



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

Efeito do fator de crescimento epidérmico na pseudocicatrização de perfurações traumáticas da membrana timpânica[☆]



Zhengcai Lou 

Yiwu Central Hospital, Department of Otorhinolaryngology, Yiwu, China

Recebido em 27 de março de 2019; aceito em 22 de junho de 2019

Disponível na Internet em 25 de dezembro de 2020

PALAVRAS-CHAVE

Ferimentos e lesões;
Ruptura da membrana timpânica;
Fator de crescimento epidérmico;
Cicatrização de feridas

Resumo

Introdução: As perfurações traumáticas da membrana timpânica tendem a cicatrizar espontaneamente. Entretanto, neste estudo, várias perfurações exibiram cicatrização anormal, na qual a morfologia da cicatrização das membranas timpânicas diferiu da de membranas timpânicas não perfuradas. A pseudocicatrização da membrana timpânica foi caracterizada pelo acúmulo de tecido espesso na área perfurada.

Objetivo: Avaliar a utilidade do fator de crescimento epidérmico em casos que apresentaram pseudocicatrização de perfurações traumáticas da membrana timpânica.

Método: Um total de 26 casos de perfurações traumáticas da membrana timpânica apresentando pseudocicatrização foram incluídos neste estudo. Em todos os casos, o tecido que se acumulou na área perfurada foi removido, o que subsequentemente causou uma nova perfuração. Uma solução de fator de crescimento epidérmico foi aplicada à membrana timpânica uma vez ao dia para manter a membrana timpânica úmida. As taxas de fechamento e os tempos foram avaliados aos 6 meses.

Resultados: Dois pacientes foram perdidos no período de 6 meses de acompanhamento. Dos 24 pacientes restantes, a taxa de fechamento foi de 100% (24/24) e o tempo de fechamento foi de $6,1 \pm 2,3$ dias (variação: 3 a 12 dias). A morfologia da membrana timpânica cicatrizada não foi significativamente diferente daquela da membrana timpânica remanescente.

Conclusões: A pseudocicatrização de perfurações traumáticas da membrana timpânica afeta a condução do som. Isso pode estar associado a vários sintomas, inclusive zumbido, plenitude auricular e desconforto auditivo. A excisão do tecido epitelial excessivo e a aplicação tópica de fator de crescimento epidérmico podem corrigir a pseudocicatrização de perfurações traumáticas da membrana timpânica.

© 2019 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2019.06.011>

[☆] Como citar este artigo: Lou Z. The effect of epidermal growth factor on the pseudo-healing of traumatic tympanic membrane perforations. Braz J Otorhinolaryngol. 2021;87:53–8.

E-mail: louzhengcai@163.com

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

2530-0539/© 2019 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

As perfurações traumáticas da membrana timpânica (PTMT) são comumente observadas em clínicas de otologia e geralmente têm uma taxa de cura espontânea alta. Entretanto, aproximadamente 6% a 20% das PTMT não cicatrizam adequadamente, nelas perfurações persistentes resultam de cicatrização anormal,¹⁻³ a qual previamente considerava-se como sendo a cicatrização atrófica e formação de crostas. Ausência ou fragilidade da camada fibrosa (isto é, quando apenas uma camada epitelial está presente) em uma membrana timpânica cicatrizada é caracterizada como cicatrização atrófica (fig. 1) e perfurações cobertas por uma crosta fina e fragmentada são consideradas como cicatrização com formação de crosta (fig. 2).^{4,5} Embora a perfuração esteja fechada em alguns casos, a morfologia da membrana timpânica cicatrizada na área perfurada é diferente daquela da membrana timpânica normal.³ À medida que a membrana timpânica cicatriza, exibe um tecido acastanhado espesso, não representativo da morfologia normal da membrana timpânica. Uma linha de demarcação fica evidente entre a membrana timpânica cicatrizada e a remanescente e o tecido espesso (a cor é acastanhada e, portanto, é chamada de tecido acastanhado, por conveniência, no estudo); parece se estender até a perfuração, que podemos definir como pseudocicatrização da membrana timpânica (fig. 3). As características clínicas e as abordagens de tratamento para a pseudocicatrização da PTMT não foram bem caracterizadas, devido ao número limitado de casos e curtos períodos de seguimento de estudos clínicos anteriores.

A pseudocicatrização aumenta o peso da membrana timpânica devido ao espessamento do tecido, afeta a movimentação da membrana e a condução sonora, resulta em sintomas de zumbido, plenitude auricular e, em alguns casos, perda auditiva condutiva leve. Além disso, as perfurações ainda permanecem quando o tecido espesso da pseudocicatrização da membrana timpânica é removido. A excisão da borda perfurada, combinada com o tratamento por enxerto e miringoplastia, já foi feita anteriormente para corrigir perfurações remanescentes.^{1,2} Entretanto, a miringoplastia é um procedimento caro e pode apresentar efeitos colaterais.^{1,2}

Fatores de crescimento têm sido usados no reparo de PTMT crônicas nos últimos anos. Kanemaru et al.⁶ sugeriram que o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) permitiu a regeneração da PTMT crônica sem procedimentos cirúrgicos convencionais. O fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *Epidermal Growth Factor*), um polipeptídeo mitogênico de 53 aminoácidos presente em muitas espécies de mamíferos, é um dos vários fatores de crescimento que têm sido investigados por seu potencial para agilizar o processo de cicatrização.⁷ Estudos experimentais e clínicos recentes demonstraram que o EGF melhora a taxa de fechamento das PTMT humanas e PTMT crônicas experimentais, sem efeitos prejudiciais na orelha média ou interna.⁸⁻¹¹ Entretanto, Ramsay et al.¹² descobriram que o EGF não era eficaz para as PTMT crônicas humanas. Este estudo descreve as características clínicas da pseudocicatrização da membrana timpânica e avalia os efeitos do uso do EGF sobre as PTMT que apresentam pseudocicatrização.

Método

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Yiwu Central Hospital (n° 20091206). O consentimento informado foi obtido de todos os participantes.

Os participantes do estudo foram recrutados entre pacientes consecutivos diagnosticados com PTMT, oriundos do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, no Yiwu Central Hospital, entre janeiro de 2010 e dezembro de 2016. Os critérios de inclusão foram: 1) PTMT havia mais de 3 meses e 2) Nenhuma evidência de perfuração, mas com a presença de tecido espessado acastanhado na membrana timpânica cicatrizada, sem a aparência morfológica da membrana timpânica normal. Idade, sexo, data e causa da lesão traumática, tamanho do PTMT e presença ou ausência de otorreia foram registrados no momento da consulta.

Todos os pacientes foram examinados com um endoscópio após limpeza de cerúmen ou coágulos sanguíneos do canal auditivo externo (CAE) com um cotonete embebido em solução iodopovidona e o local e o tamanho da perfuração foram documentados. Os critérios para a pseudocicatrização da membrana timpânica foram: área perfurada coberta por tecido acastanhado e espesso, ausência de morfologia da membrana timpânica normal, linha divisória clara entre a membrana timpânica cicatrizada e a remanescente e observação de perfuração após a excisão do tecido acastanhado espesso (fig. 3). Uma solução de EGF foi aplicada a todos os pacientes durante o tratamento.

Método técnico

O CAE foi limpo com um cotonete embebido em solução iodopovidona. Uma mecha de algodão umedecida em 4% (p/v) de lidocaína foi colocada na superfície da membrana timpânica três vezes por 5 minutos de cada vez e então o tecido acastanhado espesso foi removido com uma micropinça por endoscopia, mas a borda perfurada não foi removida e nenhum material de suporte foi usado. Aproximadamente 0,1 a 0,15 mL (ou 2 a 3 gotas) de solução de EGF bovino recombinante (21.000 UI/5 mL; Yi Sheng, Yi Sheng, Zhuhai City, Guangdong Province, China) foram subsequentemente aplicados à membrana timpânica ao longo do CAE. Gotas de EGF foram autoadministradas pelo paciente uma vez ao dia para manter a membrana timpânica úmida, os pacientes foram aconselhados a proteger as orelhas contra a água.

Todos os pacientes foram acompanhados duas vezes por semana até a perfuração ter cicatrizado completamente ou até seis meses após o tratamento. As gotas de EGF foram autoadministradas pelos pacientes em casa, conforme instruções recebidas, até que o fechamento completo da perfuração fosse confirmado por um médico. O médico também determinou se a autoadministração do EGF pelos pacientes era adequada e verificou se otorreia purulenta havia se desenvolvido em 2 a 3 dias após o início do tratamento. A dose das gotas foi ajustada conforme necessário para manter a membrana timpânica úmida (isto é, não excessivamente molhada ou seca). Os pacientes foram aconselhados a interromper a administração das gotas se os sintomas desaparecessem. Gotas otológicas de amoxi-

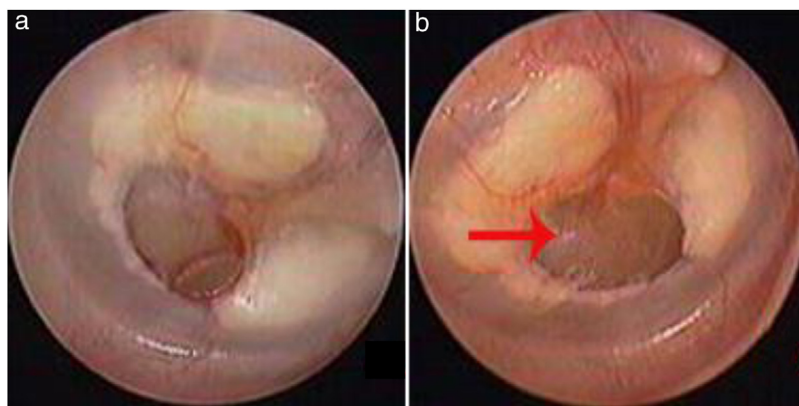


Figura 1 Cicatrização espontânea da perfuração traumática de membrana timpânica: 3 dias após a perfuração (a), cicatrização atrófica (b). As setas vermelhas indicam tímpano atrófico.

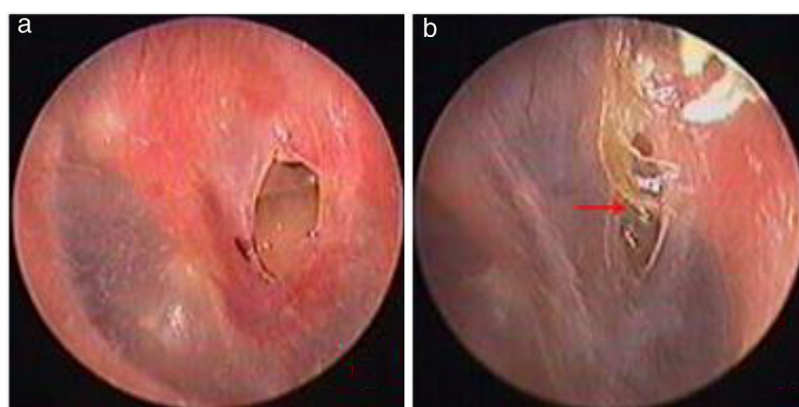


Figura 2 Cicatrização espontânea da perfuração traumática de membrana timpânica: 3 dias após a perfuração (a), cicatrização com crosta (b). As setas vermelhas indicam a crosta.

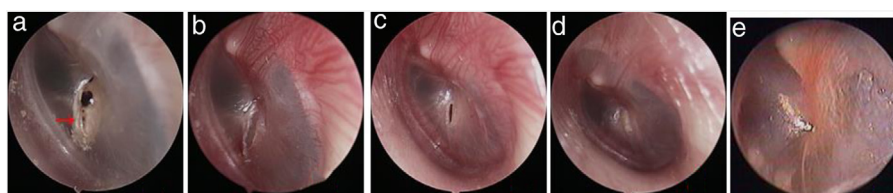


Figura 3 Pseudocicatrização da perfuração traumática de membrana timpânica e tratamento com fator de crescimento epidérmico (EGF): pseudocicatrização do tímpano 5 meses após a perfuração (a), uma perfuração foi observada após tecido acastanhado espesso ter sido removido (b), 4 dias após o tratamento com EGF (c), 10 dias após o tratamento com EGF (d), 2 meses após o tratamento com EGF (e). As setas vermelhas indicam que o tecido acastanhado espesso fechou a perfuração.

cilina e ofloxacina foram administradas simultaneamente na presença de otorreia purulenta. Para reduzir o viés clínico, o fechamento da membrana timpânica e o desenvolvimento de otorreia foram fotodocumentados (através de fotografias coloridas) a cada visita de seguimento.

Avaliação pós-tratamento

Todos os pacientes foram submetidos a um teste de tons puros e timpanometria nas consultas inicial e final, ou 6 meses após o tratamento. Os audiogramas de tons puros foram obtidos em uma sala silenciosa com um audiômetro (Genemed Synthesis, Inc., San Antonio, TX, EUA), inclusive

determinação dos limiares aéreos e ósseos de tons puros. O *gap* aéreo-ósseo (GAO) médio foi calculado em 0,5, 1, 2 e 4 kHz. Os dados foram analisados estatisticamente com o teste *t* pareado (comparação de médias). O teste do χ^2 foi usado para dados categóricos do timpanograma. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como indicador de significância estatística.

Resultados

No total, 26 pacientes com média de idade de $34,6 \pm 12,8$ anos (variação: 22-61) foram tratados. Dos 26 pacientes, 9 eram do sexo masculino e 17 do feminino e a duração

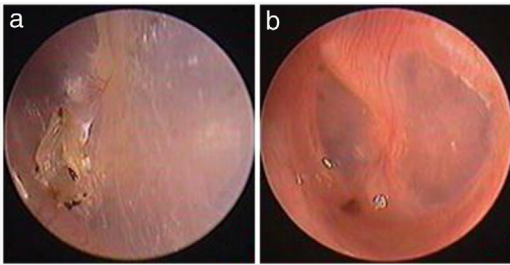


Figura 4 Pseudocicatrização de perfuração traumática de membrana timpânica e tratamento com fator de crescimento epidérmico (EGF): pseudocicatrização do tímpano 2 meses após a perfuração, mostra tecido acastanhado espesso e uma perfuração em forma de punção (a), uma semana após o tratamento com EGF (b).

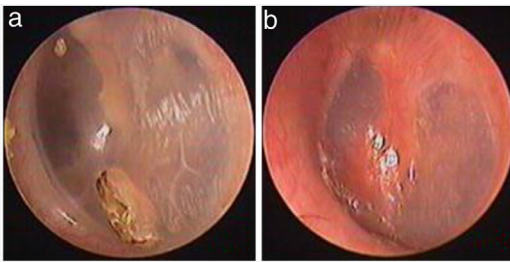


Figura 5 Pseudocicatrização da perfuração traumática de membrana timpânica e tratamento com fator de crescimento epidérmico (EGF): pseudocicatrização do tímpano 2 meses após a perfuração, mostra tecido acastanhado espesso e uma perfuração em forma de punção (a), 10 dias após o tratamento com EGF (b).

média do tratamento foi de $7,78 \pm 1,48$ meses (variação: 5 a 11). Dos 26 pacientes, 25 perfurações foram causadas por um tapa ou agressão na orelha, enquanto uma perfuração foi causada durante a prática de basquete. Nenhum caso de otorreia foi observado nos 26 pacientes. Quatro dos 26 pacientes apresentavam uma borda perfurada envolta por tecido acastanhado espesso, bem como uma perfuração em fresta, na endoscopia (figs. 4 e 5). Nos outros 22 pacientes, o tecido acastanhado espesso cobria a área perfurada de tal modo que nenhuma perfuração era visível. A perfuração foi observada quando o tecido acastanhado espesso foi removido e não houve sangramento ou congestão na borda da perfuração. Perfurações médias ($1/8$ a $1/4$ da membrana timpânica) foram encontradas em 15 pacientes e pequenas perfurações (menos de $1/8$ da membrana timpânica) foram encontradas em 11 pacientes. O teste de tons puros demonstrou que o limiar de condução óssea era normal nos 26 pacientes. O limiar de condução aérea foi medido em 0 a 10 dB em 23 pacientes e 10 a 20 dB em 3 pacientes. A tim-

panometria classificou 19 pacientes como tipo A, tipo C em 2 pacientes e 5 pacientes como tipo B antes de o tecido espesso ser removido da membrana timpânica.

Dois pacientes foram perdidos durante o seguimento de 6 meses e, portanto, foram excluídos. A análise final incluiu 24 pacientes neste estudo. Das 24 perfurações restantes, os pacientes não desenvolveram otorreia purulenta na orelha média, a taxa de fechamento foi de 100% (24/24) e o tempo médio de fechamento foi de $6,1 \pm 2,3$ dias (variação: 3 a 12 dias). Os sintomas antes e após o tratamento são mostrados na tabela 1; dos 24 pacientes, o zumbido não foi resolvido em um paciente, enquanto esses sintomas no primeiro atendimento foram resolvidos em 23 pacientes. A morfologia da membrana timpânica cicatrizada não diferiu da membrana timpânica normal (fig. 3). Todos os pacientes precisaram de apenas um frasco de gotas de EGF, a um custo de 25 RMB (aproximadamente \$3,7). Além disso, a taxa média de melhoria no GAO de $11,3 \pm 4,5$ dB na consulta inicial para $9,8 \pm 3,3$ dB aos 6 meses pós-tratamento não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$); entretanto, a timpanometria indicou que todos os 24 pacientes eram do tipo A 6 meses após o tratamento. Não foram observadas complicações graves relacionadas ao EGF, como dor, vertigem grave, infecção ou hiperplasia do CAE, durante o processo de tratamento.

Discussão

As PTMT tendem a cicatrizar espontaneamente. No entanto, algumas perfurações resultam em má cicatrização da membrana timpânica, o que subsequente afeta a condução sonora. No presente estudo, a pseudocicatrização da membrana timpânica ocorreu porque a PTMT foi coberta por tecido espesso, que foi confundido com cicatrização normal no espelho frontal de otorrino. A pseudocicatrização da membrana timpânica difere da formação de crosta e da cicatrização atrófica.

A membrana timpânica consiste em uma camada epitelial, fibrosa e mucosa. A camada epitelial inclui epitélio escamoso, estrato córneo e uma membrana basal. Duas teorias foram propostas sobre o mecanismo de cicatrização espontânea da membrana timpânica. Na primeira teoria, a perfuração é fechada por queratina, que é produzida pela camada epitelial na maioria dos casos, seguida pela proliferação das camadas epitelial e fibrosa.¹³⁻¹⁶ O estrato córneo é a camada mais importante da epiderme em relação ao fechamento da perfuração; os produtos da queratina também desempenham um papel importante na cicatrização espontânea.¹³ A perfuração é primeiramente fechada pela proliferação do tecido conjuntivo e pode subsequente ser reepitelizada.^{17,18} Lou et al.¹⁹ acreditam que a membrana timpânica cica-

Tabela 1 Sintomas antes e depois do tratamento em 24 pacientes

Sintomas	Pré-tratamento, n (%)	Pós-tratamento, n (%)
Desconforto auditivo	22 (91,7%)	0 (0,0%)
Plenitude aurial	7 (29,2%)	0 (0,0%)
Zumbido	8 (33,3%)	1 (4,2%)

trizada exibe diferentes padrões de formação de tecido de granulação e migração da proliferação do epitélio em perfurações secas e úmidas; a cicatrização inicia-se com a migração fisiológica do epitélio em proliferação em condições secas e com a formação de tecido de granulação em ambientes úmidos. Lou et al.^{20,21} descobriram que a cicatrização de perfurações secas provoca a migração de células epiteliais para fora e a formação de crostas, o que impede a cicatrização da perfuração e prolonga o tempo de cicatrização. A má cicatrização da membrana timpânica ocorre principalmente em perfurações secas. A cicatrização com formação de crosta pode ser caracterizada por epitélio hiperplásico, detritos descamados de queratina e células gigantes de corpo estranho.^{14,22} A membrana timpânica tem menor probabilidade de cicatrizar completamente na ausência de queratina e camadas fibrosas, ou seja, quando a perfuração é coberta apenas por tecido fino e com crostas irregulares. Uma membrana timpânica atrófica é caracterizada por camadas epiteliais e de queratina normais, sem camada fibrosa. O mecanismo da pseudocicatrização da membrana timpânica ainda não está claro.

Os produtos de queratina desempenham um papel vital no processo de cicatrização em perfurações secas.¹³ Especulamos que a cicatrização através da formação de crosta resulta da migração externa do epitélio hiperplásico, ou pela hiperatividade do epitélio e diminuição da atividade da camada de queratina. Johnson et al.²³ acreditam que é menos provável que a extensa quebra do estrato córneo facilite a cicatrização da PTMT. No entanto, a pseudocicatrização da membrana timpânica pode resultar da fraca proliferação da camada epitelial. A hiperatividade da camada de queratina resultou em acúmulo excessivo de queratina, fechou assim a perfuração; entretanto, as camadas epiteliais e fibrosas normais não estavam presentes. De outro modo, a excessiva epitelização da camada de queratina poderia ter inibido o remodelamento da membrana timpânica durante o processo de cicatrização. Gladstone et al.²⁴ acreditam que a epitelização excessiva da camada de queratina não é propícia para a cicatrização da perfuração. Boedts et al.²⁵ relataram que o acúmulo excessivo de produtos de queratina perturbou a migração epitelial devido à pressão mecânica e, assim, impediu o fechamento da perfuração. Entretanto, os mecanismos exatos da pseudocicatrização da membrana timpânica requerem um estudo mais aprofundado.

A cicatrização do tímpano envolve a recuperação de estruturas anatômicas normais e a condução sonora adequada. A arquitetura normal e as propriedades físicas das membranas timpânicas são de vital importância para a audição.²⁶ A pseudocicatrização da membrana timpânica envolve a perda da morfologia da membrana timpânica normal e o aumento do peso da membrana timpânica. Isso resulta em hipoenergia da membrana timpânica e redução da condução sonora e da vibração da membrana timpânica. No presente estudo, a timpanometria identificou pacientes do tipo A e B com pseudocicatrização da membrana timpânica e os audiogramas de tons puros demonstraram audição normal ou perda auditiva condutiva leve. No entanto, todas as 24 perfurações com pseudocicatrização no presente estudo alcançaram o fechamento completo, com um tempo médio de fechamento de $6,1 \pm 2,3$ dias após o tratamento com EGF. Kanemaru et al.⁶ trataram

53 PTMT crônicas com b-FGF e a taxa de fechamento alcançou 98,1% (52/53) dos casos. Estudos experimentais anteriores sugeriram que o EGF facilita a proliferação e migração de células epiteliais, bem como a regeneração de capilares sanguíneos. Diferentes fenótipos de margem de perfuração podem influenciar a afinidade dos fatores de crescimento por diferentes tipos de células durante o processo de cicatrização. Um estudo anterior²⁷ demonstrou que o fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF2) tem preferência pela camada fibrosa, induz a proliferação de fibroblastos e regula a reação do tecido conjuntivo durante o estágio de proliferação; enquanto o EGF estimula a camada epitelial e promove a proliferação e migração de células epiteliais e queratinócitos durante o estágio de proliferação. Assim, as características do EGF aborçam o defeito da regeneração epitelial mais fraca e a forte diferenciação do estrato córneo para a perfuração com pseudocicatrização. Isso promove a pseudocicatrização para alcançar até atingir uma cicatrização normal. Ramsay et al.¹² acreditam que o EGF não melhora o fechamento de PTMT crônicas em humanos. Eles enfatizam que a borda perfurada deve ser removida para produzir uma ferida nova e, assim, melhorar a taxa de fechamento de PTMT crônicas.¹² No presente estudo, o tecido acastanhado espesso foi removido e uma nova margem perfurada foi formada antes do tratamento com EGF, o que está de acordo com o princípio terapêutico de Ramsay et al.¹² A destruição das estruturas da microcirculação da borda perfurada e aplicação tópica de EGF podem induzir novas respostas inflamatórias, que estimulam a cicatrização normal da membrana timpânica e a revascularização.^{8,22} Além disso, a aplicação tópica de EGF pode resultar em uma borda de perfuração úmida e facilitar a proliferação do tecido de granulação, acelera assim a cicatrização da perfuração.^{17,18} Embora a cirurgia sem o uso do EGF possa produzir um índice maior de fechamento, a cirurgia necessita de anestesia e é um procedimento invasivo. Observamos que a pseudocicatrização das perfurações neste estudo foi diferente daquela das perfurações crônicas com otite média crônica supurativa (OMCS). A presença de OMCS em PTMT crônicas atenua a cicatrização da membrana timpânica, na qual inflamação recorrente da orelha média e bacteriotoxinas inibem mecanismos endógenos de cicatrização, de modo que a hiperplasia cicatricial do tecido conjuntivo fibroso denso se manifesta na borda da perfuração.^{24,28}

Acreditamos que a excisão de tecido acastanhado espesso e a aplicação tópica de EGF apenas auxiliou e guiou o processo normal de cicatrização da membrana timpânica. Além disso, a toxicidade do EGF foi investigada e estudos anteriores mostraram que o EGF não causou risco aparente de ototoxicidade na aplicação tópica de EGF na orelha externa e média.^{7,9,11} Estudos clínicos recentes demonstraram que nem a perda auditiva neurosensorial nem a estenose do canal auditivo externo resultaram da aplicação de EGF em curto prazo nas perfurações da membrana timpânica.^{8,12,27,29} Embora estudos em animais tenham demonstrado que a aplicação contínua de EGF resultou no desenvolvimento de colesteatoma da orelha média,¹⁰ no presente estudo a dose de aplicação foi de apenas $0,1 \pm 0,15$ mL uma vez ao dia para manter a membrana timpânica úmida, o tempo de aplicação foi de 3 a 12 dias, menor do que o tempo de aplicação de 6 semanas relatado em estudo experimental anterior.

Não foram observadas complicações graves relacionadas ao uso do EGF durante o processo de tratamento usado neste estudo.

Limitações

Houve várias limitações para o presente estudo, como o pequeno tamanho da amostra, a ausência do grupo controle com solução salina; além disso, não foram feitos exames histológicos no tecido acastanhado espesso que cobria as perfurações. Estudos futuros devem ser feitos para caracterizar ainda mais a pseudocicatrização de PTMT. Além disso, seria interessante acompanhar os pacientes não tratados com EGF para verificar se os seus resultados melhoram ao longo do tempo e compará-los aos pacientes tratados.

Conclusão

Embora a pseudocicatrização de PTMT em humanos seja rara, ela pode afetar a condução do som na membrana timpânica, resulta em sintomas como zumbido, plenitude aurial e desconforto auditivo. A aplicação tópica de EGF é um tratamento simples, conveniente, de baixo custo (apenas cerca de \$3,7) e não invasivo, que poderia melhorar a taxa de fechamento das perfurações e mostrar pseudocicatrização e, assim, alcançar a morfologia normal da membrana timpânica.

Financiamento

Este estudo recebeu apoio da Agência de Ciência e Tecnologia da Província de Zhejiang, China (Concessão nº 2013C33176).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Orji FT, Agu CC. Determinants of spontaneous healing in traumatic perforations of the tympanic membrane. *Clin Otolaryngol.* 2008;33:420–6.
- Lou ZC, Lou ZH, Zhang QP. Traumatic tympanic membrane perforations: a study of etiology and factors affecting outcome. *Am J Otolaryngol.* 2012;33:549–55.
- Stenfors LE, Carlsöö B, Salén B, Winblad B. Repair of experimental tympanic membrane perforations. *Acta Otolaryngol.* 1980;90:332–41.
- Reijnen CJ, Kuijpers W. The healing pattern of the drum membrane. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1971;287:1–74.
- Santa Maria PL, Redmond SL, Atlas MD, Ghassemifar R. Histology of the healing tympanic membrane following perforation. *Laryngoscope.* 2010;120:2061–70.
- Kanemaru S, Umeda H, Kitani Y, Nakamura T, Hirano S, Ito J. Regenerative treatment for tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol.* 2011;32:1218–23.
- Santa Maria PL, Redmond SL, Atlas MD, Ghassemifar R. The role of epidermal growth factor in the healing tympanic membrane following perforation in rats. *J Mol Histol.* 2010;41:309–14.
- Lou ZC, Yang J, Tang Y, Fu YH. Topical application of epidermal growth factor with no scaffold material on the healing of human traumatic tympanic membrane perforations. *Clin Otolaryngol.* 2016;41:744–9.
- Ramalho JR, Bento RF. Healing of subacute tympanic membrane perforations in chinchillas treated with epidermal growth factor and pentoxifylline. *Otol Neurotol.* 2006;27:720–7.
- Dvorak DW, Abbas G, Ali T, Stevenson S, Welling DB. Repair of chronic tympanic membrane perforations with long-term epidermal growth factor. *Laryngoscope.* 1995;105:1300–4.
- Amoils CP, Jackler RK, Lustig LR. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992;107:669–83.
- Ramsay HA, Heikkonen EJ, Laurila PK. Effect of epidermal growth factor on tympanic membranes with chronic perforations: a clinical trial. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;113:375–9.
- Johnson AP, Smallman LA, Kent SE. The mechanism of healing of tympanic membrane perforations. A two-dimensional histological study in guinea pigs. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1990;109:406–15.
- Makino M, Amatsu M, Kinishi M, Mohri M. Epithelial migration in the healing process of tympanic membrane perforations. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1990;247:352–5.
- Araújo MM, Murashima AA, Alves VM, Jamur MC, Hyppolito MA. Spontaneous healing of the tympanic membrane after traumatic perforation in rats. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2014;80:330–8.
- Wang WQ, Wang ZM, Chi FL. Spontaneous Healing of Various Tympanic Membrane Perforations in the rat. *Acta Otolaryngol.* 2004;124:1141–4.
- Reeve DR. Repair of large experimental perforations of the tympanic membrane. *J Laryngol Otol.* 1977;91:767–78.
- Martini A, Govoni E, Beghi A, Fontana M, Lini E, Marini P, et al. Spontaneous reparation of post-traumatic tympanic perforation: an experimental study in rats. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 1990;10:559–77.
- Lou ZC, Tang YM, Yang J. A prospective study evaluating spontaneous healing of aetiology, size and type-different groups of traumatic tympanic membrane perforation. *Clin Otolaryngol.* 2011;36:450–60.
- Lou ZC. Spontaneous healing of traumatic tympanic membrane perforation: outward epithelial cell migration and clinical outcome. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;147:1114–9.
- Lou Z. Late crust formation as a predictor of healing of traumatic, dry, and minor-sized tympanic membrane perforations. *Am J Otolaryngol.* 2013;34:282–6.
- Somers T, Houben V, Goovaerts G, Goovaerts PJ, Offeciers FE. Histology of the perforated tympanic membrane and its mucoc-epithelia junction. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1997;22:162–6.
- Johnson A, Hawke M. The Function of Migratory Epidermis in the Healing of Tympanic Membrane Perforations in Guinea-pig: A Photographic Study. *Acta Otolaryngol.* 1987;103:81–6.
- Gladstone HB, Jackler RK, Varav K. Tympanic membrane wound healing An overview. *Otolaryngol Clin North Am.* 1995;28:913–32.
- Boedts D. The tympanic epithelium in normal and pathological conditions. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 1978;32:295–419.
- Rahman A, Hultcrantz M, Dirckx J, Margolin G, von Unge M. Fresh Tympanic Membrane Perforations Heal Without Significant Loss of Strength. *Otol Neurotol.* 2005;26:1100–6.
- Zhengcai-Lou, Zihan-Lou M. Yongmei-Tang. Comparative study on the effects of EGF and bFGF on the healing of human large traumatic perforations of the tympanic membrane. *Laryngoscope.* 2016;126:E23–8.
- Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg.* 1993;166:74–81.
- Lou ZC, Lou Z. Efficacy of EGF and Gelatin Sponge for Traumatic Tympanic Membrane Perforations: A Randomized Controlled Study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2018;159:1028–36.