina tópica e o uso da membrana de látex aceleraram o fechamento da MT com três e cinco dias de forma estatisticamente significativa em relação ao GCon (Gráfico 4). A associação insulina mais látex também acelerou a cicatrização com três e cinco dias em relação ao controle, mas não foi superior à aplicação isolada desses tratamentos. Com cinco dias, houve cicatrização da MT na maior parte dos casos nos grupos submetidos ao tratamento. Com sete dias, todas as perfurações do GIns e do GInsLat estavam cicatrizadas, mas 20% das perfurações do GCon e do GLat ainda persistiam. Em todos os casos, houve inicialmente a cicatrização da camada epitelial (Figuras 2A e 2B), que antecedeu ao fechamento das demais camadas fibrosa e mucosa. Não foi possível definir se, entre essas duas últimas camadas, houve tempos diferentes de fechamento.

Tanto a insulina quanto o látex, isoladamente e em associação, promoveram maior atividade na camada epitelial externa, com aumento de espessura epitelial nas regiões da perfuração timpânica, e com acentuada marcação por panqueratina, em toda a MT, quando comparadas ao controle. Houve um pico de atividade epitelial com cinco dias seguido de redução com sete dias (Gráfico 1 e Gráfico 8). O pico de cinco dias coincidiu com o fechamento da perfuração timpânica na maioria das orelhas tratadas. A camada epitelial foi a primeira a promover o fechamento da perfuração timpânica. Após o fechamento epitelial, a camada epitelial sofreu um processo de remodelação. Já no GCon, com sete dias, a espessura epitelial foi maior, pois houve fechamento de perfuração mais tardiamente, seguido por remodelação mais tardia. A associação insulina mais látex não foi superior aos demais grupos de tratamento em relação à atividade epitelial da MT.

Devido às características teciduais morfológicas da MT, um evento marcante da fase proliferativa é a reepitelização, com a presença do espessamento da camada

epitelial e seu avanço sobre os bordos da perfuração, que ocorre antecipadamente ao avanço da camada fibrosa^{30,31}. Essa atividade proliferativa da camada epitelial externa da MT foi descrita como ocorrendo já desde as primeiras horas após a injúria tecidual^{32, 33, 34}. Na literatura, há descrições de existência de centros proliferativos epiteliais próximos ao cabo do martelo e na região do ânulus timpânico^{35,36}. Identificou-se, contudo, um estudo que descreveu apenas um centro de proliferação epitelial próximo ao cabo do martelo³⁴. Distintamente deste, encontramos centros proliferativos epiteliais próximos ao cabo do martelo (Figura 1B) e na região do ânulus timpânico (Figura 1C), em concordância com os estudos anteriores^{35,36}.

A insulina e a membrana de látex são consideradas indutores da proliferação epitelial e da cicatrização. A insulina estimula a migração e proliferação de queratinócitos *in vitro*⁶; acelera a reepitelização de feridas cutâneas de ratos^{6,8}; e estimula a maturação do tecido cicatricial da epiderme em ratos sem diabetes e em ratos com diabetes⁸. Foram identificados na literatura ensaios clínicos prospectivos, randomizados, duplo-cegos e placebo-controlados que detectaram que a insulina tópica acelerou o processo de cicatrização de feridas em pacientes diabéticos^{9,11} e em pacientes não diabéticos^{11,37}. A biomembrana de látex natural reduziu o período de cicatrização de úlceras venosas crônicas com diminuição do tecido necrótico e organização do reparo tecidual e com diminuição concomitante de dor no tratamento¹⁷. Frade et al.³⁸ relataram dois casos de úlceras crônicas de região sacral em pacientes acamados, que foram refratárias a tratamentos convencionais, e que responderam a curativos de biomembrana de látex com formação de tecido de granulação e cicatrização adequado de feridas.

A medida de espessura da camada fibrosa foi maior com três dias nos grupos de tratamento em relação ao GCon, com maior espessura após cinco dias, estimulada pela ação da insulina e do látex, isoladamente e em associação (Gráfico 2). Essa variação da espessura coincidiu com o fechamento da MT com cinco dias na maioria das orelhas submetidas a tratamento. A redução da espessura da camada fibrosa nos grupos de tratamento com sete dias coincidiu com a antecipação da fase de remodelação dos grupos de tratamento em relação ao grupo controle nas regiões submetidas à perfuração timpânica. No GCon, a cicatrização da MT ocorreu tardiamente, coincidindo com a maior espessura da camada fibrosa com sete dias neste grupo (Gráfico 2).

A camada mucosa apresentou pico de espessura com cinco dias em todos os animais e remodelação com sete dias (Gráfico 3). A insulina, isoladamente e associada ao látex, antecipou a remodelação da camada mucosa com sete dias. Foi relatado em estudo prévio, que a camada mucosa interna contribuiu pouco com o processo cicatricial de MT³⁰. Por outro lado, mesmo sendo uma camada com arquitetura histológica menos complexa que as demais, é importante lembrar que os eventos cicatriciais das três camadas da MT precisam estar harmonicamente ordenados para que a adequada integridade da MT seja restabelecida.

Para identificação do colágeno, foi escolhida a coloração PSR. O colágeno, devido à sua organização molecular anisotrópica, é birrefringente e fica brilhante quando visualizado sob luz polarizada. A coloração PSR também tem uma organização molecular anisotrópica, o que permite realçar a birrefringência do colágeno³⁹.

As diferentes cores de birrefringência do colágeno identificadas pelo método de coloração PSR com luz polarizada foram relacionadas inicialmente com os diferentes tipos de colágeno²⁴. Os seus resultados demonstraram que o colágeno tipo I, que é mais espesso, é fortemente birrefringente, com colorações das fibras variando de amarela para vermelha. Por outro lado, o colágeno tipo III, que é normalmente mais fino, apresenta-se fracamente birrefringente, com coloração das fibras de tom esverdeado. O colágeno tipo II, que é mais frequente em cartilagens, não forma fibras e se apresenta com birrefringência de coloração variada²⁴.

Na sequência das pesquisas, Junqueira, Montes e Sanchez²⁵ demonstraram que a cor e intensidade da birrefringência variam em função da espessura do colágeno e não necessariamente pelo tipo do colágeno, sendo que, com a redução gradual da espessura da fibra do colágeno, há uma redução da intensidade da birrefringência de vermelho, para amarelo, para verde. Dayan et al.⁴⁰ demonstraram em seus experimentos que, além da espessura da fibra colágena, o padrão de organização dos feixes de colágeno também determinam a coloração da birrefringência dessas fibras. Apesar de as fibras de colágeno tipo III serem usualmente mais finas que fibras tipo I, não é completamente válido declarar que fibras de coloração verde são tipo III e fibras de tonalidade laranja são tipo I^{23,26}.

Na lâmina própria, o colágeno tecidual apresentou pico de birrefringência com 5

dias, sendo que o tratamento com Insulina foi o que causou maior acúmulo de colágeno com três e cinco dias (Gráfico 6). Houve redução do colágeno total com sete dias devido ao processo de remodelação nos grupos submetidos a tratamento. Na literatura, foi descrito que, durante a remodelação tecidual, a produção de colágeno continua em menor escala. Ao mesmo tempo, alguma destruição do colágeno original ocorre, tornando a formação de um novo colágeno mais espesso e que tende a ser orientado de forma mais adequada no tecido⁴¹. Isso explica a maior birrefringência do colágeno de coloração vermelha ao longo do tempo nos grupos de tratamento (Gráfico 7). Segundo Dayan et al.⁴⁰, a maior coloração vermelha pode indicar feixes de colágeno mais espessos e melhor organizados principalmente no grupo tratado com insulina tópica na MT. Isso corrobora com os achados de Udupa e Chansouria⁴² que verificaram os efeitos da insulina em feridas músculo peritoniais de ratos, e observaram que o uso de insulina subcutânea afetou a produção de colágeno na cicatrização, provocando o aparecimento antecipado de fibras colágenas e que as fibras foram mais compactas, densas e melhor orientadas que as dos animais controles. Além disso, este último estudo mostrou que as feridas cicatrizaram mais rápido no grupo tratado com insulina do que com os animais não tratados. Lima et al.⁹ detectaram que a derme de ratos diabéticos tratados com uso tópico de creme de insulina estava com arranjo de fibras colágenas e células melhor organizadas do que ratos diabéticos não tratados. Eken et al.¹³ utilizaram insulina tópica em MT de cobaias e verificaram maior produção de colágeno e atividade fibroblástica quando comparado com grupo controle em perfurações traumáticas de MTs.

Até o presente momento, não foi identificado outro trabalho que descrevesse o processo de cicatrização de MT em ratos utilizando a coloração PSR sob luz polarizada (Figuras 3 e 4). As descrições do colágeno de MT em ratos existentes na literatura foram realizadas com imuno-histoquímica com marcação para colágeno tipo I, II e III⁴³ e colágeno tipo I, II, III e IV⁴⁴.

A marcação pela alfa actina de músculo liso apresentou maior intensidade com cinco dias em todos os grupos de tratamento quando comparados ao GCon (Gráfico 9). No GIns e no GLat, com sete dias, também houve maior marcação em relação GCon, sem diferença entre os grupos de tratamento. A insulina e o látex, isoladamente, estimularam mais a marcação de alfa-actina de músculo liso, ou seja, estimularam mais

a proliferação de miofibroblastos quando comparados com o GCon ao longo dos sete dias. A associação insulina mais látex não se mostrou superior na proliferação de miofibroblastos em relação à insulina e ao látex isoladamente. Já a alfa actina de músculo liso não apresentou redução com sete dias, mostrando que os miofibroblastos têm participação ativa no processo de remodelação do colágeno tecidual e também da matriz extracelular²⁰. Os miofibroblastos são o tipo celular mais envolvido na deposição da matriz extracelular - tenascina, fibronectina e colágeno tipo I e III - durante o processo de reparo tecidual. Miofibroblastos são também responsáveis pela síntese de enzimas envolvidas na degradação da matriz tecidual²⁰.

A marcação de alfa actina de músculo liso esteve presente no ânulus (Figura 6B). O ânulus fibrocartilaginoso está conectado com o osso timpânico por tecido conjuntivo especializado. Kuijpers, Peters e Tonnaer⁴⁵, em 1999, identificaram a presença de miofibroblastos no ânulus timpânico de ratos, que expressaram proteínas do citoesqueleto, entre elas alfa actina de músculo liso. Henson et al.⁴⁶ sugerem que células de músculo liso da região do ânulus timpânico têm influência na manutenção da tensão da MT em mamíferos e/ou no controle do fluxo sanguíneo da MT.

O anticorpo anti-FvW foi usado previamente por Hellstrom et al.⁴⁷ em estudo sobre a distribuição de vasos sanguíneos da MT de ratos, o que justificou a escolha desse marcador endotelial. Estatisticamente, não houve diferença de marcação de endotélio vascular entre os grupos Controle, Insulina, Látex e Insulina+Látex através do marcador endotelial FvW.

Pusztaszeri et al.⁴⁸ fizeram estudo com os marcadores de células endoteliais CD31, CD34, FvW e Fli-1 em tecidos humanos e verificaram padrões de marcação heterogêneos com variações de positividade de marcadores endoteliais para diferentes órgãos do mesmo indivíduo, e até mesmo em regiões venosas e arteriais do mesmo órgão. Yamamoto et al.²² verificaram variações de níveis de RNAm de FvW em diferentes tecidos de rato e em endotélio de leitos venosos e arteriais de mesmo tecido. Devido à essa limitação de análise imuno-histoquímica de células endoteliais com positividade variada entre os marcadores nos diferentes órgãos, e também em regiões venosas e arteriais no mesmo órgão, seria interessante propor avaliações de outros marcadores endoteliais para verificar o papel da insulina e do látex na cicatrização de

MT em relação à vascularização.

Brey et al.²⁸ fizeram um estudo de comparação de 8 métodos automatizados de análise de imagens conhecidos comparando o grau de concordância de cada um dos métodos com a análise manual de 2 observadores diferentes, sendo a análise manual considerada padrão-ouro. Dezoito imagens coradas com DAB foram utilizadas, as quais apresentavam variação de níveis de proteínas. A acurácia foi calculada com porcentagem de pixels classificados erroneamente usando técnicas automatizadas comparadas com análises manuais de porcentagem de área corada com DAB no tecido. O método de deconvolução de colorações descrito por Ruifrok e Johnston²⁷ foi tão acurado quanto o método manual, considerado como padrão-ouro, com baixo nível de pixels classificados erroneamente. Brey et al.²⁸ realizaram a validação do método de deconvolução de cores para avaliar a porcentagem de área corada com DAB no tecido. Dessa forma, utilizamos o método de deconvolução de cores para análise de imagens assistidas por computador para comparação semiquantitativa dos grupos de tratamento com o grupo controle em relação à porcentagem de área corada com cromógeno DAB, que identificou os anticorpos primários estudados.

A insulina, em perfurações timpânicas traumáticas, acelerou a cicatrização da MT (Gráfico 4), estimulou precocemente a espessura epitelial (Gráfico 1) e fibrosa (Gráfico 2), com maior formação do colágeno tecidual (Gráfico 6), melhor organizado em feixes de fibras colágenas mais espessas (Gráfico 7), contribuindo para o aumento de marcação pela panqueratina (Gráfico 8) e pela alfa actina de músculo liso (Gráfico 9).

A associação insulina mais látex, quando comparada ao GCon, favoreceu a antecipação da cicatrização da MT (Gráfico 4), estimulando precocemente a espessura epitelial (Gráfico 1) e fibrosa (Gráfico 2), aumentando a marcação da panqueratina (Gráfico 8) e da alfa actina de músculo liso (Gráfico 9). No entanto, a associação de insulina mais látex não foi superior ao uso dessas variáveis isoladamente. O que pode ter ocorrido se a membrana de látex não for a matriz ideal de liberação lenta para a insulina. A biomembrana de látex pode ter atuado como suporte vetorial que favoreceu a proliferação epitelial (Gráfico 1 e Gráfico 8), estimulando a espessura fibrosa (Gráfico 2), a proliferação de miofibroblastos (Gráfico 9); e antecipando o fechamento da

perfuração traumática da MT (Gráfico 4). No entanto, a membrana de látex pode não ter potencializado a insulina, que é uma proteína com meia vida curta, e que precisaria de um meio de liberação lenta para que houvesse seu efeito potencializado. O fator de crescimento liberado lentamente criaria o gradiente para o crescimento tecidual na direção da fonte liberadora⁴⁹. As células epiteliais, endoteliais, os miofibroblastos, e os demais constituintes da cicatrização seriam estimulados a se proliferar na direção da fonte liberadora. Tal processo de regeneração ocorreria ao longo de alguns dias, ao contrário da meia vida biológica da insulina, que é curta, em torno de 5 a 10 minutos.

A insulina, causando aumento da espessura epitelial e da panqueratina, poderia ser um fator de estímulo para a formação de colesteatomas secundários. Ao longo dos 7 dias de observação após perfuração timpânica, não foram observadas alterações colesteatomatosas. Trata-se de um curto período de tempo para estabelecer que a insulina não estimula a patologia de colesteatoma adquirido. Pesquisas envolvendo modelos de perfurações crônicas e aplicação de insulina, ou até mesmo, o uso de insulina em modelos experimentais de colesteatomas deverão ser realizados com o propósito de analisar a contribuição ou não da insulina na origem de colesteatomas adquiridos.

Avaliando o mecanismo de cicatrização habitual de MT, observou-se que o processo de cicatrização se iniciou na camada epitelial externa, com posterior regeneração da lâmina própria e da camada mucosa. A insulina e a biomembrana de látex natural aceleraram o processo de cicatrização traumática de MT; anteciparam o fechamento da camada epitelial externa, sem causar sua estimulação demasiada em direção à orelha média; estimularam os processos cicatriciais que ocorrem na lâmina própria de forma madura, segura e eficaz, com o aumento da espessura da camada fibrosa e proliferação de miofibroblastos. No caso da insulina, também houve maior formação de colágeno, e os feixes de fibras colágenas apresentaram-se mais espessos e melhor organizados. A associação insulina mais látex não foi superior ao uso isolado desses tratamentos.

Bibliografia

1. Oliveira JAA, Hyppolito MA, Coutinho Netto J, Mrué F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2003;69:649-55.
2. Steed DL. The role of growth factors in wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):575-86.
3. Ellsworth DL, Hewettemmett D, Li WH. Evolution of base composition in the insulin and insulin-like growth-factor genes. *Molecular Biology and Evolution*. 1994;11(6):875-85.
4. Hanam SR, Singleton CE, Rudek W. The effect of topical insulin on infected cutaneous ulcerations in diabetic and nondiabetic mice. *J Foot Surg*. 1983;22(4):298-301.
5. Straus DS. Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo. *Endocr Rev*. 1984;5(2):356-69.
6. Liu Y, Petreaca M, Yao M, Martins-Green M. Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing. *BMC Cell Biol*. 2009;10(1):1-15.
7. Pelegrinelli FF, Thirone AC, Gasparetti AL, Araujo EP, Velloso LA, Saad MJ. Early steps of insulin action in the skin of intact rats. *J Invest Dermatol*. 2001;117(4):971-6.
8. Apikoglu-Rabus S, Izzettin FV, Turan P, Ercan F. Effect of topical insulin on cutaneous wound healing in rats with or without acute diabetes. *Clin Exp Dermatol*. 2010;35(2):180-5.
9. Lima MH, Caricilli AM, de Abreu LL, Araujo EP, Pelegrinelli FF, Thirone AC, et al. Topical insulin accelerates wound healing in diabetes by enhancing the Akt and Erk pathways: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *PLoS One*. 2012;7(5):1-13.
10. Paul TN. Treatment by local application of insulin of an infected wound in a diabetic. *Lancet*. 1966;288(7463):574-6.
11. Greenway SE, Filler LE, Greenway FL. Topical insulin in wound healing: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *J Wound Care*. 1999;8(10):526-8.
12. Wilson JM, Baines R, Babu ED, Kelley CJ. A role for topical insulin in the management problematic surgical wounds. *Ann R Coll Surg Engl*. 2008;90(2):160.
13. Eken M, Ates G, Sanli A, Evren C, Bozkurt S. The effect of topical insulin application on the healing of acute tympanic membrane perforations: a histopathologic study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2007;264(9):999-1002.
14. Golz A, Goldenberg D, Netzer A, Fradis M, Westerman ST, Westerman LM, et al. Paper patching for chronic tympanic membrane perforations. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;128(4):565-70.
15. Kim J, Kim CH, Park CH, Seo JN, Kweon H, Kang SW, et al. Comparison of methods for the repair of acute tympanic membrane perforations: Silk patch vs. paper patch. *Wound Repair Regen*. 2010;18(1):132-8.
16. Mrué F. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina : aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo

- experimental em cães [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2000.
17. Frade MAC, Valverde RV, de Assis RVC, Coutinho-Netto J, Foss NT. Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. *International Journal of Dermatology*. 2001;40(3):238-40.
 18. Almeida Jr. HLd. Citoqueratinas. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2004;79:135-45.
 19. Anandacoomaraswamy KS, Dutton N, Rajan GP, Eikelboom RH, Atlas MD, Robertson T. Utilization of fresh human tympanic membranes for structural analysis and cytokeratin immunocytochemistry implementing resin techniques. *Acta Otolaryngol*. 2006;126(2):149-53.
 20. Lorena D, Uchio K, Costa AM, Desmouliere A. Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound Repair Regen*. 2002;10(2):86-92.
 21. Warhol MJ, Sweet JM. The ultrastructural localization of von Willebrand factor in endothelial cells. *Am J Pathol*. 1984;117(2):310-5.
 22. Yamamoto K, de Waard V, Fearn C, Loskutoff DJ. Tissue distribution and regulation of murine von Willebrand factor gene expression in vivo. *Blood*. 1998;92(8):2791-801.
 23. Rich L, Whittaker P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J morphol Sci*. 2005;22(2):97-104.
 24. Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*. 1978;41(3):267-74.
 25. Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry*. 1982;74(1):153-6.
 26. Munoz-Pinto D, Whittaker P, Hahn MS. Lamina propria cellularity and collagen composition: an integrated assessment of structure in humans. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2009;118(4):299-306.
 27. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001;23(4):291-9.
 28. Brey EM, Lalani Z, Johnston C, Wong M, McIntire LV, Duke PJ, et al. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. *J Histochem Cytochem*. 2003;51(5):575-84.
 29. Schall R. Estimation in generalized linear-models with random effects. *Biometrika*. 1991;78(4):719-27.
 30. Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations - a 2-dimensional histological study in guinea-pigs. *Acta Oto-Laryngologica*. 1990;109(5-6):406-15.
 31. Amoils CP, Jackler RK, Lustig LR. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth-factor. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 1992;107(5):669-83.
 32. Koba R. Epidermal-cell migration and healing of the tympanic membrane - an immunohistochemical study of cell-proliferation using bromodeoxyuridine labeling. *Annals of Otology Rhinology and Laryngology*. 1995;104(3):218-25.

-
33. Spratley J, Hellstrom S, Eriksson PO, Pais-Clemente M. Early structural tympanic membrane reactions to myringotomy: A study in an acute otitis media model. *Acta Oto-Laryngologica*. 2002;122(5):479-87.
 34. Santa Maria PL, Redmond SL, Atlas MD, Ghassemifar R. Histology of the healing tympanic membrane following perforation in rats. *Laryngoscope*. 2010;120(10):2061-70.
 35. Somers TH, Houben V, Goovaerts G, Govaerts PJ, Offeciers FE. Histology of the perforated tympanic membrane and its muco-epithelial junction. *Clinical Otolaryngology*. 1997;22(2):162-6.
 36. Guneri EA, Tekin S, Yilmaz O, Ozkara E, Erdag TK, Ikiz AO, et al. The effects of hyaluronic acid, epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otology & Neurotology*. 2003;24(3):371-6.
 37. Rezvani O, Shabbak E, Aslani A, Bidar R, Jafari M, Safarnezhad S. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Determine the Effects of Topical Insulin on Wound Healing. *Ostomy Wound Management*. 2009;55(8):22-8.
 38. Frade MAC, Salathiel AM, Mazzucato EL, Coutinho-Netto J, Foss NT. A natural biomembrane as a new proposal for the treatment of pressure ulcers. *Medicina Cutanea Ibero-Latino Americana*. 2006;34(3):133-8.
 39. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11(4):447-55.
 40. Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M. Are the polarization colors of picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers. *Histochemistry*. 1989;93(1):27-9.
 41. Cohen JL, Jorizzo JL, Kircik LH. Use of a topical emulsion for wound healing. *J Support Oncol*. 2007;5(10 Suppl 5):1-9.
 42. Udupa KN, Chansouria JP. Role of protamine zinc insulin in accelerating wound healing in rat. *British Journal of Surgery*. 1971;58(9):673-5.
 43. Stenfeldt K, Johansson C, Hellstrom S. The collagen structure of the tympanic membrane - Collagen types I, II, and III in the healthy tympanic membrane, during healing of a perforation, and during infection. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*. 2006;132(3):293-8.
 44. Knutsson J, Bagger-Sjoberg D, von Unge M. Distribution of different collagen types in the rat's tympanic membrane and its suspending structures. *Otology & Neurotology*. 2007;28(4):486-91.
 45. Kuipers W, Peters TA, Tonnaer E. Nature of the tympanic membrane insertion into the tympanic bone of the rat. *Hearing Research*. 1999;128(1-2):80-8.
 46. Henson MM, Madden VJ, Rask-Andersen H, Henson OW. Smooth muscle in the annulus fibrosus of the tympanic membrane in bats, rodents, insectivores, and humans. *Hearing Research*. 2005;200(1-2):29-37.
 47. Hellstrom S, Spratley T, Eriksson PO, Pais-Clemente M. Tympanic membrane vessel revisited: A study in an animal model. *Otology & Neurotology*. 2003;24(3):494-9.
 48. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal

- human tissues. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2006;54(4):385-95.
49. Ferre-Souza V. Liberação controlada do fator de crescimento angiogênico extraído do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*, encapsulado em microesferas de ácido hialurônico para utilização na terapia angiogênica e engenharia tecidual [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2007.

Legenda de Figuras e Gráficos

- Figura 1-** (A) Imagem de corte histológico de MT do grupo Controle após três dias de perfuração traumática corado em HE. (CAE): Conduto auditivo externo; (m): cabo do martelo. (B) região da figura 1B. (C) região da figura 1C. Magnificação de 20x. (B) Imagem de corte histológico de MT do grupo Controle após três dias de perfuração traumática corado em HE. (CAE) Conduto auditivo externo; (m) cabo do martelo. (ep) camada epitelial. Magnificação de 200x. (C) Imagem de corte histológico de MT do grupo Controle após 3 dias de perfuração traumática corado em HE. (CAE): Conduto auditivo externo; (ep) camada epitelial; (lp) lâmina própria; (anulus) ânulus timpânico. Magnificação de 200x.
- Figura 2-** (A) Imagem de corte histológico de MT do grupo Controle após 5 dias de perfuração traumática corado em HE. (CAE): Conduto auditivo externo; (m): cabo do martelo; (B) região da figura 2B. Magnificação de 40x. (B) Imagem de corte histológico de MT do grupo Controle após 5 dias de perfuração traumática corado em HE. (CAE) Conduto auditivo externo; (ep) camada epitelial; (Lp) lâmina própria; (mucosa): camada mucosa. Magnificação de 200x.
- Figura 3-** (A) Imagem de corte histológico de MT após 5 dias de perfuração traumática com coloração *PicroSirius Red* (PSR) do grupo Insulina, sem luz polarizada. (CAE) Conduto auditivo externo; (m) cabo do martelo. Magnificação 20x. (B) Imagem de corte histológico de MT após 5 dias de perfuração traumática com coloração *PicroSirius Red* (PSR) do grupo Insulina, sob luz polarizada. (CAE) Conduto auditivo externo; (m) cabo do martelo. Magnificação 20x.
- Figura 4-** (A) Imagem de corte histológico de MT com coloração *PicroSirius Red* do grupo Insulina após 5 dias de perfuração, sem luz polarizada.(CAE) Conduto auditivo externo; (m): cabo do martelo; (B) região figura 4B; (C) região figura 4C; (D) região figura 4D. Magnificação de 100x. (B) Imagem de corte histológico de MT com coloração *PicroSirius Red* do grupo Insulina após 5 dias de perfuração sob luz polarizada, identificando a birrefringência do colágeno. (CAE) conduto auditivo externo. Magnificação 400x. (C) Imagem de corte histológico de MT com coloração *PicroSirius Red* do grupo Insulina após 5 dias de perfuração sob luz polarizada, identificando a birrefringência do colágeno.(CAE) conduto auditivo externo. Magnificação 400x. (D) Imagem de corte histológico de MT com coloração *PicroSirius Red* do grupo Insulina após 5 dias de perfuração sob luz polarizada, identificando a birrefringência do colágeno.(CAE) conduto auditivo externo. Magnificação 400x. (E) Imagem de corte histológico de MT com coloração *PicroSirius Red* do grupo Insulina após 7 dias de perfuração, sem luz polarizada.(CAE):

Conduto auditivo externo; (m): cabo do martelo; (F) região figura 4F. Magnificação de 200x. (F) Imagem de corte histológico de MT com coloração *PicroSirius Red* do grupo Insulina após 7 dias de perfuração, sob luz polarizada.(CAE): Conduto auditivo externo; (m): cabo do martelo. Magnificação de 400x. (G) Imagem de corte histológico de MT com coloração *PicroSirius Red* do grupo Insulina após 7 dias de perfuração, sem luz polarizada.(anulus) ânulus timpânico. Magnificação de 400x. (H) Imagem de corte histológico de MT com coloração *PicroSirius Red* do grupo Insulina após 7 dias de perfuração, sob luz polarizada.(anulus) ânulus timpânico. Magnificação de 400x.

Figura 5- Imagem de Corte histológico com marcação Imuno-histoquímica para anticorpo anti-panqueratina e contra-coloração com Hematoxilina do grupo Insulina+Látex, 5 dias.(CAE): Conduto auditivo externo; (m): cabo do martelo; (ep): camada epitelial; (mucosa): camada mucosa.Magnificação de 200x.

Figura 6- (A) Corte histológico com marcação Imuno-histoquímica para anticorpo anti-alfa-actina de músculo liso e contra-coloração com Hematoxilina, do grupo Insulina+Látex, 5 dias após perfuração, mostrando miofibroblastos na lâmina própria da MT. (CAE): Conduto auditivo externo; (Lp) lâmina própria. Magnificação 400x. (B) Corte histológico com marcação Imuno-histoquímica para anticorpo anti-alfa-actina de músculo liso e contra-coloração com Hematoxilina do grupo Insulina 5 dias após perfuração mostrando miofibroblastos na junção da MT com osso timpânico.(CAE): Conduto auditivo externo;(anulus): ânulus timpânico. Magnificação 400x.

Figura 7- Imagem de corte histológico com marcação Imuno-histoquímica para anticorpo anti-fator de von Willebrand (FvW) e contra-coloração com Hematoxilina, do grupo Insulina, 3 dias após perfuração mostrando vasos sanguíneos identificados por FvW.(CAE) Conduto auditivo externo; (m) cabo do martelo. Magnificação de 400x.

-
- Gráfico 1-** Espessura epitelial (μm) ao longo do tempo (Dias) (# indica $p \leq 0,01$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).
- Gráfico 2-** Espessura fibrosa (μm) ao longo do tempo (Dias) (# indica $p \leq 0,01$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).
- Gráfico 3-** Espessura mucosa (μm) ao longo do tempo (Dias) (# indica $p \leq 0,01$ e {} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).
- Gráfico 4-** Perfurações timpânicas (μm) ao longo do tempo (Dias) (# indica $p \leq 0,01$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).
- Gráfico 5-** Áreas das MTs (μm^2) ao longo do tempo (Dias).
- Gráfico 6-** Porcentagem de área de birrefringência do colágeno (%) ao longo do tempo (Dias). Porcentagem de área de birrefringência do colágeno correspondeu à razão da área ocupada pelo colágeno total e a área total da MT (# indica $p \leq 0,01$ e {} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).
- Gráfico 7-** Porcentagem da birrefringência de tonalidade Red (vermelho) do Colágeno tecidual (%) ao longo do tempo (Dias). A porcentagem de birrefringência de cada tonalidade correspondeu à divisão do número de pixels de cada área correspondente a cada variação de cores pelo total de pixels de colágeno tecidual avaliado em cada MT ({} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).
- Gráfico 8-** Porcentagem de área corada com cromógeno DAB identificando o anticorpo primário anti-panqueratina (%) ao longo do tempo (Dias). A porcentagem de área corada com DAB foi calculada dividindo a área da MT corada com DAB dividida pela área total da MT (# indica $p \leq 0,01$ e {} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).
- Gráfico 9-** Porcentagem de área corada com cromógeno DAB identificando o anticorpo primário anti-alfa-actina de músculo liso (%) ao longo do tempo (Dias). A porcentagem de área corada com DAB foi calculada dividindo a área da MT corada com DAB dividida pela área total da MT ({} indica $0,01 < p \leq 0,05$ em relação ao Grupo Controle em cada tempo).
- Gráfico 10-** Porcentagem de área corada com cromógeno DAB identificando o anticorpo primário anti-fator de von Willebrand (%) ao longo do tempo (Dias). A porcentagem de área corada com DAB foi calculada dividindo a área da MT corada com DAB dividida pela área total da MT.

Figura 1

Figura 2

Figura 3

Figura 4

Figura 5

Figura 6

Figura 7

Gráfico 1

Gráfico 2

Gráfico 3

Gráfico 4

Gráfico 5

Gráfico 6

Gráfico 7

Gráfico 8

Gráfico 9

Gráfico 10