

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

**“CICATRIZAÇÃO DA MEMBRANA TIMPÂNICA NA
TIMPANOCENTESE COM LASER DE ARGÔNIO
COMPARADO A TÉCNICA COM MICROLANCETA:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS”**

Lucio Almeida Castagno

Orientador: Prof. Dr. Luiz Lavinsky

Tese de Doutorado

Área de Concentração:

Otorrinolaringologia

Porto Alegre, dezembro de 2003

Para Octavia

Chaque progrès donne un nouvel espoir,
suspendu à la solution d'une nouvelle
difficulté. Le dossier n'est jamais clos.
Lévi-Strauss (Claude)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha esposa e colega Maria Lucia, e à minha filha Octavia, o estímulo e apoio necessários para sempre perseverar.

Agradeço a meu pai, professor e colega Sydney , e à minha mãe Claire, os sólidos princípios éticos e de valorização do estudo como instrumento para a construção de uma vida melhor para todos.

Agradeço ao professor doutor Luiz Lavinsky, a orientação, o apoio e o acompanhamento durante o período de desenvolvimento desta tese.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| RESUMO | 10 |
| ABSTRACTS | 12 |
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1. Otite média | 14 |
| 1.2. Lasers | 19 |
| 1.3. Timpanocenteses por laser na otite média | 25 |
| 1.4. Anátomo-histologia da membrana timpânica | 27 |
| 1.5. Estudos experimentais em ratos | 32 |
| 1.6. Objetivo | 35 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 2.1. Estudo experimental | 36 |
| 2.2. Técnica de timpanocentese por microestilete no rato | 38 |
| 2.3. Técnica de timpanocentese por laser de argônio no rato | 40 |
| 2.4. Cálculo da amostra e avaliação estatística | 40 |
| 3. RESULTADOS | 42 |
| 4. DISCUSSÃO | 49 |

| | Página |
|--|--------|
| 5. CONCLUSÃO | 57 |
| Anexo I | 58 |
| Dosagem do anestésico | |
| Anexo II | 59 |
| Tempo de impacto do laser de argônio na timpanocentese | |
| Referências | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS

OM = Otite média

OMA = Otite média aguda

OMC = Otite média crônica

OMCS = Otite média crônica supurativa

OMS = Otite média secretora

OMAR = Otite média aguda recorrente

PT = *pars tensa*

PF = *pars flaccida*

DP = densidade de potência (laser)

ML-OD = Timpanocentese por microlanceta no ouvido direito

ML-OE = Timpanocentese por laser de argônio no ouvido esquerdo

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Descrição | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Patogênese da otite média | 15 |
| 2 | Absorção dos lasers | 21 |
| 3 | Anatomia do tímpano no rato comparado ao humano | 31 |
| 4 | Protocolo do estudo | 37 |
| 5 | Posicionamento dos ratos e instrumentação | 39 |
| 6 | Videofotografias de formas de timpanocenteses | 45 |
| 7 | Videofotografias de timpanocenteses no 3º dia | 48 |
| 8 | Videofotografias de timpanocenteses no 10º dia | 48 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | Descrição | Página |
|--------|---|--------|
| I | Efeitos dos lasers sobre os tecidos | 25 |
| II | Duração da timpanocentese em ratos | 26 |
| III | Características de alguns lasers | 27 |
| IV | Relação entre a área da pars flaccida/pars tensa | 29 |
| V | Cálculo do tamanho da amostra | 41 |
| VI | Resultados da timpanocentese incisional por microestilete | 43 |
| VII | Resultados da timpanocentese por laser de argônio | 44 |

RESUMO

Introdução: Otite média secretora (OMS) e otite média aguda recorrente (OMAR) podem necessitar tratamento cirúrgico para adequada ventilação da orelha média. A abertura clássica do tímpano (timpanocentese) requer incisão por microlanceta sob controle de microscópio cirúrgico e mantém-se patente por alguns dias. Estudos recentes sugerem que a timpanocentese feita por diferentes lasers pode permanecer permeável por maior tempo, o que possibilitaria a normalização da otite média.

Objetivo: Comparar a técnica de timpanocentese incisional com microlanceta à timpanocentese feita com laser de argônio.

Material e métodos: Estudo experimental com 34 ratos linhagem Wistar, albinos, machos adultos pesando cerca de 300g, anestesiados com cetamina 27 mg/kg e xilazina 2,7 mg/kg, e submetidos à timpanocentese incisional com microlanceta no ouvido direito (ML-OD), e à timpanocentese mediada por laser de argônio no ouvido esquerdo (LA-OE). As timpanocentes foram avaliadas periodicamente até a cicatrização.

Resultados: Não houve diferença significativa no tempo de cicatrização das timpanocenteses feitas com laser de argônio ou microlanceta. Todas timpanocenteses cicatrizaram dentro de 10 dias.

Conclusão: A timpanocentese com laser de argônio apresentou patência e cicatrização semelhantes à técnica clássica com microlanceta realizada em ratos Wistar sem enfermidades de orelha média.

Palavras chave: Otite média secretora; otite média aguda recorrente; timpanocentese; laser de argônio; ratos Wistar.

ABSTRACTS

Introduction: Secretory otitis media (SOM) and recurrent acute otitis media (rAOM) may require surgical treatment to properly ventilate the middle ear. Incisional myringotomy is usually done under microscopy with a micro-knife, but remains patent just a few days. Recent researches indicate that laser assisted myringotomies remain open much longer, allowing middle ear ventilation and healing.

Objective: Compare the healing of argon laser assisted myringotomy to incisional myringotomy.

Material and methods: Experimental study with 34 white Wistar rats, male, adults, without middle ear disease, were submitted to anesthesia with ketamine 27 mg/kg and xylazine 2,7 mg/kg. Incisional myringotomy was done on the right ear, while laser myringotomy was done on the left. Myringotomies were evaluated periodically until healing.

Results: Time of healing were equivalent. All myringotomies were healed within 10 days.

Conclusion: Argon laser assisted myringotomy healed as incisional myringotomy on Wistar rats without middle ear diseases.

Key words: Secretory otitis media; recurrent acute otitis media; myringotomy; argon laser; Wistar rats.

1. INTRODUÇÃO

A membrana timpânica separa a orelha externa da média. Ao receber o estímulo sonoro, vibra e movimentada a cadeia ossicular que amplifica e propaga o som até as células sensoriais da cóclea. Essa estrutura é semelhante em todos os mamíferos, embora ocorram diferenças de tamanho e forma da cadeia tímpano-ossicular. O revestimento mucoso da orelha média pode inflamar, causando as otites médias, que são tratadas clinicamente com antibióticos. Contudo, algumas formas de otites médias podem necessitar timpanocentese, um procedimento cirúrgico simples em que é feita uma pequena abertura na membrana timpânica, permitindo a ventilação da orelha média. A timpanocentese pode ser realizada com microlanceta, microeletrocautério, e mais recentemente com lasers.

O impacto sócio-econômico da otite média é muito significativo, sendo responsável por 1/3 das consultas pediátricas por enfermidades, e por 25% de todas as prescrições de antibióticos orais nos EUA. Timpanocentese com inserção de tubo de ventilação é um dos procedimentos cirúrgicos mais freqüentes em crianças a requerer anestesia geral. Embora seja procedimento simples, tem custos hospitalares e complicações podem ocorrer. Por outro lado, a otite média não tratada, ou inadequadamente tratada, leva a seqüelas e possíveis limitações funcionais importantes ¹.

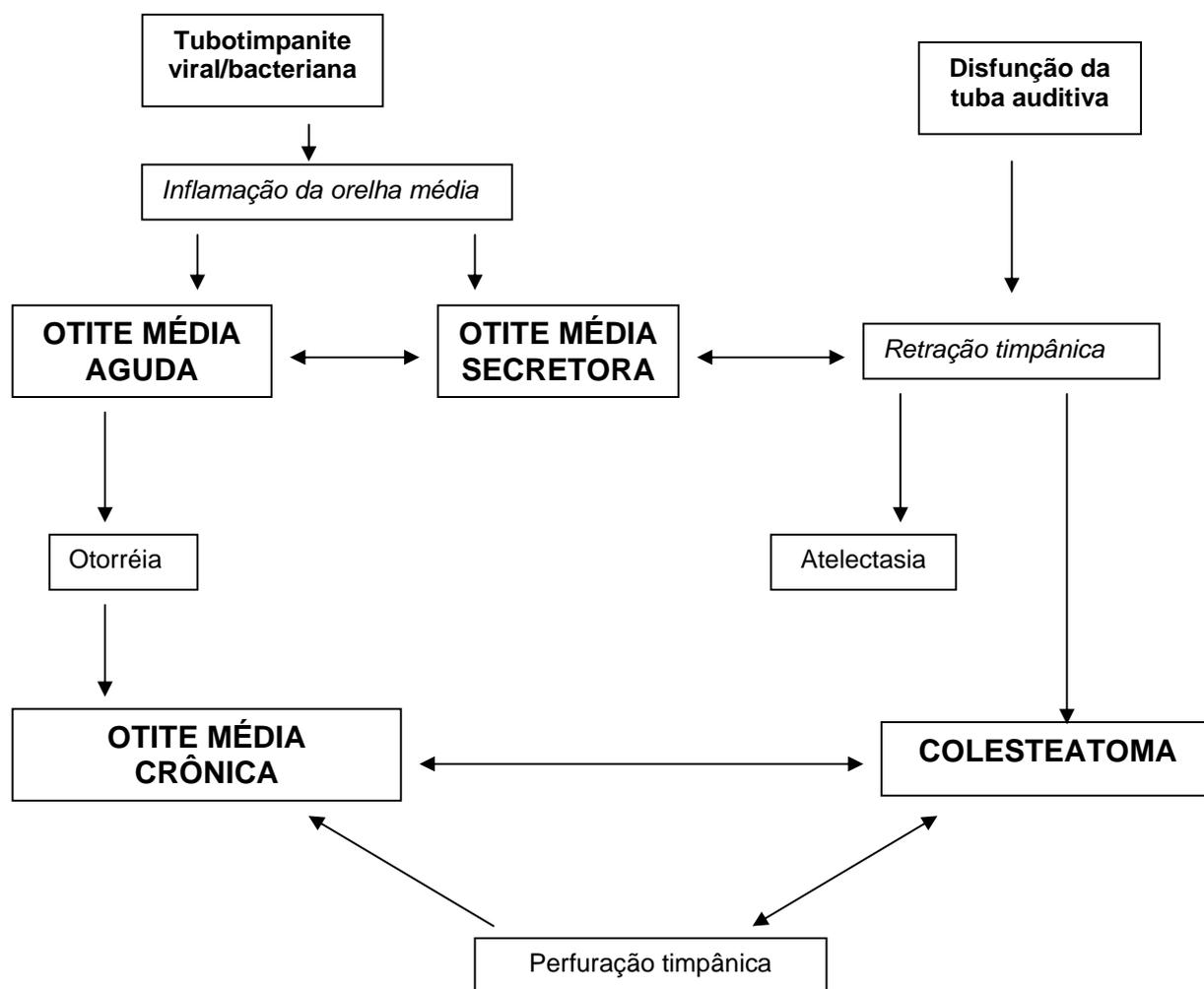
A timpanocentese mediada por laser, introduzida nos últimos anos, tem a expectativa de poder substituir antibióticos e a eventual necessidade de cirurgia com anestesia geral em crianças com otite média, por um procedimento simples,

rápido e realizável com anestesia tópica. Essas considerações motivaram o presente trabalho, em que é avaliada a utilização do laser de argônio em timpanocenteses.

1.1. Otite média

Otite média (OM) é enfermidade ainda mais freqüente em nosso meio, principalmente em crianças de baixo nível sócio-econômico e nos meses de inverno ². Existem diversas apresentações clínicas de otite média decorrentes do processo dinâmico de inflamação e resolução na orelha média (figura 1). Como qualquer inflamação, as alterações observadas na OM tendem a ocorrer como sucessão de eventos ("continuum"), progredindo através de estágios agudos e subagudos para uma fase crônica, na qual dano tecidual irreversível ocorre ^{3 4}. A causa da OM é multifatorial, sendo que disfunção da tuba auditiva, infecção viral ou bacteriana da orelha média, e inflamação nasal secundária à rinite alérgica ou infecções respiratórias altas, são fatores contribuintes ^{5 6}. Fatores ambientais, e possivelmente predisposição genética, favorecem ao desenvolvimento da otite média ^{7 8 9}.

Figura 1: Patogênese da otite média.



Na otite média aguda (OMA) há otalgia, hipoacusia, febre e hiperemia da membrana do tímpano. Nessa usualmente há uma infecção bacteriana que afeta o revestimento mucoso da orelha média e mastóide. A maioria das crianças apresenta, inicialmente, uma história de infecção respiratória superior viral recente, a qual, além de afetar a mucosa das vias aéreas, também acomete a tuba auditiva e o orelha média. A seguir, pode ocorrer infecção bacteriana, a

partir de microrganismos normalmente existentes no rinofaringe, e em 1/3 dos pacientes mais de um germe pode estar envolvido. Diversas séries com timpanocentese e cultura de secreção da orelha média realizadas desde 1950 têm identificado *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* não-tipável em 25-40% das crianças com otite média aguda, e também um número significativo de casos por *Moraxella catarrhalis*. Essas são observações consistentes feitas por vários investigadores em diferentes centros geográficos. Por outro lado, estudos ao longo da última década têm estabelecido que vírus são importantes agentes etiológicos na otite média, sejam isoladamente (20% dos casos) ou associados a bactérias. Diversas espécies de vírus são relacionadas a OM: rinovírus, vírus respiratório sincicial, adenovírus, influenza A e B, parainfluenza, enterovírus, citomegalovírus, e vírus do herpes simples¹⁰.

Na OMA há, inicialmente, hiperemia da mucosa tubária e da orelha média, seguida por formação de exsudato seroso rico em neutrófilos. A mucosa da orelha média hipertrofia-se e há metaplasia com conversão de epitélio cubóide simples para epitélio muco-secretor, que pode estender-se até as células da mastóide. O ar da orelha média é absorvido e substituído pelo exsudato inflamatório que tensiona a membrana do tímpano (otalgia), sendo que em 30% dos casos pode haver ruptura na *pars tensa*¹¹. Pelo menos um episódio de OMA pode acometer 93% de todas as crianças menores de 7 anos, sendo que em 74% pode haver mais de três episódios. A média de episódios de OMA é maior no primeiro ano de vida (1.2), com um declínio para 0.4 no sétimo ano; a duração média de efusão é 23 dias (decrecendo de 29.4 dias no primeiro ano para 14.3 dias em crianças com sete anos)¹². Contudo, a falta de resolução pode levar à ocorrência de

perfuração timpânica e, se persistente, à otite média crônica supurativa (OMCS) ou, ainda, à permanência de fluido na orelha média e otite média secretora (OMS).

Diversos nomes são empregados para designar a enfermidade na qual há acúmulo de fluido não purulento no ouvido médio. Nenhum atingiu reconhecimento universal, pois todos podem ser etimologicamente criticados. Otite média serosa é incorreto, pois o fluido não é soro. Otite média secretora presume que o fluido na orelha média seja uma secreção, o que pode não ocorrer. Otite média com efusão não diferencia entre fluido purulento ou não-purulento. Embora autores anglo-saxônicos prefiram este último termo, na literatura latina predomina o uso de otite média secretora. O tempo de permanência do fluido na orelha média, para que a enfermidade seja considerada crônica, é 2 meses¹³. Nesses casos, há substituição do epitélio simples cubóide da orelha média por epitélio cilíndrico pseudoestratificado, células caliciformes e, às vezes, glândulas muco-secretoras. A submucosa é edematosa e inflamada, com vasos sanguíneos dilatados, e com número elevado de macrófagos, plasmócitos e linfócitos. O fluido costuma ser descrito, após timpanocentese com aspiração, como seroso (líquido) ou mucóide (viscoso) segundo a consistência, o que é uma exagerada simplificação, pois existem diversos tipos, de acordo com a composição das secreções das células epiteliais, caliciformes, glândulas muco-secretoras, e exsudatos ou transudatos inflamatórios. A concentração protéica em ambos os tipos é, usualmente, maior que no soro. Ainda existe controvérsia em relação ao papel de agentes bacterianos e virais na fisiopatologia da otite secretora¹⁴.

Otite média secretora (OMS) é particularmente importante, pois à exceção de hipoacusia, pode não apresentar sintomas e passar despercebida, embora seja

uma das enfermidades mais comuns da infância: 80% das crianças menores de 5 anos apresentam ao menos um episódio de OMS, enquanto que 5-10% delas podem necessitar tratamento cirúrgico ¹⁵. Sintomas como sensação de plenitude auricular ou desconforto, freqüentes em adultos, não são habitualmente referidos por crianças. Caracteriza-se pela persistência de fluido atrás de um tímpano íntegro, e tem um pico de incidência entre 3-6 anos, com usual resolução espontânea antes dos 12 anos ¹⁶. OMS ocorre com maior freqüência no outono, inverno e primavera, com uma prevalência estimada de 3-25% entre crianças de 6 meses a 11 anos no Japão ¹⁷, EUA e Escandinávia ¹⁸. Embora a resolução seja a regra, OMS é clinicamente importante, pois acarreta hipoacusia condutiva variável (10 a 50dB), podendo limitar o aprendizado ^{19 20}, e também ser um precursor de otite média crônica supurativa. Na maioria das crianças, a OMS desaparece e a mucosa do ouvido médio retorna ao normal. Contudo, seqüelas como timpanosclerose, retrações timpânicas, atelectasias e granulomas de colesterol podem ocorrer.

Tratamentos clínicos são eficazes na maior parte dos casos, ainda que algumas formas de otite média, eventualmente, necessitem outros procedimentos. Otite média secretora (OMS) e otite média aguda recorrente (OMAR) podem necessitar timpanocentese, pois adequada ventilação na orelha média é fundamental ao tratamento ²¹. Timpanocentese simples com incisão da membrana timpânica por microlanceta sob controle de microscópio cirúrgico é a técnica padrão clássica, apresentando permeabilidade muito transitória pois a perfuração cicatriza em alguns dias, em geral antes da orelha média estar normalizado ²². Armstrong ²³ reintroduziu o uso do tubo de ventilação, um método descrito por

Politzer no fim do século XIX, com o objetivo de ventilar de forma prolongada a orelha média. Acredita-se que em cerca de 4 semanas, com ventilação apropriada, ocorra a normalização da mucosa da orelha média. Entretanto, o uso de material sintético não-biológico do tubo de ventilação na membrana do tímpano pode levar a seqüelas como otorrêia (12-40% dos casos), timpanosclerose progressiva (48%), atrofia timpânica com bolsa de retração (28%), e perfuração timpânica persistente ²⁴.

Timpanocentese por microeletrocautério foi inicialmente descrita por Saito et al ²⁵. O tempo necessário para cicatrização dessa perfuração timpânica é maior (15-18 dias) ²⁶, o que favorece a normalização da orelha média. Uma vez que o tempo de cicatrização de queimaduras por laser na pele são muito similares às causadas por eletrocautério, o uso de laser em timpanocenteses foi introduzido nos últimos 20 anos.

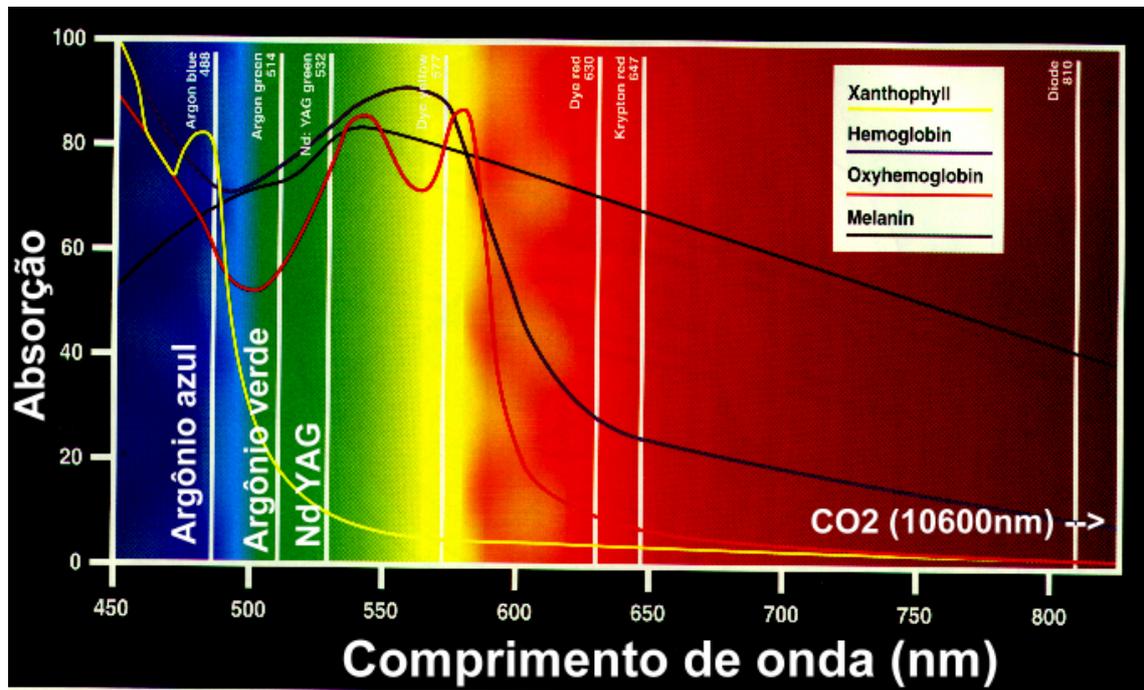
1.2. Lasers

Os diversos tipos de lasers (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) compartilham propriedades semelhantes, e decorrem do trabalho de muitos investigadores, a partir do princípio de teoria quântica, descrita por Albert Einstein no início do século passado. Quando luz, ou qualquer outra forma de radiação eletromagnética, interage com a matéria, pode haver transferência de energia. Até então acreditava-se que a energia era contínua. Einstein propôs que energia luminosa existiria apenas em pequenas unidades, chamadas de *quanta*.

Pela explicação desse "efeito fotoelétrico", e não pela posterior e mais conhecida Teoria da Relatividade, ganhou o prêmio Nobel de Física em 1921.

Nos aparelhos de laser, energia elétrica atua sobre a matéria contida na caixa de ressonância, e cercada por espelhos que amplificam a energia eletromagnética a ser eliminada. Essa matéria, ou meio ativo do laser, pode ser sólida (rubí, YAG, neodímio), líquida (selênio ou fósforo), ou gasosa (hélio, argônio ou criptônio). A energia amplificada é eliminada de forma contínua ou pulsada com comprimentos de ondas específicos para cada meio (figura 2).

Figura 2: Absorção de diferentes laser.



O espectro de *luz visível* compreende os comprimentos de onda entre 0,4 e 0,8 nm; acima de 0,8 nm têm-se as ondas invisíveis a visão humana do *infravermelho* (lasers de CO₂); e abaixo de 0,4 nm tem-se o *ultravioleta* (excimer laser para cirurgia de córnea). O percentual de absorção dos lasers de argônio (azul e verde) e neodímio-YAG são representados para hemoglobina, oxihemoglobina, melanina e pigmento xantofílico (dados da ação de lasers na retina) (Bloom S, Brucker A. Laser surgery of the posterior segment. Filadélfia, Lippincott-Raven Publishers, 1999; 3-10).

O feixe de laser pode produzir *efeitos térmico* (fotocoagulação e fotovaporização), *ionizante* e *fotoquímico*. O *efeito térmico*, obtido com diversos tipos de lasers (argônio, kriptônio, CO₂, etc) surge quando laser é absorvido pelo tecido e produz elevação de temperatura local entre 10-20°C, ocorrendo **fotocoagulação** em consequência à desnaturação das proteínas. A absorção do laser depende do seu comprimento de onda e coloração predominante do tecido. Diversos pigmentos são capazes de absorver laser e têm sido extensamente estudados em relação à retina (figura 2). **Fotovaporização** ocorre quando uma maior densidade de energia laser é absorvida pelo tecido, e produz uma variação de temperatura superior a 100°C (ao atingir a temperatura de ebulição da água). A vaporização tecidual forma um disco interno de necrose e um anel externo de coagulação. Na membrana timpânica essa necrose e coagulação adjacentes à perfuração seriam responsáveis pela cicatrização mais lenta das timpanocenteses por laser. O *efeito ionizante* decorre de irradiação extremamente elevada com curtíssimo tempo de exposição e pequeno ponto de impacto. Nesse caso, a rápida expansão do plasma cria ondas acústicas e de choque que produzem **fotodisrupção**, incisando o tecido independentemente da absorção do laser ou pigmentação. É o caso dos aparelhos de laser que visam cortar tecidos (Neodimio-YAG laser) . O *efeito fotoquímico* ocorre com muito elevada energia de lasers de comprimento de onda curto (ultravioleta). É usado para romper as ligações moleculares, produzindo incisões muito precisas (excimer laser na cirurgia da córnea) ²⁷.

O efeito obtido é função da elevação da temperatura ao nível do local de impacto, que depende da *quantidade de energia* por unidade de superfície, e da *absorção* dos fótons pelo tecido irradiado (essa absorção varia com o tipo de tecido e sua pigmentação). A quantidade de energia depende da superfície de impacto, da duração da exposição e da potência do feixe de laser.

As definições físicas do laser envolvem diversos conceitos ²⁸. Energia, em termos físicos, representa essencialmente a capacidade de trabalho, e sua unidade é chamada de *Joule*. Essa unidade de energia dividida pelo tempo em segundos chama-se *Watts*, assim: 1 Watt = 1 Joule / 1 segundo. A potência ou intensidade do laser é medida em Watts ou Joules/segundo. Contudo, a densidade de potência (DP) é representada por Watts dividido pela área em centímetros quadrados; assim: $DP = \text{Watts} / \text{cm}^2$. A densidade de potência (DP= potência / superfície) de energia do laser varia de acordo com o efeito desejado: coagulação entre 100-500 Watts/cm²; vaporização, acima de 1000 Watts/cm² ; e corte rápido se maior de 5000 Watts/cm². O efeito tecidual da aplicação do laser apresenta diversas fases (tabela I):

Fase 1: Aquecimento dos tecidos de 43°C a 50°C permite a alteração das hélices de colágeno, de forma que bordas opostas de tecido podem se fundir. A partir de 45°C as enzimas degradam-se. Um pequeno branqueamento do tecido sinaliza o início da próxima fase.

Fase 2: Elevando-se a temperatura acima de 50°C, começa a desnaturação de proteínas; e acima de 60°C há morte celular. A coagulação está completa quando

se observa coloração uniforme branco-acinzentada no tecido. Essa fase finaliza com o início do enrugamento tecidual.

Fase 3: O tecido progressivamente encolhe e resseca. A temperatura de 90-100°C degrada as estruturas de colágeno e elastina. É necessário cuidado para não lesar ou perfurar estruturas mais profundas. Essa fase é útil no tratamento seletivo de tumores.

Fase 4: A elevação acima de 100°C leva à ebulição da água tecidual. Com temperatura superior a 125°C há oxidação completa de proteínas e lipídeos, restando apenas partículas de carbono. O tecido torna-se preto, levando a temperatura a elevar-se ainda mais rápido (pois o preto absorve todos os comprimentos de onda visíveis).

Fase 5: Carbonização é o sinal de que a última fase (ablação tecidual) está começando. O cirurgião pode observar o tecido sendo vaporizado.

Diversas especialidades médicas interessaram-se pelo uso de lasers a partir de 1968. Entre nós, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, o professor Ivo Kuhl começou a aplicar o laser de CO₂ no tratamento de enfermidades de laringe em 1974²⁹. Em 1975, o surgimento de fibras ópticas simplificou a transmissão do laser, tornando o equipamento mais eficiente e confiável. Em otologia, Escudero et al³⁰, em 1979, foram os primeiros a descrever o uso de lasers em sete casos de timpanoplastias. Em 1980, Perkins³¹ utilizou lasers em 11 pacientes com otosclerose, seguido por McGee³² em 1983.

TABELA I - Efeitos do laser sobre os tecidos.

| Fase | Temperatura | Efeito tecidual | Observação visual |
|-------------|--------------------|------------------------|--------------------------|
| 1 | 43-50°C | Aumento de temperatura | Sem alteração |
| 2 | 50-60°C | Desnaturação proteica | Embranquecimento |
| 3 | 90-100°C | Água evapora | Enrugamento |
| 4 | 100-150°C | Carbonização | Carbonização |
| 5 | >175°C | Tudo evapora | Fumaça |

1.3. Timpanocenteses por laser na otite média

Técnicas de timpanocenteses mediadas por laser de CO₂^{33 34 35 36 37 38} e Neodímio-YAG laser³⁹ foram descritas, e são realizadas com sistemas acoplados ao microscópio cirúrgico, ou por oto-probe associado ao otoscópio clínico. São procedimentos ambulatoriais, rápidos, com anestesia local e mínima dor, popularizados nos Estados Unidos a partir de 1998 com a introdução de um sistema de CO₂-laser acoplado à video-otoscopia (OtoLAM, ESC Medical Systems, Needham, MA), originalmente desenvolvido na Universidade de Tel-Aviv⁴⁰. Tem a vantagem adicional de poder prescindir a inserção do tubo de ventilação e suas possíveis seqüelas pelo menos em parte dos pacientes.

Soderberg et al ⁴¹ estudaram o tempo de cicatrização e alterações timpânicas em ratos submetidos a vários métodos de timpanocentese (Tabela II).

TABELA II - Duração da timpanocentese em ratos

| Método de timpanocentese | Tempo de cicatrização da perfuração |
|---------------------------------|--|
| Microlanceta | 9-11 dias |
| Microeletrocautério | 12-18 dias |
| CO2-laser | 18-21 dias |

Há muitos anos são utilizados, em oftalmologia, aparelhos de laser de argônio. Contudo, a julgar pela literatura médica, é muito limitada sua aplicação em timpanocenteses ^{42 43 44 45}. O laser de argônio compartilha de características similares - em geral intermediárias - ao laser de CO2 e Neodímio-YAG laser (tabela III). Acreditamos ser possível realizar timpanocenteses semelhantes também com laser de argônio.

TABELA III - Características de alguns lasers

| Tipo de laser | Cor | Comprimento de onda | Penetração tecidual | Absorção (água) |
|----------------------|---------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|
| Argônio | Azul/verde | 488nm | Moderada | Mínima |
| Nd YAG | Verde | 532 nm | Profunda | Mínima |
| CO2 | Infravermelho | 10600 nm | Mínima | Máxima |

1.4. Anátomo-histologia da membrana timpânica

A membrana timpânica humana tem aspecto disciforme cônico. O diâmetro maior tem 9.0 a 10.2mm, e o diâmetro menor de 8.5 a 9.0mm. A *pars tensa* ocupa a maior parte desse cone, enquanto a *pars flaccida* é identificada como um pequeno triângulo invertido sobre o seguimento do ligamento anular e processo curto do martelo. O ligamento anular envolve a *pars tensa*, mas não ocorre na *pars flaccida*, que é apenas uma continuação do conduto auditivo externo e da mucosa da caixa timpânica.

A espessura da *pars flaccida* humana situa-se entre 0.03 a 0.23mm, enquanto a *pars tensa* mede de 0.03 a 0.09mm. A epiderme da *pars flaccida* é composta de cinco a dez camadas de células epiteliais escamosas: camada com células basais cubóides; camada Malpighiana; camada de células granulares; e

camada queratinizada. A lâmina própria é composta por fibras colágenas e elásticas abundantes e irregularmente dispostas. Grande número de capilares e fibras nervosas são também encontrados. A camada mucosa é formada principalmente de células escamosas simples, embora algumas áreas apresentem células cilíndricas pseudoestratificadas ou cubóides ciliadas ou não.

A epiderme da *pars tensa* é composta de três a cinco camadas de células escamosas e é menos espessa que a *pars flácida*. A lâmina própria da *pars tensa* é composta por uma camada de tecido conjuntivo subepitelial, que é uma continuação da lâmina própria da *pars flaccida* (também com abundância de capilares e fibras nervosas); camada de fibras colágenas radiais (externa); camada de fibras colágenas circulares (interna); camada de tecido conjuntivo submucoso; e uma camada mucosa de células escamosas simples.

As características ultra-estruturais da membrana timpânica humana são essencialmente as mesmas dos animais de laboratório ^{46 47}. Em todos, a *pars flaccida* é sempre mais espessa que a *pars tensa*, ao contrário do conceito popular de que a *flaccida* seria mais delgada. Esses achados também confirmam a descrição original de Shrapnell ⁴⁸ de ser a *pars flaccida* (membrana de Shrapnell) mais elástica que a *pars tensa*.

Entre os animais de laboratório, a estrutura da orelha média tem sido extensamente estudada ao longo das últimas três décadas na chinchila, particularmente por apresentar dimensões, formas e volumes muito semelhantes às humanas ⁴⁹. O diâmetro médio da membrana timpânica na chinchila situa-se entre 8.32 a 8.53 mm, correspondendo a cerca de 90% do tímpano humano. Por

outro lado, o volume da orelha média no chinchila é de 1.53 ml, enquanto que no homem situa-se entre 2-3 ml (tabela IV). Mamíferos maiores também podem ser utilizados na experimentação otológica. Ovelhas apresentam diâmetro timpânico médio de 5.3 e 8.2 mm, e cerca de 81% da superfície equivalente ao tímpano humano^{50 51 52}.

TABELA IV - Relação entre a área da *pars flaccida/pars tensa* e volume da orelha média nas diversas espécies⁵³

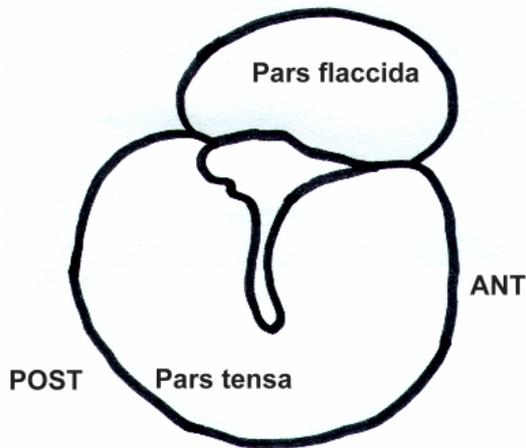
| Espécie | Relação área pf/pt | Volume o. média |
|-------------------|---------------------------|------------------------|
| Camundongo | 0.45 - 0.52 | 0.006 ml |
| Rato | 0.25 - 0.29 | 0.006 ml |
| Gato | 0.02 | 0.675 ml |
| Chinchila | 0.02 | 1.53 ml |
| Humano | 0.03 - 0.06 | 2 - 3 ml |

Estudos sobre a orelha média do rato são ainda limitados, particularmente em relação a linhagem Wistar. Assim sendo, previamente a investigação com timpanocenteses em ratos vivos, dois ratos Wistar adultos sacrificados e formalizados foram submetidos pelo autor à dissecação do ouvido (sob microscopia com aproximação de 10x e 16x). O diâmetro timpânico (ântero-posterior) encontrado, variou de 2,2 a 2,4 mm. Há uma grande área de *pars flaccida*,

correspondendo a quase $1/3$ da *pars tensa* . A *pars flaccida* no rato vivo distende-se significativamente com a respiração, formando uma grande bolha, que chega a ocupar quase toda a extensão da *pars tensa* na expiração mais intensa ou quando guincha.

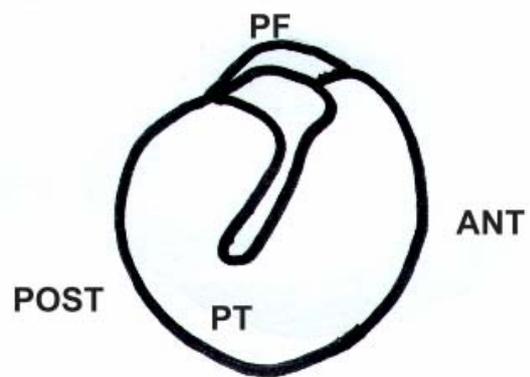
A estrutura do martelo, bigorna e estribo no rato é muito semelhante a humana. Contudo, a forma e orientação do martelo e, principalmente, a extensão da *pars flaccida* são bem distintas (figura 3).

Figura 3: Anatomia do tímpano no rato Wistar comparado ao humano



RATO

- Pars flaccida equivale a 25-29% da pars tensa
- Apófise curta do martelo aponta para parede posterior
- Martelo levemente curvado em direção a parede anterior
- Diâmetro antero-posterior 2.2 a 2.4 mm



HOMEM

- Pars flaccida equivale a 3-6% da pars tensa
- Apófise curta aponta para parede anterior
- Martelo inclinado em direção a parede posterior
- Diâmetro antero-posterior 9.0 a 10.2 mm



1.5. Estudos experimentais em ratos

A orelha média do rato tem todas as estruturas encontradas na do homem: os ossículos são pequenos (cerca de 1/4 das dimensões) e quase totalmente escondidos no epítimpano; a mastóide é substituída por uma célula aérea única. Ossículos, nervo facial, e músculos estapédio e tensor do tímpano são muito semelhantes aos humanos^{54 55}. Por outro lado, o uso de ratos como animais de laboratório tem baixo custo e maior disponibilidade em relação às chinchilas.

Existem mais de 130 espécies de ratos no mundo derivadas dos ratos pretos e marrons. O rato de laboratório foi desenvolvido do rato marrom selvagem conhecido como *Rattus norvegicus*, a partir de 1906, quando houve um esforço para padronizar a variante albina homozigótica desses ratos no Wistar Institute (Filadélfia, EUA). A linhagem Wistar contribuiu também para o desenvolvimento de muitas outras. Atualmente as linhagens mais comuns usadas na experimentação médica incluem Wistar, Sprague-Dawley, e Long-Evans. Os ratos Wistar albinos são quietos, resistentes a infecções, com cabeça larga e orelhas compridas, comprimento do rabo menor que o do corpo. Os ratos Sprague-Dawley albinos crescem mais rapidamente que os Wistar, são menos resistentes a infecções, apresentam cabeça mais longa e estreita, e comprimento do rabo maior ou igual ao do corpo. Os ratos Long-Evans foram desenvolvidos em 1915, a partir do cruzamento de fêmeas Wistar albinas com rato selvagem cinza; esses ratos são menores, com uma mancha preta na cabeça-pescoço e linha escura ao longo do

dorso. Em nosso meio, há ampla disponibilidade de *Rattus norvegicus* Wistar para pesquisa; mais difícil é o acesso a ratos Sprague-Dawley e Long-Evans.

Diversos cuidados devem ser tomados no manuseio dos ratos. Alimentação é um fator importante, já que os ratos podem comer diariamente quase 10% do seu peso. Em laboratório, é preferível o uso de ração padronizada, sem a necessidade ou conveniência de introduzirem-se vegetais ou frutas (e acrescentar mais uma possível variável no experimento); rações sólidas permitem ao rato desgastar seus dois pares de dentes incisivos, que crescem até 3 mm por semana. Água deve ser fornecida *ad libitum*. O rato atinge a idade adulta com 72 dias de vida e peso aproximado de 250-400g, sendo os machos maiores que as fêmeas. A temperatura ambiental deve variar entre 20-24°C, com umidade relativa entre 50-70%. Ciclos de 12 h de luz/escuro, com intensidade luminosa a 1m do chão de 300 lux, e dentro da gaiola de apenas 60 lux. O nível de ruído no ambiente deve situar-se entre 40-50dB. Deve dispor de área de chão de 250 cm² e altura de 18 cm. A movimentação e manuseio do animal deve ser cuidadosa, evitando estresse no rato, e ao mesmo tempo protegendo o pesquisador de possíveis mordidas e arranhões; o uso de luvas espessas de couro pode ser inevitável. Em geral os ratos são de manuseio fácil. Preferencialmente não segurá-los pelo rabo; contudo, se necessário, prendê-los pela base e não pela ponta do rabo (quando pode retorcer-se e morder o instrumentador). A maneira ideal é apreender com a palma da mão sobre o dorso do rato, imobilizando a cabeça entre o polegar e o dedo indicador. Ratos submetidos a estresse severo no manuseio ou a condições ambientais inadequadas, podem falecer.

Diversos protocolos para anestesia de ratos foram descritos, utilizando injeção intravenosa de hexobarbital na veia da cauda, ventilação sob éter sulfúrico, injeção intraperitoneal ou intramuscular da associação cetamina com xilazina. A aplicação intramuscular parece ser a mais prática; contudo, as dosagens preconizadas apresentam variações significativas: cetamina 40-90 mg/kg associado à xilazina 5-13 mg/kg. Neste estudo, após testes de dosagem anestésia em um subgrupo de ratos Wistar com 300g, decidiu-se utilizar uma concentração ainda menor dessa associação (Anexo I). O hidrocloreto de cetamina (Ketalar^R 50mg/ml) é anestésico dissociativo aplicado por via intravenosa ou intramuscular. Sua ação é descrita como anestesia dissociativa porque, durante a indução, o paciente humano sente-se dissociado do seu ambiente. A analgesia e amnésia são evidentes mas o relaxamento muscular é discreto (o que motiva a associação da xilazina na anestesia de ratos). Respiração e resistência ventilatória são pouco afetadas, há taquicardia e elevação da pressão arterial. O despertar tende a ser prolongado. Xilazina (Rompun^R 2%) é uma droga agonista alfa-adrenérgica muito usada em animais, de ação central, com efeito sedativo, analgésico e hipnótico; tem ação bradicardizante e hipotensora, e reduz a motilidade intestinal.

1.6. Objetivo

Este trabalho objetiva descrever a técnica de timpanocentese com laser de argônio e incisional com microlanceta em ratos Wistar, avaliando-se o tempo de cicatrização dessas timpanocenteses.

2. MATERIAL E MÉTODOS

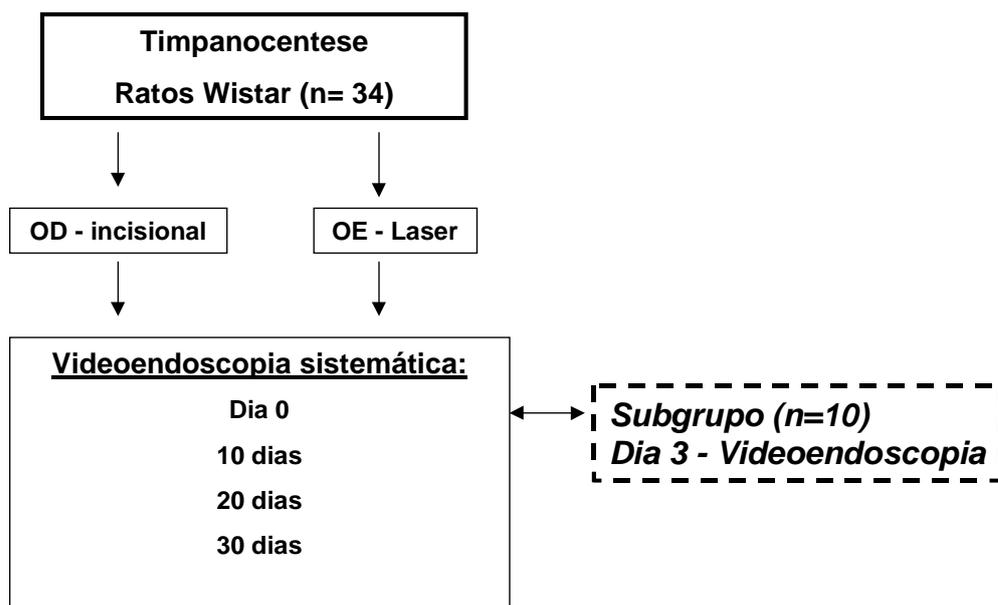
2.1. Estudo experimental

Trinta e quatro ratos albinos da linhagem Wistar, machos, pesando 250-300g e fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Pelotas foram mantidos em biotério adequado às condições das Normas para Manuseio de Animais de Laboratório ⁵⁶, alimentados com ração Nuvilab^R (Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR) e água *ad libitum*. As timpanocenteses foram realizadas na Clínica Oto-oftalmológica de Pelotas e os exames de acompanhamento na Clínica Dr. Castagno (Pelotas, RS).

O protocolo estabelece que os ratos sejam anestesiados com a associação cetamina 27mg/kg e xilazina 2,7 mg/kg, aplicada por via intramuscular; submetidos à timpanocentese incisional com microlanceta no ouvido direito (ML-OD), e à timpanocentese mediada por laser de argônio no ouvido esquerdo (LA-OE). As timpanocenteses são documentadas com gravação por meio de câmara de vídeo acoplada a endoscópio rígido Storz (Hopkins) com diâmetro de 2.7mm. As imagens representativas são impressas com videoprinter. Os exames de acompanhamento são feitos sem anestesia, na seguinte seqüência: dia do procedimento, após 10, 20 e 30 dias (figura 4). São comparadas a forma da perfuração e tempo de cicatrização para cada grupo. Não é feita assepsia do conduto auditivo externo, nem utilizado antibiótico no pós-operatório. Um subgrupo de 10 ratos escolhidos aleatoriamente foi examinado no terceiro dia após as timpanocenteses, para avaliar patência da perfuração e ausência de otorrêa.

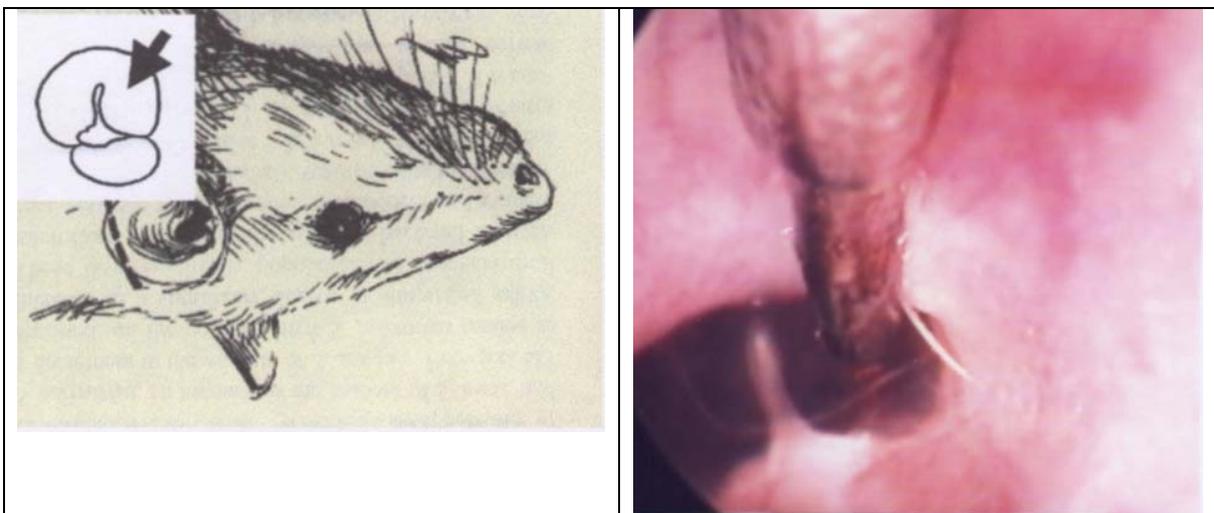
Após o estudo, os ratos foram sacrificados com éter sulfúrico e incinerados no Biotério da Universidade Federal de Pelotas.

Figura 4: Protocolo do estudo



2.2. Técnica da timpanocentese por microestilete no rato

A timpanocentese incisional (ML-OD) nos ratos não permite o uso das microlancetas de cirurgia otológica humana, pois o diâmetro da membrana timpânica é de 2,2 a 2,4 mm (ainda menor que a platina do estribo na orelha média humana). Assim sendo, optou-se por usar um microestilete otológico, com ponta muito fina e cortante, para fazer a timpanocentese incisional nos ratos. Após anestesiado, o rato é colocado na posição cirúrgica (figura 5). O auxiliar traciona levemente o pavilhão da orelha com uma pinça mosquito, permitindo que o conduto auditivo externo seja retificado, o que facilita a introdução do telendoscópio rígido de Hopkins (Storz) de 30° com diâmetro de 2,7mm até o porus acústico. O rato com anestesia demasiado superficial contrai a musculatura adjacente ao conduto auditivo e impede a progressão do endoscópio. Ao mesmo tempo em que o endoscópio progride em direção ao tímpano, introduz-se o microestilete um pouco à frente, sob controle de vídeo, de maneira similar à utilizada em cirurgia endoscópica naso-sinusal. Visualizando-se adequadamente o tímpano, é feita uma timpanocentese radial anterior com extensão entre o cabo do martelo até quase o ânulo timpânico. O cirurgião dextro segura o microestilete com a mão direita apoiada na mesa, e o endoscópio com a esquerda. O posicionamento do rato difere entre ouvido esquerdo e direito. Em ambos, contudo, objetiva manter o hemitímpano anterior à direita, o que favorece ao cirurgião dextro o manuseio do microestilete ou microprobe do laser, enquanto a mão esquerda segura e controla o videoendoscópio.

Figura 5: Posicionamento do rato e instrumentação**OUVIDO DIREITO****OUVIDO ESQUERDO**

O cirurgião dextro segura o microestilete ou a microfibra do laser de argônio sempre com a mão direita e incisa o hemitímpano anterior (setas). O endoscópio é mantido com a mão esquerda permitindo a visualização. O mesmo posicionamento dos instrumentos é usado tanto no ouvido direito quanto no ouvido esquerdo.

2.3. Técnica de timpanocentese por laser de argônio no rato

A timpanocentese mediada por laser (LA-OE), neste estudo, é feita com aparelho de laser de argônio PC-EDO (HGM Inc, Salt Lake City, EUA) que permite aplicar potência máxima de 2.2W, contínuo ou pulsado, através de pequena microfibra de 300 micra adaptada à ponta de telendoscópio rígido de Hopkins (Storz) de 30° com diâmetro de 2,7mm. Essa microfibra, quando colocada a menos de 1 mm do alvo, produz pontos de 0,55-0,30 mm, sendo que, com impactos de 1.7W, obtém-se intensidade de 2.405 W/cm² (ponta da microfibra) a 726 W/cm² (a 1 mm da microfibra). Um estudo piloto (Anexo II) foi realizado na membrana timpânica de seis ratos e os parâmetros escolhidos para fazer uma timpanocentese, preferencialmente circular no quadrante antero-inferior, foram definidos como: potência 1.9W - duração 0,2 segundo - distância da microfibra 1 mm - 1 a 2 impactos. A densidade de energia (DE= potência x tempo /superfície) nesse protocolo é de 7,6 J/cm², sendo que, com densidade superior a 5J/cm², é possível obter vaporização sem carbonização.

2.4. Cálculo da amostra e avaliação estatística

Considerando o estudo de Soderberg et al ⁴¹ em ratos, a média de dias para cicatrização na timpanocentese por microlanceta, é de 10 dias; e na timpanocentese por laser de CO₂, é de 19.5 dias (desvio padrão presumido 3). Esses valores foram utilizados para determinar o tamanho de cada amostra em que o poder estabilize em 100% (n= 7). Foi utilizado o programa *Power and Precision 2.0* (Biostat Inc, Englewood,NJ, EUA) (Tabela V). Contudo, optamos por

uma amostra de 34 timpanocenteses em cada grupo por ser exeqüível e ainda maior que estudos anteriormente realizados (n= 20 a 22 ratos). A significância estatística dos resultados é determinada pelo Teste do Chi Quadrado.

Tabela V - Cálculo do tamanho da amostra

| Power as a Function of Sample size | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Alpha = 0,050, Tails = 2, Mean 1 = 10,000, Mean 2 = 19,500, SD = 3,000 | | | | | | | | | | | | |
| N1= | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| N2= | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| | | | | | | | | | | | | |
| | 0,959 | 0,991 | 0,998 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

(1) Microlanceta: média 10 dias; (2) Laser: média 19.5 dias; Desvio padrão= 3

3. RESULTADOS

Os 34 ratos Wistar foram submetidos a timpanocentese incisional com microestilete na orelha direita (ML-OD) e mediadas por laser da argônio na orelha esquerda (LA-OE) (figura 6). As timpanocenteses incisionais foram distribuídas em três grupos de acordo com o formato (Tabela VI). A timpanocentese radial, em que a incisão estende-se de forma linear entre o cabo do martelo e o ânulo timpânico (posição 4 a 5 horas, considerando-se a base do martelo 12 horas), era o pretendido no estudo e ocorreu em 64.7%. Contudo, pela própria dificuldade da técnica em que o microestilete deve fazer uma abertura com menos de 1mm no hemitímpano anterior do rato, também ocorreram timpanocenteses de formato triangular (20.6%) e timpanocenteses amplas irregulares (14.7%). Essas, amplas e irregulares, que tomam todo o quadrante ântero-superior do tímpano, tendem a ocorrer quando o microestilete perfura a membrana timpânica em contato com o cabo do martelo e é tracionado em direção ao quadrante superior (posição de 1 hora), causando um descolamento do segmento de tímpano ligado anteriormente ao martelo. A cicatrização de todas essas timpanocenteses, no entanto, ocorreu ao longo dos primeiros 10 dias.

TABELA VI - Timpanocentese incisional por microestilete no ouvido direito (n=34)

| Timpanocentese | Forma | N | Cicatrização 10° dia |
|----------------|---|------------|----------------------|
| Radial |  | 22 (64.7%) | Todos |
| Triangular |  | 7 (20.6%) | Todos |
| Ampla |  | 5 (14.7%) | Todos |

As timpanocenteses mediadas por laser de argônio, de 0,4 a 0,8 mm, apresentaram três aspectos principais (Tabela VII). Timpanocentese circular (47.1%) ocorre quando o microprobe não sofre deslocamento significativo e os impactos do laser são feitos no mesmo local. A timpanocentese oval (47.1%) decorre de impactos adjacentes. Timpanocentese irregular ocorre quando os impactos são múltiplos e adjacentes (5.9%). Todas as timpanocenteses também cicatrizaram dentro de 10 dias, o que concluiu o estudo após o exame no décimo dia.

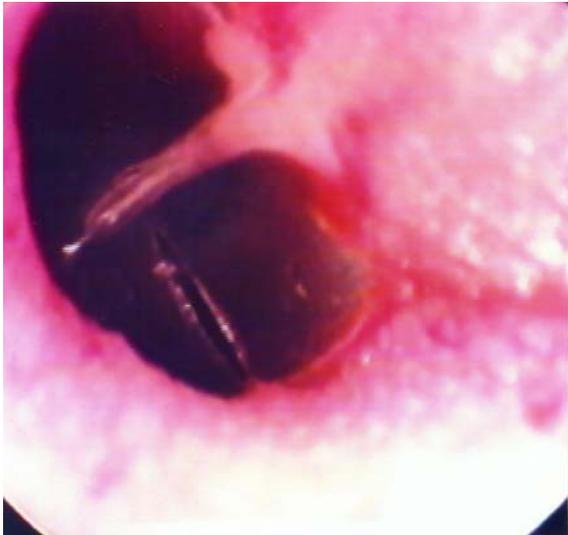
TABELA VII - Timpanocentese por laser de argônio no ouvido esquerdo (n=34)

| Timpanocentese | Forma | N | Impactos (*) | Cicatrização 10° dia |
|------------------|---|------------|--------------|----------------------|
| Circular |  | 16 (47.1%) | 2.3 ± 0.9 | Todos |
| Oval |  | 16 (47.1%) | 1.9 ± 0.3 | Todos |
| Irregular |  | 2 (5.9%) | 2.5 ± 0.5 | Todos |

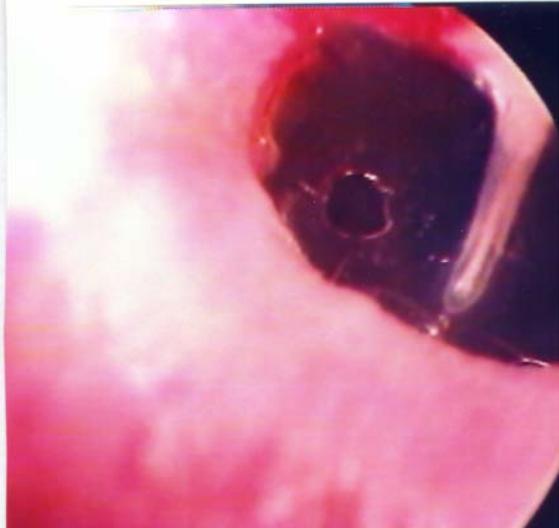
(*) Média de impactos ± desvio padrão

Figura 6: Videofotografias das formas de timpanocenteses.

Microlanceta RADIAL (OD)



Laser CIRCULAR (oe)



Microlanceta TRIANGULAR (OD)



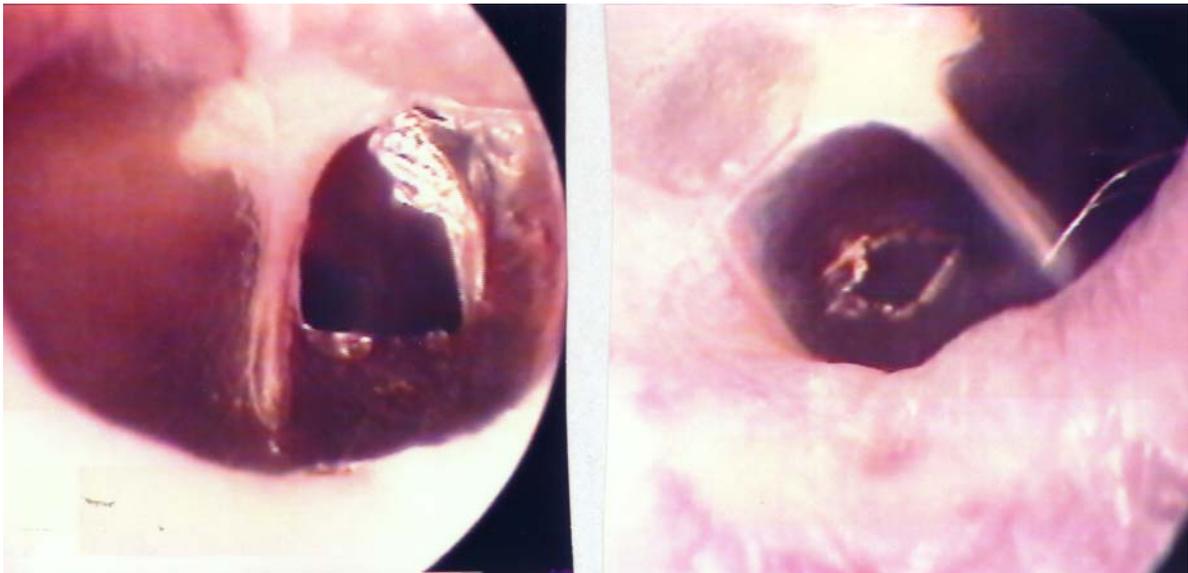
Laser OVAL (OE)



Figura 6 (continuação)

Microlanceta AMPLA (OD)

Laser IRREGULAR (OE)



Um subgrupo de dez ratos Wistar, selecionados aleatoriamente entre os 34 submetidos à timpanocentese, foi examinado com videoendoscopia no terceiro dia após o procedimento. Avaliou-se a permeabilidade das timpanocenteses e principalmente a presença de secreção ou otorréia. Apesar de não se fazer assepsia do conduto auditivo no pré-operatório, nem usar antibióticos, não foram encontrados sinais de infecção tanto nesse subgrupo quanto em todos os demais ratos no exame seguinte (10º dia) (figura 7). Nas timpanocenteses feitas com laser de argônio, foi possível identificar a perfuração, com um anel de carbonização, envolvido por uma banda de desnaturação proteica hialina. A expectativa inicial de que esses anéis concêntricos de desnaturação e carbonização retardassem a cicatrização da timpanocentese mediada por laser de argônio, à semelhança de outros tipos de laser, não foi corroborada neste estudo. A cicatrização de todas as timpanocenteses ocorreu dentro dos dez primeiros dias, tanto no grupo submetido à técnica por incisão com microestilete, quanto naquele em que fora utilizado o microprobe com laser de argônio (figura 8).

Figura 7: Videofotografias de timpanocentesis no 3º dia

Microlanceta (OD)



Laser (OE)



Figura 8: Videofotografias de timpanocentesis no 10º dia.

Microlanceta (OD)



Laser (OE)



4. DISCUSSÃO

O rato albino Wistar apresenta orelha média muito semelhante à humana. O conduto auditivo é estreito, mas permite o manuseio com videoendoscópio em uma das mãos e microinstrumento na outra. A ampla disponibilidade desses ratos, baixo custo, e fácil manuseio em laboratório os tornam uma boa alternativa em microcirurgia otológica experimental. Ainda assim estudos sobre a anatomia da orelha média dos ratos são muito limitados, e decorrentes particularmente dos trabalhos do professor Sten Hellstrom, no Hospital Universitário de Umeå (Suécia)^{57 58}. Por outro lado, há abundância de estudos sobre a anatomia do ouvido na chinchila, pois, com 90% das dimensões humanas, são uma alternativa ainda melhor em pesquisa. Chinchilas, entretanto, têm elevado custo e acesso limitado em nosso meio.

Ratos podem ser anestesiados, por via intramuscular, com a associação de cetamina e xilazina. As dosagens preconizadas apresentam variações significativas (cetamina 40-90 mg/kg associado à xilazina 5-13 mg/kg), pelo que foi realizado um estudo-piloto para definir a dosagem anestésia ideal em um subgrupo de quinze ratos Wistar com 300g (Anexo I), A dosagem utilizada por outros autores (cetamina 55mg/kg associada à xilazina 5,5 mg/kg) anestesiou profundamente todos os seis ratos em que fora aplicada, levando-os ao óbito. Decidiu-se utilizar uma concentração menor, correspondendo a 3/4 da dosagem anterior, o que, ainda assim, levou ao óbito três dos cinco ratos testados (60%).

Em outros quatro ratos, utilizou-se metade da concentração inicial (cetamina 27mg/kg e xilazina 2,7 mg/kg), não causando qualquer óbito; contudo, 25% dos mesmos não apresentavam anestesia em profundidade suficiente para o procedimento, o que determinava nova aplicação dessa mesma concentração. As causas dessa resposta inusitada às dosagens preconizadas de anestésicos, em nossa amostragem de ratos Wistar-UFPEL, permanecem desconhecidas. É possível que hipotermia tenha sido um fator agravante, pois inicialmente os ratos submetidos à timpanocentese no estudo-piloto, permaneceram por 3-4 horas em ambiente muito refrigerado (cerca de 15-16°C), próprio ao uso do aparelho de laser. Na série final, dos 34 ratos que compreendem o estudo principal, a temperatura ambiental manteve-se sempre estável e adequada, assim como a dosagem anestésica, e não ocorreram outros óbitos. Os exames periódicos para controle da cicatrização foram feitos sob contenção mecânica dos ratos, sem excesso de pressão ou fatores que pudessem causar estresse demasiado. Não houve óbitos decorrentes de estresse desse tipo no estudo. A metodologia empregada reproduziu estudos semelhantes feitos em relação a timpanocenteses com laser de CO₂, nos quais o número de ratos oscila entre 20-22 ^(22, 59).

A técnica aqui desenvolvida de timpanocentese controlada por videoendoscopia em ratos, é exequível após alguma prática. É especialmente relevante o posicionamento do rato ao executar o procedimento (figura 5). O manuseio do endoscópio é semelhante ao utilizado na cirurgia endoscópica nasossinusal e, mais recentemente, em miringoplastias ⁶⁰.

O tratamento da otite média secretora tem variado ao longo dos anos. Armstrong²³, em 1954, popularizou o uso dos tubos de ventilação inseridos na membrana timpânica após timpanocentese incisional com microlanceta. Diversos investigadores tem examinado as vantagens e desvantagens de associar-se adenoidectomia^{61 62}. Timpanocentese e inserção de tubos de ventilação tornou-se o procedimento cirúrgico com anestesia geral mais comum em crianças nos Estados Unidos, totalizando mais de um milhão por ano⁶³. Apesar do sucesso desse procedimento, há certa relutância de pais e médicos em submeter crianças a anestesia geral, com complicações menores (obstrução ventilatória, recuperação prolongada, vômitos e agitação) ocorrendo em 9% dos casos, e complicações maiores em 1.9% (laringospasmo e estridor)⁶⁴.

A possibilidade de realizar timpanocentese com laser, sob anestesia tópica, em nível ambulatorial, com segurança, em poucos minutos, e eventualmente prescindindo tubo de ventilação certamente motiva diversos estudos. Ainda mais considerando-se o significativo impacto sócio-econômico da otite média, responsável por 1/3 das consultas pediátricas por enfermidades, e a 25% de todas as prescrições de antibióticos orais nos EUA^{65 66}.

A cicatrização de timpanocenteses por microlanceta, entretanto, tende a ocorrer muito rapidamente (menos de duas semanas), o que não é suficiente para recuperar a maior parte das otites médias secretoras. Prolonga-se a patência da timpanocentese com a inserção de um tubo de ventilação, o qual permanece usualmente por 6-14 meses. Esse tempo pode ser excessivamente longo e levar a complicações^{67 68 69}. Experiências anteriores indicam que a cicatrização dá-se

mais lentamente com microeletrocautério e principalmente com laser. Soderberg et al ⁴¹, estudando timpanocenteses em ratos Sprague-Dawley, concluíram que a cicatrização na incisão por microlanceta ocorre em 9-11 dias por hiperplasia do epitélio escamoso queratinizado suportado por tecido conjuntivo hiperplasiado e ricamente vascularizado. Após o fechamento da perfuração, o epitélio retorna ao normal em 1-2 dias, enquanto o tecido conjuntivo permanece espesso. Na timpanocentese térmica o suprimento vascular do tímpano parece alterado, pois não há vasos visíveis ao longo do cabo do martelo até tarde na cicatrização; histologicamente, a camada epitelial externa está destruída muito além da borda da perfuração, e apenas após 6-9 dias o epitélio cicatricial hiperplasiado atinge o colágeno na borda da perfuração; em outros 6-9 dias, cicatriza-se como na incisão com microlanceta. A timpanocentese por laser de CO2 tem cicatrização semelhante à do processo com cautério, porém com menos reação inflamatória e ainda mais lenta (18-21 dias).

Nos animais de laboratório, a timpanocentese térmica com microeletrocautério foi estudada por Kent e Rhys-Evans ⁷⁰ em 50 guinea pigs: 76% cicatrizaram em 3 semanas, e todos estavam cicatrizados após 6 semanas. Não há referência ao tamanho da perfuração.

Em humanos, Goode e Schulz ⁷¹ fizeram timpanocenteses térmicas de 2 mm em 10 pacientes com otite média secretora: todas estavam permeáveis em 3-4 semanas e cicatrizadas em 6 semanas. Saito et al ²⁵ tentaram criar timpanocenteses permanentes com cautério: em oito pacientes, mais de 25% do tímpano foi perfurado, e permaneceu patente durante 6 meses. Perfurações

menores de 25% cicatrizavam em 3 meses, e o tempo de fechamento está diretamente ligado ao tamanho da timpanocentese. Ruckley e Blair ⁷² estudaram 36 crianças com OMS e compararam os resultados da timpanocentese térmica (3 x 1.5 mm) em um ouvido com a inserção de tubos de ventilação no outro: todas as timpanocenteses com cautério cicatrizaram dentro de 42 dias, com uma permeabilidade média de 26 dias. Potocki e Hoffmann ⁷³ realizaram timpanocenteses térmicas (2 a 3 mm) em 13 pacientes em tratamento com oxigênio hiperbárico: 96% das perfurações estavam permeáveis na quinta semana e 15% continuavam patentes após 6 meses. Deve-se considerar que pacientes em tratamento com oxigênio hiperbárico apresentam importantes problemas de cicatrização (diabete, enfermidade periférica vascular, amputações). Entre nós, Wenzel ⁷⁴ realizou timpanocenteses com microeletrocautério modelo Lavinsky-HCPA em 83 crianças: 70,5% estavam permeáveis após 30 dias, e 5,2% das timpanocenteses ainda estavam patentes após 90 dias.

Timpanocentese por laser de CO2 foi inicialmente realizada por Wilpizeski et al ⁷⁵ em 1977, em 40 macacos *squirrel*, removendo todo o quadrante timpânico pósterio-superior. Goode ⁷⁶, em 1982, apresentou timpanocenteses por laser de CO2 em dez gatos e, possivelmente, o primeiro relato em onze pacientes. As perfurações de 1.5 a 2.5 mm nos gatos fecharam em 3-6 semanas; e 90% das timpanocenteses (1.5 a 2.5 mm de diâmetro) nos pacientes cicatrizaram dentro de 6 semanas. De Rowe et al ⁴⁰ desenvolveram um sistema com laser de CO2 aplicado por fibra óptica ao otoscópio e realizaram 30 timpanocenteses de 1.5 a 2 mm em *guinea pigs*. Essas permaneceram patentes por tempo variável, na

dependência da quantidade de energia e tempo de duração do laser: 9.2 dias (0.8 Joules/ 0.05 s), 15 dias (1.2 Joules/ 0.2 s) e por 27.4 dias (1.6 Joules/ 0.2 s). Concluíram que quanto maior a energia e maior o tempo de exposição, tanto mais permanecerá patente a timpanocentese. Enfatizaram ainda, que, ao usar um microprobe de fibra óptica ocorre dispersão do laser a partir da ponta, de forma que estruturas mais distantes, como promontório ou ouvido interno, não sofrem qualquer dano. De fato, enquanto sistemas com micromanipuladores em microscópio cirúrgico apresentam um ângulo de divergência do laser de apenas 3° (e em conseqüência não perdem potência no percurso), as microfibras ópticas apresentam divergência de 13°, causando aumento do ponto de impacto de acordo com a distância, com perda significativa de foco e potência. Assim não há lesão em estruturas adjacentes à membrana timpânica nas timpanocenteses por laser transmitido com microfibras ópticas. Valtonen et al⁷⁷ estudaram a influência da forma da timpanocentese (de 1.2 a 2.2 mm, circulares ou riniformes) por laser de CO₂ realizada em 18 chinchilas, constatando que perfurações circulares tendem a cicatrizar mais rapidamente.

Neste estudo, ratos Wistar foram submetidos a timpanocenteses com laser de argônio com 7,6 J e tempo de duração de 0,2 s. O diâmetro maior dessas timpanocenteses oscilou entre 0,4 a 0,8 mm, sendo que o tímpano no rato Wistar de 250-300g tem diâmetro entre 2,2 e 2,4 mm. Não encontramos qualquer diferença entre as diversas formas de timpanocenteses, e todas estavam cicatrizadas no décimo dia. Realmente essas timpanocenteses são menores que o preconizado em estudos com chinchilas, *guinea pigs*, macacos e pacientes. Mas,

ao considerar a proporção da timpanocentese em relação ao diâmetro do tímpano, encontra-se nos ratos Wistar (0.26), na chinchila (0.25), e no homem (0.21). Ou seja, não há diferença proporcional significativa na timpanocentese feita nos ratos. Por outro lado, não houve qualquer diferença em relação às timpanocenteses incisionais por microestilete feitas nos mesmos ratos aqui avaliados.

Ainda são desconhecidos os motivos pelos quais o laser de argônio não apresentou resultados comparáveis ao laser de CO₂ em timpanocenteses feitas em animais de laboratório. Com base nesses resultados, poder-se-ia inferir não haver vantagem clinicamente relevante na utilização do laser de argônio em timpanocenteses no tratamento da otite média secretora, pois o tempo de patência é ainda limitado (menos de duas semanas) e insuficiente a normalização da caixa timpânica. Contudo, a transposição desses resultados deve ser feita com cautela, pois a cicatrização timpânica tende a ser mais rápida na perfuração traumática na orelha média sadio (sem otite média)^{78 79}. Estudos experimentais realizados com timpanocenteses com laser, incluindo este, envolveram animais sem otite média. Assim, ainda é possível que timpanocenteses com laser de argônio em ratos com otite média tenham uma patência significativamente mais longa, o que deve ser objeto de novos estudos.

Nos humanos, a timpanocentese por laser de CO₂ parece estabelecer-se como uma nova e eficiente modalidade de ventilação ou drenagem da orelha média, podendo reduzir a necessidade de antibióticos ou inserção de tubos de ventilação em pacientes com otite média secretora ou mesmo otite média aguda.

É rápida e menos dolorosa que a timpanocentese incisional, realizável sob anestesia tópica ⁸⁰, e permanece permeável por mais tempo. Recentemente, foi descrita também em casos atípicos, como disfunção da tuba auditiva em indivíduos prestes a fazer viagem aérea, oxigenioterapia hiperbárica, e mastoidite ⁸¹. Contudo, Szeremeta et al ³³ criticam a ênfase excessiva que timpanocentese por laser de CO2 vem ganhando, no meio otológico e mesmo leigo, especialmente quando inexistem estudos clínicos controlados a respeito. Em sua série de 48 timpanocenteses incisionais comparadas a 39 mediadas por laser de CO2, concluíram não haver redução significativa da efusão na orelha média: 100% das incisionais e 79% das timpanocenteses por laser estavam cicatrizadas dentro de 16 dias. Mais recentemente, entretanto, outros autores ^{82 83 84 85} têm feito relatos entusiasmados quanto à versatilidade e eficácia do laser de CO2 em manter timpanocenteses (cerca de 2 mm de diâmetro) patentes por mais de duas semanas em adultos e crianças, embora os resultados sejam mais limitados em pacientes alérgicos ⁸⁶.

5. CONCLUSÃO

Timpanocentese incisional com microestilete ou mediada por laser de argônio apresentaram evolução semelhante em todos os ratos de linhagem Wistar aqui estudados, estando completamente cicatrizadas dentro de dez dias.

ANEXO I

Dosagem do anestésico

Quinze ratos Wistar foram submetidos à aplicação intramuscular da associação de cetamina e xilazina em diferentes concentrações, ao mesmo tempo em que se treinava a rotina do procedimento das timpanocenteses com microestilete e laser de argônio.

| N | Dosagem | Associação | Óbitos |
|----------|----------------|---|---------------|
| 6 | Inteiro | Cetamina 55mg/kg Xilazina 5,5 mg/kg | 6/6 (100%) |
| 5 | 3/4 dose | Cetamina 41 mg/kg Xilazina 4,1 mg/kg | 3/5 (60%) |
| 4 | 1/2 dose | Cetamina 27 mg/kg Xilazina 2,7 mg/kg | 0/4 (0%) * |

(*) 1/4 (25%) não apresentou profundidade anestésica suficiente necessitando aplicação de nova dosagem de cetamina 27mg/kg e xilazina 2,7 mg/kg.

ANEXO II

Tempo de impacto do laser de argônio na timpanocentese

Seis ratos Wistar foram submetidos a timpanocenteses por laser de argônio, conforme técnica descrita anteriormente, com o objetivo de determinar o tempo de duração do impacto. Considerando-se que a quantidade de energia necessária para vaporização de tecido sem deixar resíduo carbonizado ("char-free") é 5 J/cm^2 , foram feitos os seguintes testes (em todos com o laser em 1.9W e a microfibras de 300μ a 1 mm do tímpano).

Foi possível concluir que o tempo de duração do impacto de 0,2s era apropriado para a timpanocentese circular desejada, com apenas 1 a 2 impactos. Por outro lado, quanto maior o número de impactos maior a possibilidade de obter-se uma timpanocentese não-circular ou oval. Portanto, os parâmetros utilizados neste estudo para a timpanocentese com laser de argônio foram estabelecidos em 1.9 W de potência, 0.2s de duração, e microfibras posicionada a 1 mm da membrana timpânica.

| 1.9W - 1 mm distância do tímpano | | N. impactos | Diâmetro perfuração | Forma da timpanocentese |
|---|-----------|--------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Duração (energia) | # | | | |
| 0,1 s (3.8 J/cm) | 1d | 4 | 0,4 mm | Oval |
| 0,1 s (3.8 J/cm) | 1e | 3 | 0,4 mm | Oval |
| 0,1 s (3.8 J/cm) | 2d | 4 | 0,4 mm | Oval |
| 0,1 s (3.8 J/cm) | 2e | 4 | 0,4 mm | Oval |
| 0,2 s (7.6J/cm) | 3d | 2 | 0,4 mm | Circular |
| 0,2 s (7.6J/cm) | 3e | 2 | 0,4 mm | Circular |
| 0,2 s (7.6J/cm) | 4d | 2 | 0,4 mm | Oval |
| 0,2 s (7.6 J/cm) | 4e | 1 | 0,5 mm | Circular |
| 0,5 s (19 J/cm) | 5d | 1 | 0,5 mm | Circular |
| 0,5 s (19 J/cm) | 5e | 2 | 0,3 mm | Circular |
| 0,5 s (19 J/cm) | 6d | 2 | 0,4 mm | Circular |
| 0,5 s (19 J/cm) | 6e | 1 | 0,5 mm | Circular |

-
- ¹ Stool SE; Bluestone CD. Introduction in studies in otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988; 97 (supl 133): 6-8.
 - ² Castagno L, Lavinsky L. Otitis media in children: seasonal changes and socioeconomic level. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002; 62: 129-134.
 - ³ Paparella MM; Schachern PA; Yoon TH; Abdelhammid MM; Shani R; da Costa SS. Otopathologic correlates of the continuum of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990; 99 (supl 148): 17-42.
 - ⁴ Wrtight CG; Meyerhoff WL. Pathology of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994 (supl 163): 24-26.
 - ⁵ Fireman P. Otitis media and eustachian tube dysfunction: connection to allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 787-797.
 - ⁶ Sade J; Ar A. Middle ear and auditory tube. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 116: 499-524.
 - ⁷ Ryan AF et al. Molecular biology. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998; 107(suppl 174): 56-59.
 - ⁸ Kalm O et al. HLA frequency in patients with recurrent acute otitis media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117: 1296-1299.
 - ⁹ Lavinsky L et al. O papel dos fatores hereditários na otite média. *A Folha Médica (Ribeirão Preto)*, 1999; 32: 57-64.
 - ¹⁰ Ogra P et al. Microbiology, immunology, and vaccination. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998; 107 (supl 174): 29-49.

-
- ¹¹ Ingvarsson L. Acute otalgia in children - findings and diagnosis. *Acta Paediatrica Scandinavia* 1982; 71: 705-710.
- ¹² Klein JO et al. Epidemiology of otitis media in Boston children observed from birth to 7 years of age. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990; 99 (suppl 149): 27-28.
- ¹³ Hsu GS; Levine SC; Scott Giebink G. Management of otitis media using Agency for Health care Policy and Research guidelines. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 118: 437-443.
- ¹⁴ Rezende VA et al. Estudo da flora bacteriana e viral na otite média secretora e rinofaringe na infância. *Rev Bras Otorrinolaringol* 1999; 65: 10-17.
- ¹⁵ Tos M et al. Spontaneous course of secretory otitis media and changes in the eardrum. *Archives of Otolaryngology* 1984; 110: 281-289.
- ¹⁶ Rockley TJ; Rhys Evans PH. Secretory otitis media- Evidence for an inherited aetiology. *Journ Laryngol Otol* 1986; 100: 389-393.
- ¹⁷ Takasaka T. Epidemiology of otitis media with effusion in Japan. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990; (suppl 149): 13-14.
- ¹⁸ Daly KA; Hunter LL; Scott Giebink G. Chronic otitis media with effusion. *Pediatrics in Review* 1999; 20: 85-95.
- ¹⁹ Ruben RJ. A time frame of critical/sensitive periods of language development. *Acta Oto-Laryngol* 1997; 117: 202-205.
- ²⁰ Ruben RJ; Wallace IF; Gravel J. Long term communication deficiencies in children with otitis media during their first years of life. *Acta Oto-Laryngol* 1997; 117: 206-207.

-
- ²¹ Sih T. Recurrent otitis media. In: Sih T, Chinski A, Eavey R. II Manual of Pediatric Otorhinolaryngology IAPO/IFOS. São Paulo, 2001, p. 234-243.
- ²² Soderberg O, Hellstrom, Stenfors LE. Myringotomy made by CO2 laser - An alternative to the ventilation tube? *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1984; 97: 335-341.
- ²³ Armstrong B. A new treatment for chronic secretory otitis media. *Arch Otolaryngol* 1954; 59: 653.
- ²⁴ Sederberg-Olsen J, Sederberg-Olsen A, Jensen A. Late results of treatment with ventilation tubes for secretory otitis media in ENT practice. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1989; 108: 448-455.
- ²⁵ Saito H, Miyamoto D, Kishimoto S. Burn perforation as a method of middle ear ventilation. *Arch Otolaryngol* 1978; 104:79-81.
- ²⁶ Soderberg O, Hellstrom, Stenfors LE. The healing pattern of experimental heat myringotomy. *Revue de Laryngologie* 1985; 106: 81-85.
- ²⁷ Sabates F. Applied laser optics: Techniques for retinal laser surgery. In: Tasman W, Jaeger E. *Duane's Clinical Ophthalmology*. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Volume I, capítulo 69^A, p. 1-8.
- ²⁸ Marshall J. Lasers in ophthalmology: The basic principles. *Eye* 1988; 2: S98-S112.
- ²⁹ Kuhl I, Kuhl G. Tratamento dos tumores de laringe. *Folha méd* 1985; 91: 115-121.
- ³⁰ Escudero L, Castro A, Drumond M. Argon laser in human tympanoplasty. *Arch Otolaryngol* 1979; 105: 252-253.

-
- ³¹ Perkins R. Laser stapedectomy for otosclerosis. *Laryngoscope* 1980; 90: 228-241.
- ³² McGee T. The argon laser in surgery for chronic ear disease and otosclerosis. *Laryngoscope* 1983; 93: 1177-1182.
- ³³ Szeremeta W, Parameswaran M, Isaacson G. Adenoidectomy with laser incisional myringotomy for otitis media with effusion. *Laryngoscope* 2000; 110 (3 Pt 1):342-5.
- ³⁴ Brodsky L et al. Office-based insertion of pressure equalization tubes: the role of laser-assisted tympanic membrane fenestration. *Laryngoscope* 1999; 109: 2009-14.
- ³⁵ Garin P, Remacle M. Laser assisted myringotomy combined with adenoidectomy in children: preliminary results. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1999; 53: 105-8.
- ³⁶ Cohen D et al. Middle ear laser office ventilation with CO2 laser flashscanner. *J Clin Laser Med Surg* 1998; 16: 107-9.
- ³⁷ Marchant H, Bisschop P. Intere de la myringotomie au laser CO2 dans le traitement de l'otite seromuqueuse. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 1998; 115: 347-51.
- ³⁸ Silverstein H et al. Laser-assisted tympanostomy. *Laryngoscope* 1996; 106(9 Pt 1): 1067-74.
- ³⁹ Sedlmaier B et al. Experimental and clinical experiences with Er: YAG laser otoscope. *HNO* 2000; 48: 816-21.

-
- ⁴⁰ DeRowe A, Ophir D, Katzir A. Experimental study of CO2 laser myringotomy with a hand-held otoscope and fiberoptic delivery system. *Laser Surg Med* 1994; 15: 249-253.
- ⁴¹ Soderberg S, Hellstrom S, Stenfors LE. Tympanic membrane changes resulting from different methods of transmyringal middle ear ventilation. *Am J Otolaryngol* 1985; 6: 237-240.
- ⁴² DiBartolomeo J, Ellis M. The argon laser in otology. *Laryngoscope* 1980; 90.
- ⁴³ DiBartolomeo J. The argon laser and CO2 lasers in otolaryngology; Which one and why? *Laryngoscope* 1981; 91 (9) : supl 26: 1-16.
- ⁴⁴ Gillis T et al. Argon laser and soft tissue interaction. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1984; 92: 7-12.
- ⁴⁵ Vincent R et al. Argon laser and Gherini-Causse Endo-Otoprobe in otologic surgery. *Ear Nose Throat J* 1996; 75 : 770-80.
- ⁴⁶ Johnson F, McMinn R, Atfield G. Ultrastructural and biochemical observations on the tympanic membrane. *J Anat* 1968; 103: 297.
- ⁴⁷ Lim D. Human tympanic membrane: An ultrastructural observation. *Acta Otolaryngol* 1970; 70:176-186.
- ⁴⁸ Schrapnell H. On the form and structure of the membrana tympani. *London Med Gazette* 1832; 10: 120.
- ⁴⁹ Browning G, Granich M. Surgical anatomy of the temporal bone in the chichilla. *Ann Otol* 1978; 87: 875-882.

-
- ⁵⁰ Lavinsky L, Goycoolea M, Ganança M, Zwetsch Y. Surgical treatment of vertigo by utriculostomy: an experimental study in sheep. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1999; 119: 522-527.
- ⁵¹ Lavinsky L, Seibel V. Detailed histologic, anatomic, and morphometric study of the middle ear in sheep to establish a new experimental model. *Annals of the 4th Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, Sendai, Japão, 2001*, p. 231-235.
- ⁵² Lavinsky L, Goycoolea M. In search of a teaching, training and experimental model for otological surgery. In: Tos M, Thompson J (ed.) *Otitis Media Today*. Copenhagen, 1997, p.1-8.
- ⁵³ Vrettakos P et al. Middle ear structure in the chinchilla: A quantitative study. *Am J Otolaryngol* 1988; 9: 58-67.
- ⁵⁴ Hellstrom S, Salen B, Stenfors L. Anatomy of the rat middle ear. *Acta Anat (Basel)* 1982; 112: 346-352.
- ⁵⁵ Judkins R, Li H. Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1977; 117: 438-447.
- ⁵⁶ *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Academy of Sciences, Washington, 1996.
- ⁵⁷ Hellstrom S, Salen B, Stenfors L. Anatomy of the rat middle ear. A study under the dissection microscope. *Acta Anat (Basel)* 1982; 112: 346-352.
- ⁵⁸ Hellstrom S. Anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 119: 556-557.

-
- ⁵⁹ Yucel O. Topical use of mitomycin C in laser myringotomy: an experimental study in rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2000; 54: 93-96.
- ⁶⁰ Karhuketo T, Puhakka H. Technique of endoscope-aided myringoplasty. *Otol Neurotol* 2002; 23: 129-131.
- ⁶¹ Gates G, Muntz H, Gaylis B. Adenoidectomy and otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* supl. 1992; 155: 24-32.
- ⁶² Coyte P et al. The role of adjuvant adenoidectomy and tonsillectomy in the outcome of the insertion of tympanostomy tubes. *N Engl J Med* 2001; 344: 1188-1195.
- ⁶³ Derkay C. Pediatric otolaryngology procedures in the US: 1977-1987. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1993; 12: 1-12.
- ⁶⁴ Hoffmann K, Thompson G, Burke B, Derkay C. Anesthetic complications of tympanostomy tube placement in children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128: 1040-1043.
- ⁶⁵ Bluestone C. Role of surgery for otitis media in the era of resistant bacteria. *Pediatr Infect Dis J*, 1998; 17: 1090-1098.
- ⁶⁶ Jung T, Hanson J. Classification of otitis media and surgical principles. *Otolaryngol Clin North Am* 1999; 32: 369-383.
- ⁶⁷ Lacosta J, Zabaleta M, Erdozain I. Evolucion de la otitis media secretora tratada con drenajes transtimpánicos. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1996; 47: 346-353.
- ⁶⁸ Jimenez Antolin J et al. Miringotomia y tubos de ventilación trasntimpánicos en otitis media secretora. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1994; 45: 415-419.

-
- ⁶⁹ Moller P et al. Transtympanic ventilator tubes in the treatment of seromucous otitis. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 1992; 113: 389-395.
- ⁷⁰ Kent S, Rhys-Evans P. Thermal myringotomy in guinea pigs. *J Laryngol Otol* 1987; 101: 103-115.
- ⁷¹ Goode R, Schulz W. Heat myringotomy for the treatment of serous otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1982; 90: 764-766
- ⁷² Ruckley R, Blair R. Thermal myringotomy (an alternative to grommet insertion in childhood secretory otitis media?). *J Laryngol Otol* 1988; 102: 125-128.
- ⁷³ Potocki S, Hoffmann D. Thermal myringotomy for eustachian tube dysfunction in hypervaric oxygen therapy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 121: 185-189.
- ⁷⁴ Wenzel T. Avaliação do emprego de microeletrocautério na cirurgia da otite média secretora. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
- ⁷⁵ Wilpizeski C et al. Otolological applications of lasers. *Trans Pa Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1977; 30: 185-192.
- ⁷⁶ Goode R. CO2 Laser Myringotomy. *Laryngoscope* 1982; 92: 420-423.
- ⁷⁷ Valtonen H, Poe D, Shapshay S. Experimental CO2 laser myringotomy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 125: 161-165.
- ⁷⁸ Stenfors LE et al. Repair of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol* 1980; 90: 333-341.
- ⁷⁹ Kristensen S et al. Traumatic tympanic membrane perforations: complications and management. *Ear Nose Throat J* 1989; 68: 504-516.

-
- ⁸⁰ Hoffman R, Li C. Tetracaine topical anesthesia for myringotomy. *Laryngoscope* 2001; 111: 1636- 1638.
- ⁸¹ Bent J, April M, Ward R. Atypical indications for OtoScan laser-assisted myringotomy. *Laryngoscope* 2001; 111: 87-89.
- ⁸² Sedlmaier B et al. Ventilation time of the middle ear in otitis media with effusion after CO2 laser myringotomy. *Laryngoscope* 2002; 112: 661-668.
- ⁸³ Cohen D et al. Laser myringotomy in different age groups. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127: 260-264.
- ⁸⁴ Reilly J, Deutsch E, Cook S. Laser-assited myringotomy for otitis media: A feasibility study with short-term followup. *Ear Nose Throat J* 2000; 79: 650-657.
- ⁸⁵ Siegel G, Chandra R. Laser office ventilation of ears with insertion tubes. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 127 : 60-66.
- ⁸⁶ Prokopakis E et al. The role of laser assisted tympanostomy (LAT) in treating allergic children with chronic serous otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002; 62: 207-214.