

Achados otomicroscópicos e histológicos da miringoesclerose induzida em ratos: estudo crítico de um modelo experimental

Otomicroscopic and histologic findings of induced myringosclerosis in rats: a critical study of an experimental model

Patrícia F. Santos¹, Mariana C. Leaf²,
Cristina Peixoto³, Silvio Caldas Neto⁴,
Silvania Tavares Paz Rosas⁵

Palavras-chave: meningite, implante coclear, deficiência auditiva, crianças.

Key words: meningites, cochlear implant, deafness, children.

Resumo / Summary

Amiringoesclerose é caracterizada por hialinização da lâmina própria da membrana timpânica. Trabalhos experimentais têm utilizado a otomicroscopia ou a histologia para estudar a miringoesclerose em animais, porém sem correlacionar precisamente estes dois métodos de avaliação. **Objetivo:** Este estudo procura avaliar a acurácia da otomicroscopia no diagnóstico de miringoesclerose em modelo experimental com ratos. **Forma de estudo:** experimental. **Material e Método:** Foi induzida miringoesclerose por inoculação transtimpânica de *Streptococcus pneumoniae* em 25 ratos Wistar, que foram examinados quinzenalmente por otomicroscopia e sacrificados após oito semanas, tendo suas membranas timpânicas examinadas por histologia. **Resultados:** Da confrontação das alterações otomicroscópicas com os achados histológicos, houve uma sensibilidade de 80% e especificidade de 75%. **Conclusão:** Pelos resultados obtidos neste estudo, a otomicroscopia não representou um bom método para avaliar a miringoesclerose neste modelo experimental.

Myringosclerosis is characterized by hyalin change of the *lamina propria* of the tympanic membrane. Experimental studies have used otomicroscopy or histology to evaluate mitngosclerosis in animals, but they do not correlate precisely these two methods. **Aim:** The present study evaluates the accuracy of the otomicroscopy in the diagnosis of myringosclerosis in rats. **Study design:** experimental. **Material and Method:** Myringosclerosis was induced by transtympanic inoculation of *Streptococcus pneumoniae* in 25 Wistar rats, wich were examined weekly through otomicroscopy and sacrificed after eight weeks for histologic study of their tympanic membranes. **Results:** From the comparison of the otomicroscopic data in relation to the histologic findings, we could observe a sensibility of 80% and a specificity of 75% for the otomicroscopy. **Conclusion:** Considering the results in this study, the otomicroscopy didn't represent a good method to evaluate miringosclerosis in this experimental model.

¹ Mestra em Cirurgia pela Universidade Federal de Pernambuco.

² Aluna de Pós-graduação em Otorrinolaringologia da Universidade de São Paulo. Professora Substituta do Depto. de Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco.

³ Doutora, Pesquisador Adjunto do Depto. de Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

⁴ Professor Adjunto da Disciplina de Otorrinolaringologia da Universidade Federal de Pernambuco. Chefe do serviço de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

⁵ Histotécnica do Mestrado do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Trabalho apresentado como Tese de Mestrado do programa de Pós-graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

Endereço para correspondência: Silvio Caldas – Rua Poeta Zezito Neves 38 ap. 1801 Recife PE 51020-200.

Tel./Fax: (0xx81) 3427-4610 – e-mail: caldas@hotmail.com.br

Artigo recebido em 17 de agosto de 2004. Artigo aceito em 05 de agosto de 2005.

INTRODUÇÃO

A timpanoesclerose é o termo usado para descrever uma alteração histológica que ocorre na mucosa da orelha média (OM) ou mastóide caracterizada por hialinização, podendo evoluir com calcificação ou ossificação.¹ Foi descrita pela primeira vez por Von Tröltzsch, em 1873, relatando um processo patológico caracterizado por rigidez da mucosa da OM.² Posteriormente, Zöllner; Beck, em 1955, introduziram o termo timpanoesclerose.³

É o estágio final de um processo originado a partir de inflamação aguda, crônica ou recorrente da lâmina própria da OM, caracterizado por um infiltrado progressivo de fibroblastos, causando um aumento de colágeno, o que origina uma formação pobre em células e vasos sanguíneos, seguida por degeneração hialina e, em algumas ocasiões, deposições calcárias^{4,7}, podendo haver mesmo formação de cartilagem ou osso.⁸ Estas alterações podem trazer prejuízos funcionais para a unidade timpano-ossicular, causando perda auditiva condutiva e repercutindo nas decisões cirúrgicas durante as timpanoplastias.

Quando a timpanoesclerose atinge a membrana timpânica (MT), ela pode ser diagnosticada à otoscopia, tomando um aspecto de placas brancas com extensão variável e recebendo o nome de miringoesclerose.⁹

Modelos experimentais têm sido utilizados para indução de timpanoesclerose desde o início da década de 1970¹⁰⁻²², a maior parte deles utilizando ratos. Esses modelos costumam ser estudados com base na otoscopia, otomicroscopia e histologia, com finalidades variadas, como determinação de fatores etiológicos, estudo da etiopatogênese, ação terapêutica de drogas, etc. As vantagens da avaliação otomicroscópica da MT em relação ao estudo histológico são a facilidade e rapidez com que é feita, os menores custos envolvidos e a não necessidade de sacrifício do animal. Entretanto, não sabemos até que ponto os achados otomicroscópicos podem ser confiáveis na identificação da miringoesclerose. A falta de uma correlação entre a otomicroscopia e a confirmação histológica, por razões óbvias, podem levar a conclusões inadequadas nos estudos que envolvam a indução de miringoesclerose em modelos experimentais. Nenhum trabalho da literatura de pesquisa atentou para a correlação detalhada, em cada animal, dos dois achados. Este estudo, portanto, se propõe a avaliar o grau de correlação entre o aspecto otomicroscópico e os achados histológicos da MT de ratos que sofreram indução de miringoesclerose.

MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi realizado no Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco, onde foi realizado todo o trabalho com os animais, desde a sua preparação, inoculação, otomicroscopias, até o sacrifício dos

mesmos para o estudo histológico, sendo a preparação e avaliação das lâminas realizadas no Departamento de Anatomia Patológica da UFPE e Departamento de Biologia Celular do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães.

Vinte e cinco (25) ratos Wistar, sadios, pesando entre 200-400g, adultos jovens, foram mantidos no Núcleo de Cirurgia Experimental, em gaiolas individuais com piso de serapim de madeira de pinho, iluminação artificial, temperatura ambiente e alimentados com ração. Os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% por injeção intraperitoneal, após o que foram colocados sobre a bancada cirúrgica, em decúbito lateral esquerdo, de modo a expor a orelha direita para o pesquisador.

Sob otomicroscopia, utilizando-se um microscópio cirúrgico marca D.F. Vasconcelos, de coluna, modelo MC-M31, foi inoculado, na orelha média direita de cada animal, por via transtimpânica, 0,1ml de solução contendo 10⁷ unidades formadoras de colônias (UFC) de *Streptococcus pneumoniae* tipo 3, após o que os animais foram devolvidos às suas respectivas gaiolas.

Por um período de oito semanas, foram realizadas, por dois examinadores, otomicroscopias quinzenais em todos os ratos, sob anestesia geral. Após 1 semana todos os ratos haviam apresentado sinais de otite média aguda e, na última otomicroscopia, as membranas timpânicas foram fotografadas com câmera digital marca Sony, modelo MVC-FD73, acoplada ao sistema de divisão de raios do microscópio. Além de fotografadas as membranas, eram anotadas e desenhadas as alterações encontradas pelos examinadores. Após isto, os ratos foram sacrificados com dose letal de hidrato de cloral.

Após o sacrifício dos ratos, as bulas timpânicas foram retiradas, isolando-se das mesmas a MT juntamente com o conduto auditivo externo. As peças foram fixadas em formaldeído a 10% e descalcificadas em ácido nítrico a 7,5%. No processo pós-fixação as bulas foram colocadas na estufa por 40 minutos em álcool e 20 minutos em álcool-xilol e, posteriormente colocadas no xilol fora da estufa, para então, agora desidratadas, serem emblocadas em parafina (50 minutos). O material foi então seccionado com cortes sempre axiais de 4σm de espessura, com intervalos de 50σm, interessando toda a MT, e corado com hematoxilina e eosina, para ser, então, examinado sob microscopia óptica.

À otomicroscopia, foram definidos os seguintes tipos de aspecto:

- a. **MT normal** – Definida como uma membrana timpânica delgada e transparente;
- b. **Opacificação leve** – Definida como uma perda leve da transparência da MT, podendo ocorrer difusamente ou como áreas isoladas;
- c. **Opacificação intensa** – Definida como uma placa branca, com perda total da transparência e nítido espessamento da MT, ocorrendo difusamente ou em áreas isoladas (Figuras 1 e 2).

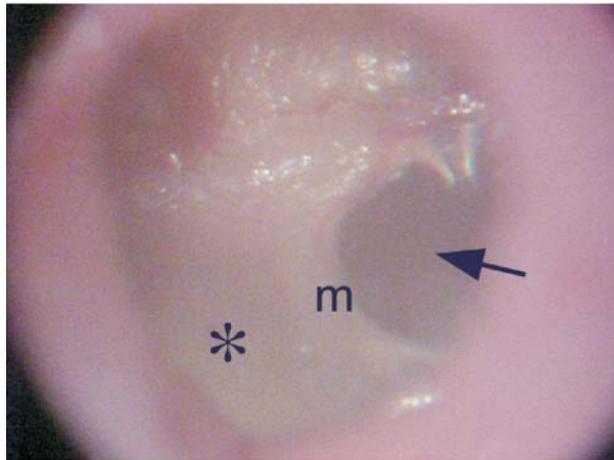


Figura 1. Otomicroscopia mostrando intensa opacificação da metade posterior da membrana timpânica (*), estando a metade anterior com transparência normal (seta). m – cabo do martelo.

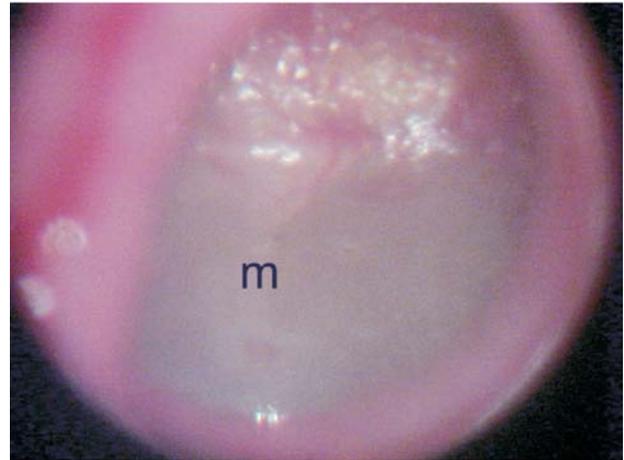


Figura 2. Otomicroscopia mostrando intensa opacificação difusa da membrana timpânica. m – cabo do martelo.

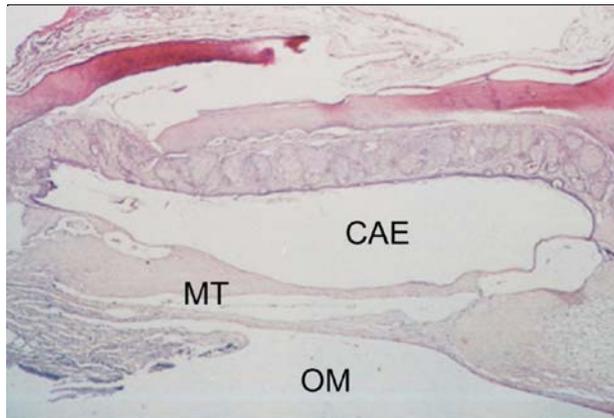


Figura 3. Corte axial corado com HE, 10 X, de membrana timpânica (MT) com timpanosclerose em fase 3. CAE – conduto auditivo externo; OM – orelha média.

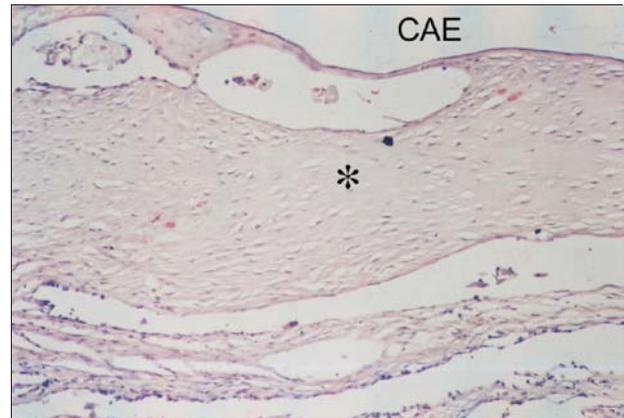


Figura 4. Detalhe da Figura 1: Notem-se os fibroblastos esparsos, envoltos por colágeno hialinizado (*). CAE – conduto auditivo externo.

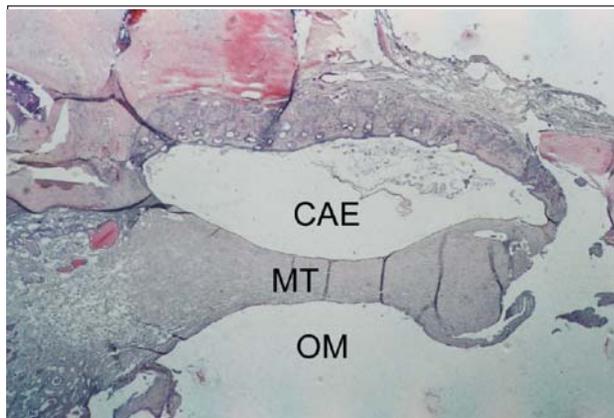


Figura 5. Corte axial corado com HE, 10 X, de membrana timpânica (MT) com timpanosclerose em fase 4. CAE – conduto auditivo externo; OM – orelha média.

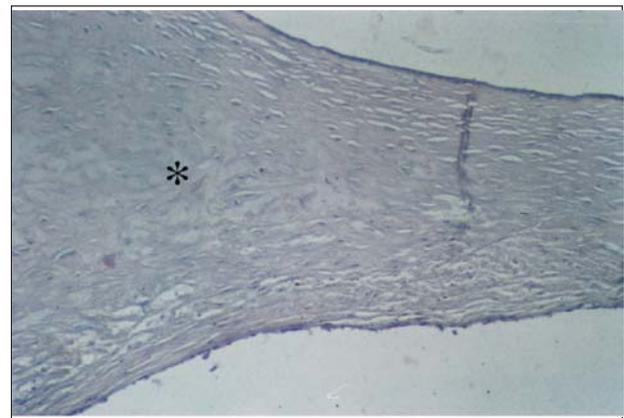


Figura 6. Detalhe da Fig. 3. Observa-se aspecto típico de metaplasia óssea (*) na camada média da membrana timpânica.

Ao exame histológico, foram caracterizadas as fases do processo inflamatório que culminou com a miringoesclerose, sendo definidas 5 fases:

- a. Fase 1** – de exsudação, caracterizada pelo infiltrado polimorfonuclear intenso;
- b. Fase 2** – de granulação, caracterizada por intensa neovascularização e presença de elementos do sistema mononuclear macrófágico (fibroblastos, linfócitos, macrófagos);
- c. Fase 3** – de fibrose, caracterizada pela grande proliferação de fibroblastos e formação de fibras colágenas, diminuição da vascularização;
- d. Fase 4** – de hialinização, caracterizada pela diminuição do número de fibroblastos, que são substituídos pelas fibras colágenas, que agora se fundem, formando placas (Figuras 3 e 4);
- e. Fase 5** – de calcificação, caracterizada pela deposição do cálcio e fósforo, dando à matriz de colágeno um aspecto semelhante à cartilagem ou tecido ósseo (Figuras 5 e 6).

Como, até a fase 3, as alterações vistas são ainda reversíveis, consideramos como miringoesclerose apenas aquele material que apresenta em, pelo menos um dos cortes, o aspecto de fase 4 ou 5, já que a característica histológica fundamental da timpanosclerose é a presença da hialinização, com ou sem calcificação.

Os dados foram descritos sob forma de frequências absolutas e relativas conforme as categorias estudadas. Para a comparação entre os diagnósticos otoscópico e histológico, o teste de McNemar foi empregado, visto que eram os mesmos indivíduos avaliados em duas oportunidades.

A avaliação de concordância entre os diagnósticos pelas referidas técnicas foi feita pela determinação do índice Kappa atribuindo-se os seguintes escores para o nível de concordância 0-20 (fraca), 20-40 (sofrível), 40-60 (regular), 60-80 (boa), 80-100 (ótima).

Essa pesquisa seguiu os princípios que regem o código de ética experimental e as leis de proteção dos animais, de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605, art. 32 e Decreto 3.179, art. 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos. Teve aprovação integral do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE), inclusive concordando que o sacrifício destes animais neste estudo justifica-se pelo fato de não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico.

RESULTADOS

O exame otomicroscópico foi considerado normal em quatro orelhas examinadas (16%). Opacificação leve foi encontrada em 13 orelhas (52%) e opacificação intensa (placa

branca) em oito (32%), como se percebe na Tabela 1. Os achados histológicos foram os seguintes: histologia normal em quatro animais (16%), até a fase 3 em 15 orelhas (60%) e além da fase 3 em seis (24%) das membranas estudadas (Tabela 2).

Confrontando-se os dois métodos de avaliação, vemos na Tabela 3 que, entre os oito (8) ratos que apresentavam uma opacificação intensa à otomicroscopia, quatro (4) apresentavam, à histologia, alterações características das fases 4 ou 5, enquanto que quatro (4) apresentavam até a fase 3 e nenhum foi normal. Já entre as treze (13) orelhas com opacificação leve, apenas duas (2) tinham achados histológicos além da fase 3, dez (10) mostravam histologia até esta fase e um (1) tinha histologia normal. Finalmente, dos quatro ratos com otomicroscopia normal, um tinha até a fase 3 histológica e os demais tinha histologia de mucosa normal ($p=0,290$).

A Tabela 4 simplifica estes dados, reunindo os achados otomicroscópicos *normal* e *opacificação leve* em um único grupo, considerado negativo para miringoesclerose, e também os achados histológicos *normal* e *fase 3* em um só grupo, igualmente considerado negativo. Desta análise, obtiveram-se, entre os ratos com otomicroscopia positiva, quatro com histologia positiva e cinco com histologia negativa. Das

Tabela 1. Distribuição dos animais conforme otoscopia

Diagnóstico (Classificação)	n	%
Normal	4	16,0
Leve	13	52,0
Intensa	8	32,0
Total	25	100,0

Tabela 2. Distribuição dos animais conforme histologia

Diagnóstico (Classificação)	n	%
Normal	4	16,0
≤ 3	15	60,0
> 3	6	24,0
Total	25	100,0

Tabela 3. Concordância entre os diagnósticos otoscópico e histológico

		Histológico		Normal
		> 3	≤ 3	
Otoscópico	Intenso	4	4	0
	Leve	2	10	1
	Normal	0	1	3
	Total	6	15	4

Comparação: Teste de McNemar: $p = 0,290$
Índice Kappa 0,46

orelhas consideradas negativas à otomicroscopia, uma foi positiva e quinze foram realmente negativas ao exame histológico, o que revelou uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 75% da concordância entre os achados ao exame otomicroscópico e os achados ao exame histológico.

DISCUSSÃO

A timpanoesclerose tem sido motivo de inúmeros estudos na literatura. É um processo patológico bastante prevalente em nosso meio, pois acompanha, com muita frequência, as infecções agudas e, sobretudo, crônicas da mucosa da OM.^{1,9} Apesar de já terem sido muito bem definidas as suas características histológicas^{1,4,8}, sua etiologia e patogênese não são totalmente esclarecidas e uma melhor

Tabela 4. Acurácia

		Histológico	
		>3	≤3 ou Normal
Otoscópico	Intenso	4	5
	Leve/Normal	1	15

Medidas de associação e intervalo de confiança de 95%

Sensibilidade: 80,0% (29,9 – 98,9)

Especificidade: 75,0% (50,6 – 90,4)

Valor preditivo positivo: 44,4% (15,3 – 77,3)

Valor preditivo negativo: 93,8% (67,7 – 99,8)

Tabela descrevendo os achados otomicroscópicos e histológicos em cada orelha.

OUVIDOS	OTOMICROSCOPIA	HISTOLOGIA
A1OD	OL	N
A2OD	OI	FASE 4
A4OD	OL	FASE 3
A6OD	OI	FASE 3
A11OD	OL	FASE 3
A14OD	OL	FASE 3
A15OD	OL	FASE 4
B1OD	OI	FASE 3
B3OD	N	FASE N
B4OD	OI	FASE 3
B6OD	OI	FASE 4
B9OD	OL	FASE 2
B10OD	N	N
B12OD	OL	FASE 3
B13OD	OL	FASE 3
B16OD	OL	FASE 3
C2OD	OL	FASE 4
C3OD	OI	FASE 4
C5OD	OI	FASE 3
C6OD	OL	FASE 3
C10OD	N	N
C11OD	N	FASE 3
C12OD	OL	FASE 1
C16OD	OL	FASE 2
C18OD	OI	FASE 4

Legenda: OL - Opacificação Leve; N - Normal; OI - Opacificação Intensa

compreensão destes aspectos poderá trazer possibilidades futuras de tratamentos preventivos.

Por isso, são extremamente importantes os trabalhos experimentais que busquem definir melhor todas as etapas patológicas do desenvolvimento da timpanoesclerose, os fatores histoquímicos e as alterações moleculares envolvidas. Alguns desses trabalhos podem utilizar a avaliação otomicroscópica ou histológica para estudar a incidência e a dinâmica da formação da timpanoesclerose em animais, frente a um possível fator etiológico.^{12,14,18-20} Outros estudos procuram compreender a dinâmica etiopatogênica da timpanoesclerose, caracterizando as alterações histológicas e ultraestruturais dessa entidade.^{15,17,22} Há ainda aqueles trabalhos que objetivam encontrar algum efeito benéfico de substâncias no sentido de impedir a progressão da doença timpanoesclerótica.^{13,16,17,21} Finalmente, há os trabalhos que se destinam apenas à apresentação ou discussão de um modelo experimental.^{10,14}

Diversos trabalhos experimentais utilizam a otomicroscopia como forma de avaliação do processo timpanoesclerótico^{10,11,14,16,18,22}, porém nenhum deles procura fazer uma correlação precisa entre as alterações encontradas nesta avaliação com os achados da histologia, não havendo, portanto, nenhum trabalho que demonstre a confiabilidade das imagens vistas à otomicroscopia, ou seja, a acurácia deste exame.

A otomicroscopia é facilmente realizada sob anestesia geral, não causando nenhum sofrimento ao animal e dispensando o sacrifício do mesmo. Evidentemente, a simples observação otomicroscópica da MT não é capaz de fornecer qualquer dado a respeito das alterações histoestruturais ou histoquímicas presentes no processo timpanoesclerótico, aspectos estes fundamentais para a formulação de várias hipóteses etiopatogênicas ou fisiopatológicas. É claro também que a otomicroscopia só permite a identificação da timpanoesclerose ocorrida na MT (miringoesclerose). Já foi demonstrado no homem que a timpanoesclerose pode ocorrer apenas no interior da orelha média, poupando a MT.^{1,9} Desta forma, trabalhos realizados usando a otomicroscopia como método isolado de avaliação da timpanoesclerose podem eventualmente subestimar a incidência da timpanoesclerose por não conseguir identificar placas que não envolvam a MT.

Entretanto, para aqueles trabalhos dirigidos à introdução de novos modelos experimentais, bem como aqueles destinados a estabelecer análises comparativas tipo caso-controle, a otomicroscopia pode-se prestar muito bem. Também nos estudos cronológicos da progressão da timpanoesclerose a otomicroscopia isolada pode satisfazer plenamente às necessidades metodológicas. Mas, para isso, é essencial que as imagens observadas ao exame otoscópico da MT tenham boas especificidade, sensibilidade e acurácia, sob pena, por razões óbvias, de se fazerem interpretações equivocadas da presença ou ausência da miringoesclerose.

A miringoesclerose é em geral uma alteração fácil de ser identificada à otoscopia como placas brancas na MT⁹, totalmente opacas, que contrastam nitidamente com as áreas normais, que possuem uma transparência bastante expressiva. Todavia, imagens otoscópicas de áreas com aspecto intermediário da MT são bastante comuns, normalmente aceitas como normais, não tendo sido encontrado na literatura nenhum estudo histológico dessas áreas. No rato, sobretudo, pelo tamanho reduzido da MT, os aspectos podem-se confundir. Uma opacificação total da MT pode, por exemplo, representar um processo edematoso agudo ou subagudo ou um processo reparativo com ou sem timpanoesclerose.

No presente trabalho, portanto, procurou-se relacionar os achados otomicroscópicos com as alterações encontradas na avaliação histológica da MT. Utilizou-se o rato como animal de experimentação por este apresentar muitas vantagens práticas e semelhanças anatômicas e patológicas com a OM humana¹⁴ e também por ser o animal mais utilizado na literatura para este fim.

A técnica de indução da timpanoesclerose por meio da inoculação transtimpânica da OM com o *Streptococcus pneumoniae* tipo 3 foi também escolhida pela sua simplicidade, assim como foi também a escolha do método anestésico. Foram feitas otomicroscopias quinzenais por um período de 8 semanas porque alguns aspectos da MT podem variar conforme a evolução do processo inflamatório. As 8 semanas foram escolhidas para o sacrifício dos animais porque, na maior parte dos trabalhos, as alterações histológicas compatíveis com a timpanoesclerose já podiam ser vistas após este período.

O método do exame histológico utilizado, a microscopia óptica com coloração com hematoxilina-eosina, permite facilmente a identificação de todas as fases do processo inflamatório que culmina com a timpanoesclerose. Esta é definida na literatura como uma degeneração hialina que ocorre na matriz de colágenos que se forma durante o processo de reparação, na qual podem se depositar cristais de cálcio e fósforo.^{1,3-7} Porém, nem sempre esses depósitos ocorrem, podendo o processo timpanoesclerótico caracterizar-se fundamentalmente pela hialinização do tecido colágeno neoformado na lâmina própria e por isso só foi considerada miringoesclerose a presença das fases 4 ou 5 no tecido examinado.

Os achados da otomicroscopia, apesar de bastante variados, puderam ser classificados em três grupos: normal (quando a transparência era preservada, igual à da orelha esquerda), opacificação leve e opacificação intensa (placa branca).

O teste de McNemar foi utilizado com o objetivo de verificar se houve ou não mudança com os dois métodos diagnósticos. Obtivemos neste caso um resultado de $p=0,290$, indicando que não houve mudança significativa, ou seja, que existe associação entre os dois métodos. O índice de Kappa

é também um índice de concordância e foi utilizado para expressar a confiabilidade do teste. O resultado obtido (0,46) indica uma concordância regular entre os métodos diagnósticos. Isto ocorreu provavelmente devido à grande variabilidade dos achados (Tabela 3). Considerando como miringoesclerose a presença de opacificação intensa (placa) no exame otomicroscópico e grau 4 ou 5 (hialinização ou metaplasia) no exame histológico e ausência de timpanoesclerose, o exame normal ou opacificação leve no exame otomicroscópico e até o grau 3 (fibrose) no exame histológico, procuramos estudar a acurácia dos resultados obtidos neste estudo (ver Tabela 4). Através deste teste, obtivemos uma sensibilidade de 80% e especificidade de 75%, entretanto, com um intervalo de confiança amplo, certamente por conta do pequeno número de animais no subgrupo de otomicroscopia positiva. Entre os com otomicroscopia normal, houve nítida concordância com o achado histológico. Isso demonstra que a otomicroscopia é um bom método para predizer a proporção dos negativos verdadeiros, porém os resultados não nos permitiram afirmar que o achado de miringoesclerose à otomicroscopia tenha uma boa relação com os achados da histologia.

CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste estudo, a otomicroscopia não representou um bom método para avaliar a miringoesclerose neste modelo experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. House WF, Sheehy JL. Tympanosclerosis. Archives of Otolaryngology 1960; 72: 38-43.
2. Von Trötsch AF. Lehrbuch der Ohrenheilkunde. F.G.M. Vogel. Leipzig; 1873.
3. Zöllner F & Beck C. Die Paukensklerose. Laryng Rhinol Otol 1955; 34: 137-55.
4. Zöllner F. Tympanosclerosis. Arch Otolaryng (Chic.) 1963; 78: 538-44.
5. Brockman SJ. Problems encountered in tympanoplastic surgery. Laryngoscope 1961; 71: 859-66.
6. Joseph RB, Gordon J. Tympanosclerosis. Arch Otolaryng 1963; 77: 186-90.
7. Igarashi M, Konishi S, Alford BR, Guilford FR. The pathology of tympanosclerosis. Laryngoscope 1970; 80: 233-43.
8. Schuknecht HF. Pathology of ear. Cambridge, M.A: Harvard University Press; 1974.
9. Asiri S, Alaaa H, Anazy FA, Zakzouk S et al. Tympanosclerosis: review of literature and incidence among patients with middle-ear infection. The Journal of Laryngology and Otology 1999; 113: 1076-80.
10. Hybasek I. [Morphological model of tympanosclerosis produced by calciphylaxis on the middle-ear mucosa in guinea pig]. Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd 1971; 200(3): 199-208.
11. Hybasek I. Experimental calcifications of the tympanic membrane in guinea pigs. Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove 1976; 19(5): 553-8.
12. Mann W. Experimental tympanosclerosis following ingestion with *Streptococcus pyogenes* and vitamin D3 intoxication. Arch otorhinolaryngol 1986; 243: 296-303.

-
13. Mann W, Beck C, Schaefer HE. The significance of calcium antagonist in rat experimental tympanosclerosis. *Arch otorhinolaringol* 1987; 243: 382-6.
 14. Wielinga EWJ, Kuijpers W, Tonnaer ELGM, Jap PHK. An experimental model for tympanosclerosis. *Acta Otolaryngol* 1988; 105: 537-42.
 15. Forséni M. Macrophages and possible osteoclast differentiation in the rat bullar bone during experimental acute otitis media with reference to tympanosclerosis. *Otol Neurotol* 2001; 22: 771-5.
 16. Spratley JE, Mattsson CK, Hellstrom SO, Clemente MP. Topical ascorbic acid reduces myringosclerosis in perforated tympanic membranes: a study in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001; 110: 585-91.
 17. Forséni M, Hultcrantz M. Possible inflammatory mediators in tympanosclerosis development. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002; 63(2): 149-54.
 18. Russell JD, Giles JJ. Tympanosclerosis in the rat tympanic membrane: an experimental study. *Laryngoscope* 2002; 112: 1663-6.
 19. Tonnaer ELGM, Ingels KJAO, Rijkers GT, Curfs JHA. Antigenic as well as nonantigenic stimuli induce similar middle ear responses in the rat. *Laryngoscope* 2003; 113: 322-7.
 20. Mattsson C, Magnuson K, Hellström S. Myringotomy: a prerequisite for the development of myringosclerosis? *Laryngoscope* 1998; 108: 102-6.
 21. Mattsson C, Marklund SI, Hellström S. Application of oxygen free radical scavengers to diminish the occurrence of myringosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106: 513-8.
 22. Schiff M, Poloquin JF, Catanzarro A, Ryan AF. Tympanosclerosis. A theory of pathogenesis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1980; 86: 1-16.