

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Medicina Ciências Cirúrgicas

**Uso de esquilos da Mongólia como modelo experimental para estudo do
colesteatoma**

Jefferson André Bauer

Porto Alegre, 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Medicina Ciências Cirúrgicas

**Uso de esquilos da Mongólia como modelo experimental para estudo do
colesteatoma**

Jefferson André Bauer

Orientador: Prof Dr Sady Selaimen
da Costa

Dissertação apresentada como re-
quisito parcial para obtenção do tí-
tulo de Mestre no Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ci-
ências Cirúrgicas, Faculdade de
Medicina, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2018

Agradecimentos

Ao meu amor, Caroline Queiroz Machado Carrion, por me trazer felicidade e querer ser sempre uma pessoa melhor, pela parceria constante e suporte irrestrito durante a realização desse trabalho. Aos meus pais, Waldir Nivaldo Bauer e Rosa Maria Dyba Bauer, e irmã, Scheila Mara Bauer, pelos ensinamentos, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos.

Aos funcionários da unidade de experimentação animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Marta Cioato, por toda a ajuda e dedicação neste projeto, desde o seu início. Agradeço, também, aos funcionários da unidade de patologia experimental.

Ao meu orientador, Sady Selaimen da Costa, por todo o aprendizado, empenho e esforço para que este trabalho pudesse se tornar realidade. Ao meu coorientador, Maurício Noschang Lopes da Silva, pelo apoio, ensinamentos e amizade, não apenas nesse trabalho, mas em toda minha formação. À Letícia Petersen Schmidt Rosito, pela dedicação e suporte a esse grupo de pesquisa.

Aos meus colegas e amigos, Felipe da Costa Huve, Fábio Andre Selaimen e João Augusto Bergamaschi, pela ajuda e parceria cotidiana e ao longo da realização desse trabalho.

À Deus, que sempre me guia e conduz para os caminhos corretos.

Sumário

Lista de abreviaturas	5
Lista de figuras	6
Lista de tabelas	7
Introdução	8
Revisão da Literatura	21
Objetivos	22
Métodos	23
Delineamento	35
Desfechos	36
Referências Bibliográficas	37
Artigo em Português.....	45
Resumo.....	45
Introdução	46
Métodos	49
Resultados	58
Discussão	62
Conclusão	68
Referências Bibliográficas.....	69
Article in English.....	77
Abstract.....	77
Introduction	78
Methods	80
Results	89
Discussion.....	94
Conclusion	99
References.....	100
Considerações finais	108
Perspectivas.....	109

Lista de abreviaturas

OMC – otite média crônica

OMCC – otite média crônica colesteatomatosa

OMCNC – otite média crônica não-colesteatomatosa

MT – membrana timpânica

OCL – orelha contralateral

OCLs – orelhas contralaterais

CAE – conduto auditivo externo

PCR – reação em cadeia da polimerase

UEA – unidade de experimentação animal

HCPA – hospital de clínicas de Porto Alegre

CEUA – comissão de ética no uso de animais

EDTA - ácido etileno-diamino-tetracético

VPP – valor preditivo positivo

VPN – valor preditivo negativo

Lista de figuras

Figura 1 – alojamento;

Figura 2 – caixa moradia;

Figura 3 – fluxograma;

Figura 4 – otoendoscopia;

Figura 5 – anestesia inalatória;

Figura 6 – inserção do eletrocautério transpalatal;

Figura 7 - inserção do eletrocautério transpalatal;

Figura 8 – posicionamento;

Figura 9 – visão otoendoscópica;

Figura 10 – osso temporal – visão superior;

Figura 11 – osso temporal – visão lateral;

Figura 12 – histologia – osso normal;

Figura 13 – colesteatoma;

Figura 14 – colesteatoma;

Figura 15 – colesteatoma grau 1;

Figura 16 – colesteatoma grau 2;

Figura 17 – colesteatoma grau 3;

Figura 18 – colesteatoma grau 4;

Figura 19 – membrana timpânica normal;

Figura 20 – granuloma de colesterol;

Figura 21 – otoscopia normal;

Figura 22 – otite média secretora com espessamento e hiperemia da pars flácida;

Figura 23 – retração pars flácida;

Figura 24 – retração pars flácida;

Lista de tabelas

Tabela 1 – linha de base;

Tabela 2 – colesteatoma pela histologia;

Tabela 3 – classificação do colesteatoma pela histologia;

Tabela 4 – colesteatoma em graus avançados

Tabela 5 – colesteatoma pela otoendoscopia;

Tabela 6 – tempo até formação do colesteatoma

Tabela 7 – teste diagnóstico;

Introdução

Em 1959, *Friedmann* definiu a otite média crônica colesteatomatosa como estruturas císticas revestidas por epitélio escamoso estratificado, apoiado sobre um estroma fibroso de espessura variável. Já *Schuknecht* (1974), de forma mais objetiva, caracteriza essa patologia pela presença de queratina esfoliada dentro da orelha média ou de qualquer área pneumatizada do osso temporal, originada a partir de um epitélio escamoso queratinizado. Mais recentemente, *Ferlito et al* (1997) caracterizam o colesteatoma como um cisto epidermóide, de crescimento independente e progressivo, com destruição dos tecidos adjacentes, em especial o tecido ósseo.

Ainda que não haja dados epidemiológicos nacionais, sabemos que o colesteatoma é uma doença pouco frequente. Possui uma incidência anual aproximada de 3/100.000 em crianças e 9/100.000 em adultos (*Tos*, 1989; *Quantin et al*, 2002), com uma preferência pela etnia caucasiana, seguido pelos afrodescendentes. Além disso, parece incidir de forma semelhante entre as classes socioeconômicas⁵¹.

O colesteatoma geralmente cursa com quadros clínicos insidiosos, porém progressivos e que geram, no decorrer de vários anos, elevados custos aos sistemas de saúde e necessidades repetidas de tratamentos clínicos e cirúrgicos. Possui alta morbidade associada, cursando frequentemente com perda auditiva e secreção purulenta com odor caracteristicamente fétido, ocasionando grandes obstáculos para o convívio social, especialmente ao nos referirmos à população pediátrica. Em estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa⁴⁶, o qual incluiu apenas crianças e adolescentes, demonstramos que as diferenças aéreoósseas

(*gap*) eram significativamente maiores nos pacientes com diagnóstico de colesteatoma em comparação aos que apresentavam perfuração da membrana timpanica⁴⁶. Além disso, graves complicações dentro do osso temporal ou de estruturas vizinhas podem ocorrer, como fístulas labirínticas ou liquóricas, paralisias do nervo facial, tromboflebite do seio lateral, meningite, abscesso cerebral; estas últimas, sobretudo, condições de altíssima morbimortalidade que frequentemente resultam em desfechos catastróficos^{38,39}.

Possui o tratamento cirúrgico como modalidade terapêutica fundamental, cujo objetivo principal é a eliminação completa da doença, oferecendo estabilidade a uma orelha anteriormente secretante e claramente insegura. De maneira secundária, mas não menos importante, a cirurgia ambiciona a preservação ou até mesmo melhora funcional do complexo timpanossicular, possibilitando uma recuperação auditiva parcial com elevada frequência. Múltiplas técnicas cirúrgicas já foram utilizadas com essa finalidade, contudo, as mais relevantes consistem em timpanomastoidectomias que, de acordo com a remoção da parede posterior do conduto, podem ser classificadas em abertas ou fechadas. Essa decisão apoia-se em alguns fatores relacionados à própria doença e também ao paciente, como extensão do colesteatoma, complicações, malformações associadas, nível auditivo, funcionamento da tuba auditiva e pneumatização da mastoide^{17,32,40}.

Apesar dos aperfeiçoamentos sucedidos nos métodos diagnósticos e no instrumental cirúrgico, que inquestionavelmente contribuem para a melhora dos resultados obtidos no tratamento do colesteatoma, sabemos que, dessa forma, estamos agindo apenas em estágios tardios desse processo evolutivo quando, muitas vezes, os danos já se tornaram significativos e irreversíveis. Ponderando

isso, os esforços precisam concentrar-se na tentativa de interromper essa patogênese em estágios mais precoces, preferencialmente antes do surgimento da doença. Contudo, somente alcançaremos esse objetivo avançando na compreensão dos intrincados mecanismos de desenvolvimento do colesteatoma e de sua fisiopatologia, que conduzem uma orelha saudável em direção a um ambiente inflamatório, infeccioso e com risco potencial à vida.

Revisão da Literatura

Patogênese do colesteatoma:

Buscando elucidar a patogênese que envolve o desenvolvimento do colesteatoma, diversas teorias foram propostas ao longo dos últimos séculos, como veremos brevemente a seguir:

Congênita: *Korner e Virchow* (1863) propuseram que todos os colesteatomas surgiriam a partir de células epiteliais que se multiplicariam até a formação de grandes massas epiteliais. Essa teoria ganhou força na segunda metade do século XX com a descrição de casos em que jovens apresentavam colesteatomas de orelha média com membrana timpânica íntegra, sugerindo que teriam se originado a partir de restos embrionários.

Implantação: proposta por *Schöer* em 1958, fundamenta-se na inserção de células epiteliais diretamente na orelha média, seja de forma traumática ou de maneira iatrogênica em procedimentos cirúrgicos. Por tratar-se de mastoides muitas vezes bem pneumatizadas, costumam apresentar-se como massas epiteliais de grandes dimensões.

Metaplasia: descrita inicialmente por *Wendt* em 1873 e depois corroborada por *Sadé* em 1979, baseia-se na observação de que o epitélio respiratório pode sofrer metaplasia escamosa quando exposto a um agente traumático, como uma inflamação crônica.

Migração epitelial: *Habermann e Bezold* (1889) postularam uma teoria, tida por muitos investigadores como o mecanismo mais comum envolvido no desenvolvimento dos colesteatomas, que se caracteriza pela migração de epitélio escamoso do conduto auditivo externo para a fenda auditiva, por meio de uma comunicação através da membrana timpânica, que poderia ser uma retração ou uma perfuração marginal. Nesse caso, ocorre uma inversão do fluxo epitelial, que normalmente ocorre do umbus do martelo em direção ao conduto auditivo externo.

Retração: *Bezold* (1908) descreveu uma teoria relacionando a disfunção da tuba auditiva com a formação do colesteatoma, chamada de teoria da invaginação. A alteração da função tubária geraria uma pressão negativa dentro da orelha média, efusão e retração da membrana timpânica, principalmente em sua parte flácida, o que resultaria, após estímulo infeccioso e inflamatório, no desenvolvimento do colesteatoma.

Em nosso grupo de pesquisa, entendemos que a teoria da invaginação timpânica possivelmente seja a mais operacional. Evidências clínicas e experimentais^{2,31,32,33,34} demonstram que a evolução desta patologia seguiria uma sequência de retração timpânica, posterior progressão desta retração com perda de sua propriedade de autolimpeza, acúmulo de queratina e formação do colesteatoma. *Cassano et al* (2010)⁵², em estudo que incluiu 40 orelhas de crianças com retrações timpânicas não submetidas a nenhum tratamento, observaram,

após dois anos de seguimento, a progressão de retrações severas para colesteatoma em 20% dos casos⁵².

Alguns estudos clínicos, no entanto, têm falhado em demonstrar essa evolução com exatidão⁴². Isso se deve, provavelmente, à baixa incidência desta patologia e dificuldade em garantir o seguimento desses pacientes durante longos períodos. *Sadé et al (1981)*⁴³, em uma coorte envolvendo 215 orelhas com retrações da membrana timpânica, observaram a incidência de colesteatoma em apenas uma orelha com bolsa de retração na pars tensa (2%) e em somente duas orelhas com retração moderada e severa na pars flácida (2%)⁴³. Esse estudo, entretanto, analisou retrações de diversos graus de severidade e com tempos de seguimento muito variáveis⁴³. Considerando esses obstáculos e buscando outros meios de explicar a história natural desta doença, a partir de 2008 iniciamos o estudo da orelha contralateral à otite média crônica como uma forma de inferirmos, de forma indireta, sobre os eventos sucedidos na orelha principal. Propôs-se isso ao averiguarmos que a anatomia, e mesmo a microanatomia, entre a orelha principal e a contralateral apresentam inúmeras características semelhantes, compartilham uma evolução embriológica comum e que estariam sujeitas a desencadeantes ambientais similares. Nesses experimentos, encontramos elevada prevalência de alterações na orelha contralateral analisando seus aspectos clínicos, histológicos, auditivos e radiológicos^{44,45,46,47}. Em trabalho conduzido por *Rosito et al (2018)*, pelo, 95,8% das alterações observadas na orelha contralateral consistiam em: retrações timpânicas, sinais otoscópicos que indicavam que aquela orelha havia tido uma retração previamente, ou ainda, clara evidência de progressão de uma retração, como o próprio colesteatoma. Esses achados revelam uma poderosa correlação entre os padrões de crescimento do

colesteatoma na orelha principal e os locais de retração da membrana timpânica na orelha contralateral e, portanto, sugerem que a invaginação da membrana timpânica seria um evento que, através de mecanismos ainda não completamente elucidados, precederia o desenvolvimento do colesteatoma. A disfunção da tuba auditiva ocasionando prejuízo na ventilação e consequente pressão negativa no interior da orelha média parece ser um fator causal importante. Estudos conduzidos em indivíduos com fenda palatina, excelente modelo para estudo da disfunção tubária, demonstram elevada prevalência de otite média crônica^{35,36,37} nessa população.

Entretanto, apesar de evidências clínicas sustentarem essa progressão de uma retração timpânica até a formação de um colesteatoma^{43,52}, persiste incerto o porquê de inúmeras retrações, muitas vezes severas, não apresentarem esse comportamento. Supostamente ocorram inúmeros gatilhos inflamatórios e infecciosos determinantes para que esse processo patológico evolua; contudo, esses questionamentos ainda carecem de um entendimento pleno. Dessa forma, desvendar os mecanismos envolvidos na patogênese do colesteatoma é fundamental para avançarmos em seu entendimento e, principalmente, capacitarmos a abortar seu processo evolutivo em estágios mais precoces. Segundo *Maniu et al* (2014)³⁰, no transcurso até a formação dessa doença ocorre, inicialmente, um acúmulo de queratinócitos e debris celulares dentro da bolsa de retração, seguido por uma migração de células imunes, células de Langerhans, células-T e macrófagos. A presença de um estímulo inflamatório induziria uma hiperproliferação epitelial com expressão de enzimas líticas e citocinas, as quais ativariam osteoclastos, contribuindo, assim, para a degradação da matriz óssea.

Considerando as diversas lacunas presentes na total compreensão do colesteatoma e a dificuldade em realizar estudos histológicos e com longo tempo de acompanhamento em humanos, experimentos com animais são conduzidos há várias décadas buscando esclarecer a fisiopatologia dessa intrigante doença. *Paparella et al (1970)*²³ obstruíram a tuba auditiva de macacos, desenvolvendo otite média. Esse experimento iniciou o estudo desses mecanismos em animais e fomentou a realização de diversos outros trabalhos nessa mesma área. A partir da década de 1980, alguns grupos de pesquisa deram início à utilização de espécies animais na busca por um modelo experimental que permitisse o desenvolvimento e o estudo do colesteatoma, como veremos a seguir.

Uso de outras espécies animais:

Em estudo realizado por *McGinn et al (1984)*¹³, buscaram induzir a formação de colesteatoma através da ligadura do conduto auditivo externo em gatos, porcos-da-índia (*guinea pigs*), hamsters e ratos. Observaram que em todas essas espécies havia descamação e discreto acúmulo de queratina no conduto auditivo externo. Porém, esse acúmulo não era progressivo e não evoluía com erosão óssea, mesmo após vários meses de acompanhamento. Presume-se que isso poderia estar relacionado, de fato, à lenta produção da queratina nessas espécies, condição que possibilitaria a autolimpeza do conduto auditivo externo e impediria a formação do colesteatoma. Conforme demonstrado por *Steinbach (1980)*⁴⁹, utilizando coelhos, obteve-se êxito no desenvolvimento de colesteatoma após a ligadura do CAE numa incidência de 33,3% após doze semanas de acompanhamento.

Alguns estudos utilizando porcos-da-índia (*guinea pigs*) foram realizados com sucesso. *Hinohira et al* (1994)²² retiraram tecido epitelial do conduto auditivo externo ou do pavilhão auricular de porcos-da-índia e implantaram na bula dos animais com desenvolvimento de colesteatoma em 89,3% dos casos, após 8 semanas de acompanhamento. *Antunes et al* (2008)²¹ obtiveram sucesso na indução de colesteatoma, também em porcos-da-índia, através da aplicação de propilenoglicol 100% diretamente no interior da bula dos animais, bilateralmente. Posteriormente, na tentativa de inibir o desenvolvimento da patologia, utilizaram ácido trans-retinoico no conduto auditivo externo direito e solução salina no CAE esquerdo, como controle. Evidenciaram a presença de doença em 25% das orelhas direitas, na qual utilizaram ácido trans-retinoico, em comparação com 85% nas orelhas esquerdas, com significância estatística. Esse estudo, portanto, demonstrou que o ácido trans-retinoico foi efetivo na inibição do colesteatoma em porcos-da-índia²¹.

Inúmeras outras espécies foram utilizadas como modelos animais para desenvolvimento e estudo do colesteatoma^{13,22,49}. No entanto, a grande maioria dos estudos falhou no desenvolvimento da doença ou apresentou baixíssima incidência desta, condição que dificulta ou até mesmo impossibilita seu uso para fins experimentais. Porém, dentre essas espécies aventadas, os esquilos da Mongólia merecem destaque.

Esquilos da Mongólia (*Mongolian gerbils*):

Os esquilos da Mongólia são roedores, fisicamente similares aos hamsters, que apresentam uma peculiar propensão ao desenvolvimento de colestea-

tomas de forma espontânea e, juntamente com os humanos, são as únicas espécies a produzirem tal fato. *Chole et al* (1981)³ demonstraram que os colesteatomas dos esquilos da Mongólia ocorrem de forma espontânea em 45,7% das orelhas avaliadas e que estruturalmente possuem diversas semelhanças aos dos humanos, tanto macroscopicamente quanto microscopicamente³.

Alguns trabalhos demonstraram que a ligadura do conduto auditivo externo ou a obliteração da tuba auditiva elevam consideravelmente a incidência desta patologia em esquilos da Mongólia^{13,16}. Esses modelos experimentais geraram colesteatomas com características similares ao colesteatomas espontâneos¹ nessa espécie animal. *Wolfman et al* (1981)²⁹ evidenciaram em seu estudo que, após a obliteração da tuba auditiva, 6 de 8 orelhas (75%) desenvolveram colesteatoma, confirmando ser essa uma técnica eficiente para indução desta patologia. Em outros experimentos realizados por *Chole et al*^{1,3,15}, as incidências da doença variaram de 50% a 70% utilizando essa mesma técnica.

Kim et al (1998)²⁶ compararam três métodos de indução de colesteatoma em esquilos da Mongólia: ligadura do conduto auditivo externo, obliteração da tuba auditiva e aplicação de propilenoglicol no interior da orelha média. Obtiveram a formação da doença em todos os animais submetidos à ligadura do conduto auditivo externo (100%), e em 7 de 9 animais (77,7%) após a obliteração da tuba auditiva, comprovando a eficácia desses métodos. Apenas 2 de 7 animais (28,5%) desenvolveram colesteatoma com a injeção de propilenoglicol, incidência inferior à observada, inclusive, de forma espontânea.

Verifica-se, na literatura mundial, um número consideravelmente maior de artigos utilizando a ligadura do conduto auditivo externo como forma de desenvolvimento do colesteatoma. *McGinn et al* (1982)¹ obtiveram sucesso em 100%

das orelhas de esquilos da Mongólia submetidas à ligadura do conduto auditivo externo, com características similares às observadas em colesteatomas espontâneos dessa mesma espécie. Outros trabalhos realizados por esse mesmo grupo de pesquisa também alcançaram incidências semelhantes após poucas semanas de acompanhamento¹³. Essa forma de desenvolvimento de otite média crônica colesteatomatosa facilita seu estudo e possibilita a utilização de um menor número de animais, já que o desfecho ocorre sempre próximo à totalidade. Porém, a obliteração da tuba auditiva parece ser mais operacional na indução dessa patologia, quando pensamos nos conhecimentos já adquiridos na espécie humana^{35,36,37} e, além disso, permite a análise evolutiva do colesteatoma através da realização das avaliações otoendoscópicas seriadas, um dos objetivos desse estudo.

*Tinling et al (2006)*⁶ avaliaram a migração epitelial na camada lateral da pars tensa e pars flácida de esquilos da Mongólia e porcos-da-índia e compararam com a verificada em humanos. Para isso, marcaram com tinta em pontos pré-determinados sobre a membrana timpânica (pars tensa e pars flácida) de ambas espécies animais e, diariamente, acompanharam e registraram sua migração. Identificaram que a migração epitelial em esquilos da Mongólia ocorre de maneira muito semelhante à encontrada em humanos, de forma radial, do umbus para periferia da membrana timpânica. Ao contrário dos porcos-da-índia, que apresentaram um padrão com sentido superior/inferior, diferente do observado na espécie humana.

*Tinling et al (2006)*⁷ analisaram as características histopatológicas no desenvolvimento do colesteatoma espontâneo em esquilos da Mongólia e observou uma evolução sequencial, um *continuum*:

- 1) espessamento leve da pars flácida sem efusão na orelha média;
- 2) espessamento da pars flácida com efusão na orelha média;
- 3) acúmulo contínuo de debris celulares no conduto auditivo externo;
- 4) completa oclusão do conduto auditivo externo;

Os autores, nesse estudo, concluíram que um insulto inflamatório e alterações no mecanismo de *clearance* epitelial parecem determinar a formação do colesteatoma espontâneo nessa espécie. Além disso, esse mesmo autor publicou, ainda no ano de 2006, outro estudo⁸ no qual demonstrou que ocorre uma hiperproliferação de queratinócitos na membrana basal do epitélio do conduto auditivo externo e membrana timpânica dos esquilos da Mongólia que desenvolveram colesteatoma, tanto induzido quanto espontâneo, e que esta seria um fator relacionado à patogênese desta doença, assim como observado em humanos³⁰.

Fukuda et al (2010)⁴¹ realizaram um interessante experimento em que removeram a pars flácida de esquilos da Mongólia machos e substituíram pela mesma região de fêmeas da mesma espécie. Após, procederam à ligadura do conduto auditivo externo para que os animais submetidos ao transplante da pars flácida da membrana timpânica desenvolvessem colesteatoma. Através de PCR, rastrearam a presença de um gene relacionado exclusivamente ao cromossomo X, o qual está presente originalmente de forma unitária nos machos (XY) e de forma dupla nas fêmeas (XX). Notaram, então, que este gene era detectado de forma dupla em algumas células epiteliais presentes no interior do colesteatoma dos esquilos da Mongólia machos, demonstrando que a origem destas células obrigatoriamente seria da área transplantada. Dessa forma, supõe-se que a doença teria sua origem predominantemente na membrana timpânica, e não em

células epiteliais presentes na orelha média ou no conduto auditivo externo. Esses achados, semelhantes aos observados na espécie humana, encorajam ainda mais o uso dessa espécie animal para estudo da otite média crônica colesteatomatosa.

Investigando o caráter destrutivo dessa doença, *Aberg et al* (1993)¹⁴ verificou que há casos de colesteatoma em esquilos da Mongólia induzidos pela ligadura do conduto auditivo externo com avançada destruição óssea mas sem inflamação substancial, indicando que esta não seja um pré-requisito para envolvimento ósseo, mas sim um evento secundário que, entretanto, poderia intensificar esse processo destrutivo. Apesar de *Chole et al*¹⁵ acreditarem que a destruição óssea seria mediada por ativação e proliferação de osteoclastos, neste estudo de *Aberg et al*¹⁴, essas células ósseas foram observadas apenas eventualmente próximas às regiões de destruição óssea e, em todos os casos, havia a presença de numerosos macrófagos de reabsorção. *Wolffman et al* (1993)²⁰ demonstraram que o aumento de pressão sobre a bula dos gerbils induz à hiperproliferação de osteoclastos no local e que o mecanismo de pressão sobre os tecidos ocasionaria liberação de enzimas proteolíticas e seriam os responsáveis iniciais pela destruição óssea.

Considerando os conhecimentos já adquiridos, os avanços ainda necessários na elucidação da patogênese do colesteatoma e a dificuldade na realização de estudos com essas características em humanos, acreditamos que o uso de animais para esse fim é essencial e o desenvolvimento de um modelo experimental, em nosso grupo de pesquisa, é de fundamental importância. Dentre as espécies estudadas, os esquilos da Mongólia despontam como um dos mais in-

teressantes, e a obliteração da tuba auditiva parece ser uma forma bastante operacional de obtenção deste desfecho. Tendo isso em mente, buscamos nesse trabalho o desenvolvimento desse modelo animal, bem como a análise de aspectos envolvidos em todo esse processo, através da avaliação otoendoscópica e histológica.

Revisão da Literatura

A busca de artigos para revisão da literatura foi realizada utilizando o *PUBMED* com as seguintes palavras-chave: 1) *mongolian gerbils* 2) *cholesteatoma* 3) *experimental models*.

Em relação ao termo *mongolian gerbil* foram encontrados 3038 artigos. Cruzando as palavras *mongolian gerbils* com *cholesteatoma* o número de artigos foi de 33. Utilizando os três termos, foram encontrados 19 artigos.

Os 33 artigos foram revisados, eles variavam do ano de 1981 à 2016, sendo que a maioria destes (23 artigos) foram realizados anteriormente ao ano 2000.

Objetivos

- Desenvolvimento de um modelo animal para estudo dos colesteatomas utilizando esquilos da Mongólia;
- Comparar os colesteatomas dos esquilos da Mongólia desenvolvidos espontaneamente e através da obliteração da tuba auditiva;
- Avaliar por meio de otoendoscopias seriadas o processo evolutivo dos colesteatomas;
- Analisar histologicamente as características dos colesteatomas;

Métodos

Local: a pesquisa foi realizada na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), entre março de 2016 e novembro de 2017.

Animais: quarenta esquilos da Mongólia (*mongolian gerbils*) com idade superior a três meses, de ambos os sexos, foram incluídos no estudo e divididos em dois grupos (Figura 1). Os animais foram adquiridos de um biotério localizado em Santa Maria, credenciado junto ao HCPA. Após a chegada à Unidade, os animais passaram por um período de aclimação/quarentena de pelo menos quinze dias antes do início dos procedimentos anestésico-cirúrgicos.

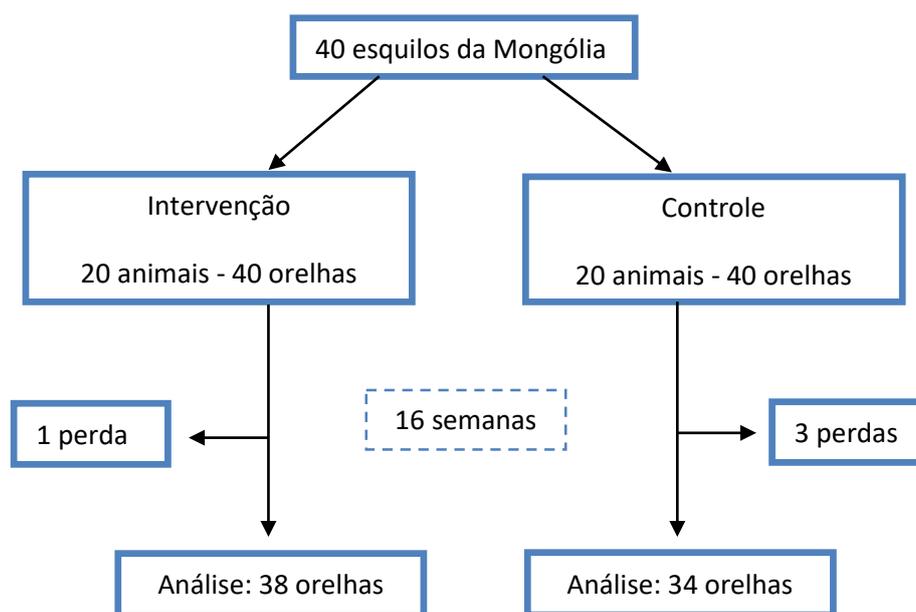


Figura 1 - fluxograma

Foram mantidos durante todo o período do estudo em um alojamento específico para a espécie (Figura 2), com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umi-

dade relativa do ar em 40-60%, ciclo de luz de doze horas claro/doze horas escuro, sistema de exaustão de ar, em caixas moradia com no máximo seis animais e recebendo ração padrão para a espécie e água *ad libitum* (Figura 3).



Figura 2 - alojamento



Figura 3 – caixa moradia

Análise pré-procedimento: todos os esquilos da Mongólia foram submetidos à otoendoscopia bilateral no pré-operatório, sob anestesia geral, para gravação e documentação. Utilizamos para realização dessa etapa uma fibra ótica Karl-Storz de 0º, 2,8mm e 18 cm, exclusiva para uso na unidade de experimentação animal (Figura 4)

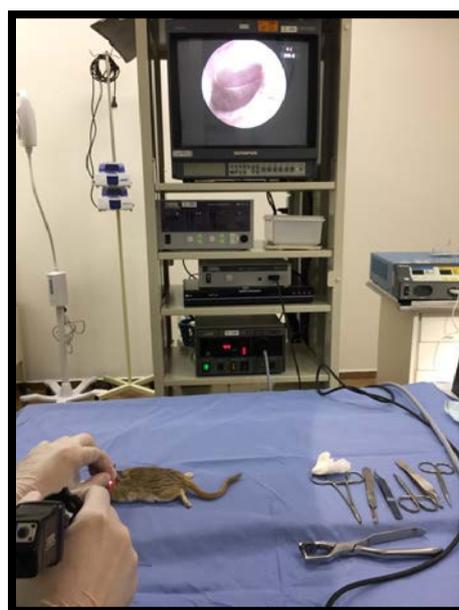


Figura 4 – otoendoscopia

Procedimento: a obliteração da tuba auditiva dos esquilos da Mongólia foi realizada através da cauterização do óstio tubário bilateralmente, no centro cirúrgico da unidade de experimentação animal (UEA), sob condições estéreis. Os animais foram submetidos à anestesia geral com isoflurano inalatório, tramadol (30mg/Kg) intraperitoneal e bupivacaína com vasoconstritor (1:200.000) subcutâneo (4mg/Kg a 0,5%) (Figura 5).



Figura 5 – anestesia inalatória

A cauterização foi realizada utilizando cautério monopolar com ponta em agulha inserida de forma transpalatal, sem visualização direta dos óstios tubários e, portanto, sem confirmação visual da obliteração da tuba auditiva. Conforme estudo anatômico realizado por *Chole et al* (1986)²⁹, a agulha foi introduzida cerca de 5mm posterior à transição entre o palato duro e palato mole do animal e angulada aproximadamente trinta graus para direita, inicialmente, e após, utilizando mesma angulação, para a esquerda (Figuras 6 e 7). Não há claras evidências até então na literatura sobre a intensidade e tempo de cauterização. Sendo assim, esses parâmetros foram ajustados e otimizados no início do estudo. Houve duas perdas nessa etapa relacionadas, muito provavelmente, ao

excesso de cauterização na nasofaringe e palato mole durante o procedimento. Ambos animais desenvolveram sinais claros de otite média aguda após a primeira semana e, devido à inapetência, perderam mais de 25% do seu peso corporal inicial, sendo necessário eutanasiá-los, conforme regulamentação do Comitê de ética no uso de animais (CEUA)⁵⁰. Obtivemos como parâmetro ideal a potência de doze miliVolts mantidos por um período de um segundo em cada um dos lados para cauterização de ambos óstios tubários, conforme Figuras 6a e 6b. No pós-operatório imediato a analgesia foi realizada com dipirona (500 mg/kg) por via intramuscular nos animais submetidos à intervenção. A manutenção da analgesia foi realizada com cloridrato de tramadol (10 mg/kg) a cada doze horas, por via intraperitoneal, nos animais que demonstravam sinais clínicos alérgicos, como inapetência e agitação.

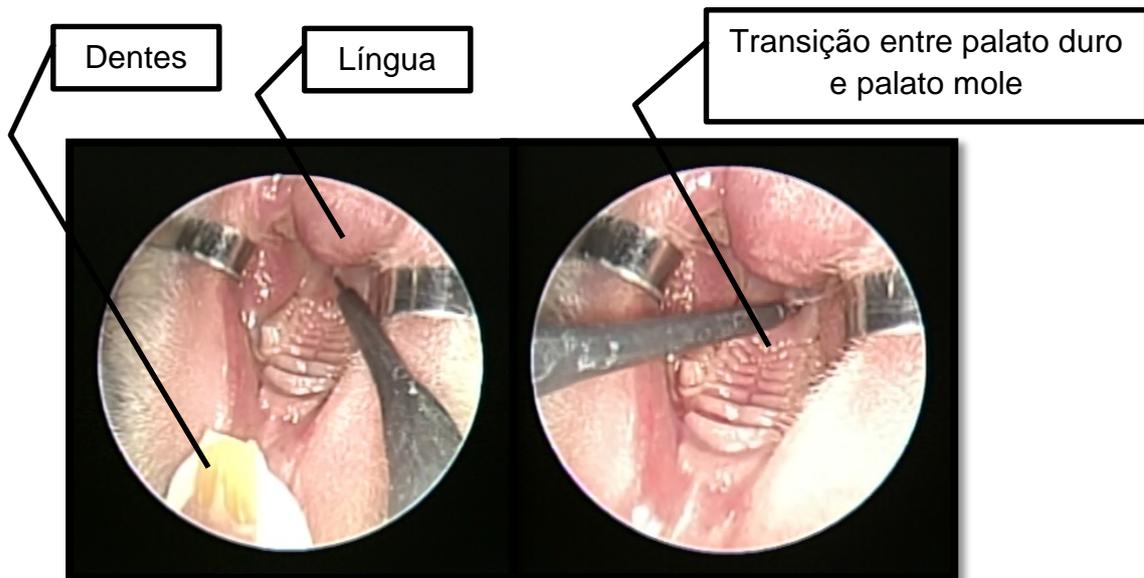


Figura 6a e 6b – inserção do eletrocautério transpalatal

Otoendoscopia: após o arrolamento inicial, todos os esquilos da Mongólia foram sequencialmente submetidos à otoendoscopia bilateral (Figuras 7 e 8), sob anestesia geral, na primeira, quarta, oitava, décima-segunda e décima-sexta semanas, para avaliação do processo evolutivo da potencial patologia. Todas as

otoendoscopias foram descritas em formulário, gravadas em DVD e analisadas por três pesquisadores responsáveis. As otoendoscopias foram avaliadas quanto à presença de descamação do conduto auditivo externo (CAE), tecido de granulação, secreção purulenta ou presença de acúmulo de queratina no conduto auditivo externo com ou sem invasão da orelha média, este último definido como colesteatoma segundo *Chole et al*.

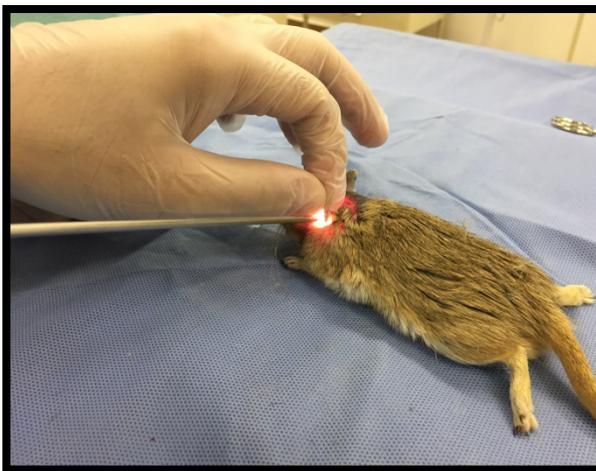


Figura 7 – posicionamento

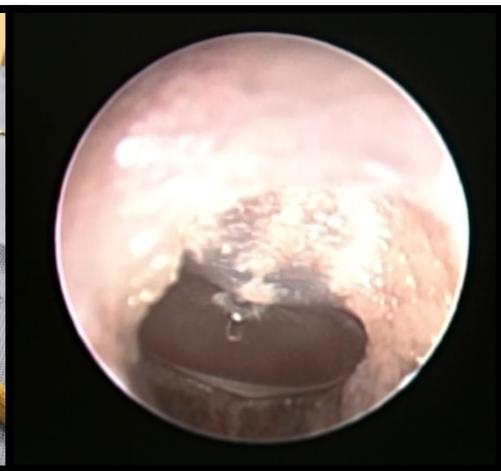


Figura 8 – visão otoendoscópica

Diferenciamos a descamação do conduto auditivo externo do acúmulo de queratina no CAE da seguinte maneira: o primeiro define-se pela presença de uma simples esfoliação do CAE (Figura 9), já o segundo caracteriza-se pela formação de grumos de queratina obstruindo parcial ou totalmente o CAE (Figura 10).

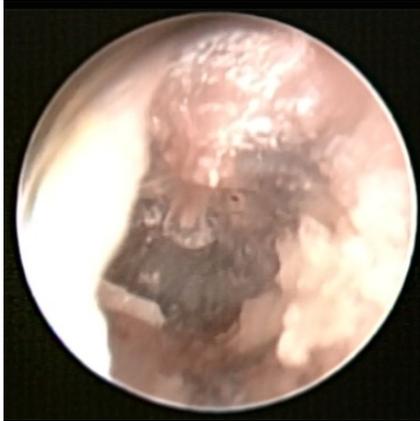


Figura 9 – descamação do conduto auditivo externo

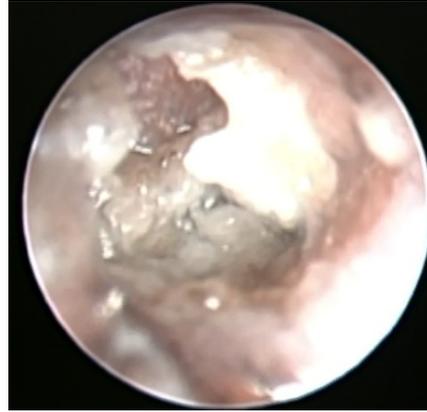


Figura 10 – colesteatoma

Seguimento: quarenta animais foram inicialmente incluídos no estudo, vinte para o grupo intervenção e vinte para o grupo controle. Utilizamos dezesseis semanas como tempo de seguimento, estabelecido a partir de *Wolfmann et al (1986)*²⁹ que demonstraram em seu trabalho que 75% dos animais desenvolveram colesteatoma após obliteração da tuba auditivo nesse período de acompanhamento. Tivemos cinco perdas ao longo do estudo, três pertencentes ao grupo controle e duas ao grupo intervenção. Dois animais, ambos do grupo intervenção, foram eutanasiados devido à perda de peso corporal acima dos valores aceitáveis pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA)⁵⁰, um deles pode ser incluído na análise já que pudemos acompanhá-lo por pelo menos quatro semanas. Outra perda ocorreu pela morte do animal secundária a importantes lesões provocadas após briga com outro animal que estava em mesma caixa moradia. Este pertencia ao grupo controle, sendo que até aquele momento as otoendoscopias estavam normais em ambas as orelhas. As outras duas perdas ocorreram na indução anestésica, na primeira semana de avaliação, que evoluíram com parada cardiorrespiratória. Os animais pertenciam ao grupo controle e ambos eram fêmeas, as quais, de maneira geral, tiveram comportamento mais

agressivo e apresentaram maior incidência de sinais epilépticos durante os momentos de estresse ao longo do estudo.

Histologia: todos os animais que chegaram ao final do estudo foram eutanasiados utilizando sobredose anestésica de isoflurano (9-12%) por via inalatória até parada cardiorrespiratória e comprovação do óbito pelo médico veterinário responsável. Após isso, tiveram seus ossos temporais retirados (Figura 11 e 12), armazenados em solução de formol e posteriormente submetidos à análise histológica. As primeiras cinquenta e quatro peças foram descalcificadas com ácido nítrico 10% trocado a cada 48 horas. O grau de descalcificação foi aferido utilizando uma agulha fina em cada uma dessas trocas, a qual foi considerada como ideal ao transfixar o osso com discreta resistência, sem quebrá-lo. As dezoito peças restantes foram descalcificadas com EDTA trocados a cada 48 horas. Em média, a descalcificação atingiu seu estágio ideal após sete a dez dias.



Figura 11 – osso temporal
visão superior



Figura 12 – osso temporal
visão lateral

Em seguida, as peças foram incluídas em parafina e cortadas através de um micrótomo utilizando cortes de 10 μ m no plano axial. Utilizamos como parâmetro para realização dos cortes das peças o nível midmodiolar que continham

em um mesmo plano axial a orelha interna, a orelha média e o conduto auditivo externo. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e avaliadas, juntamente com a patologista responsável pela unidade, utilizando um microscópio óptico binocular E100 Nikon® com aumento de sessenta vezes. Na Figura 13, podemos observar uma imagem histológica de uma orelha normal de um esquilo da Mongólia demonstrando a cóclea, orelha média, membrana timpânica e conduto auditivo externo.

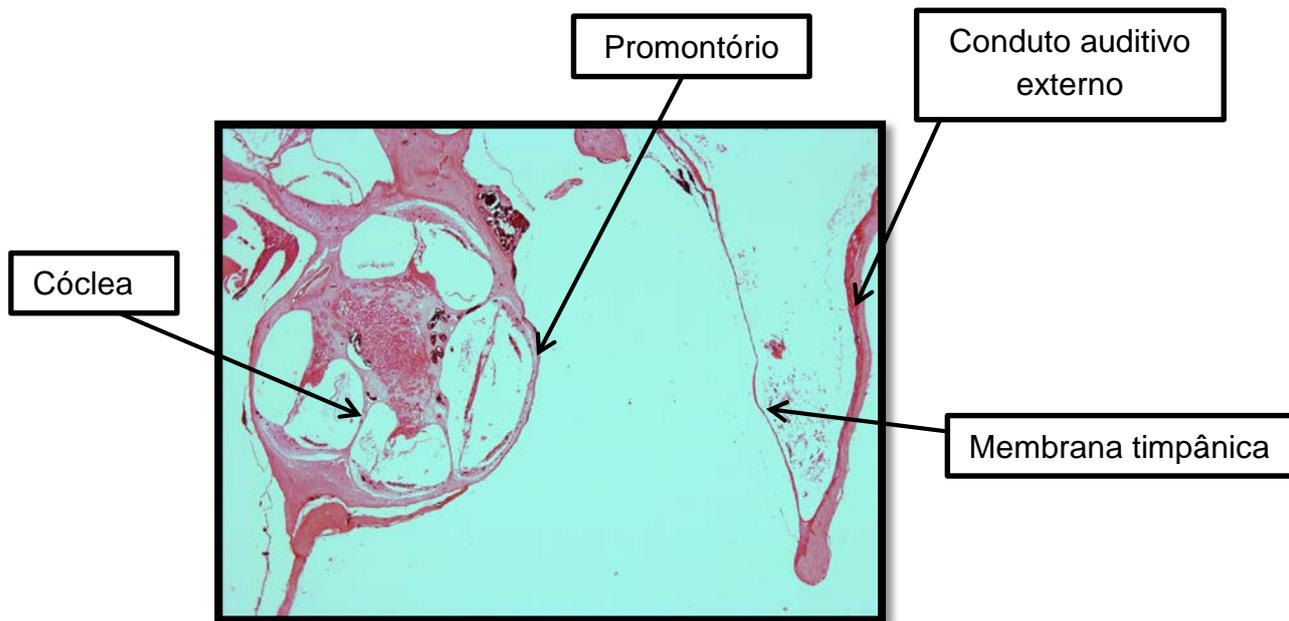


Figura 13 – histologia – orelha normal

Colesteatoma: definimos a presença de colesteatoma utilizando os seguintes parâmetros:

- Endoscopia: não há na literatura clara definição de colesteatoma em esquilos da Mongólia utilizando a otoendoscopia. Conforme descrito anteriormente, consideramos a presença de agrupamentos de queratina no conduto auditivo externo e sobre a membrana timpânica, com presença ou não de secreção purulenta, invadindo ou não a orelha média, como definição de colesteatoma (Figura 14).



Figura 14 – colesteatoma

- Histologia: de acordo com *Chole et al (1981)*¹, define-se colesteatoma através da histologia pela presença de acúmulos de queratina preenchendo total ou parcialmente o conduto auditivo externo com ou sem invasão da orelha média e bula (Figura 15).

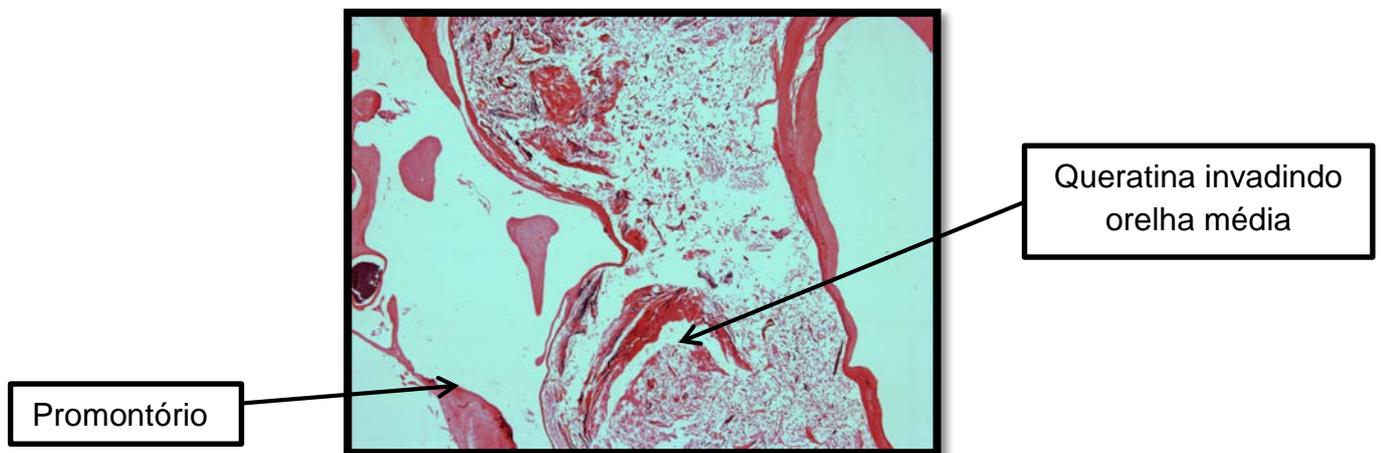


Figura 15 – colesteatoma

Após definido o diagnóstico de colesteatoma, conforme descrito acima, este foi classificado histologicamente de acordo com *Chole et al (1981)*¹. Não há

classificação otoendoscópica de colesteatoma em esquilos da Mongólia até o presente momento.

Estágio 1: acúmulo de queratina no conduto auditivo externo sem envolvimento da membrana timpânica (Figura 16);

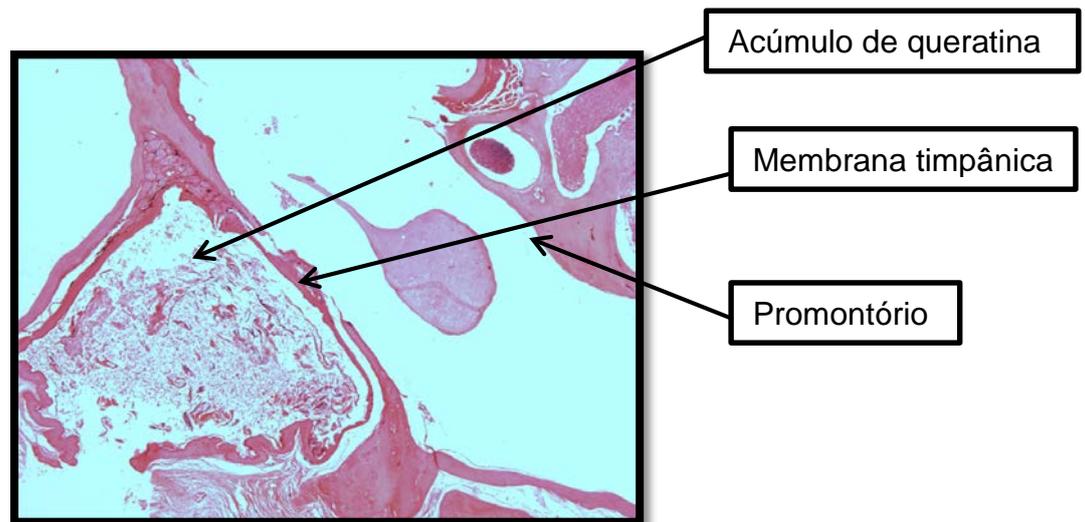


Figura 16 – colesteatoma grau 1

Estágio 2: queratina preenchendo o conduto auditivo externo e deslocando medialmente a membrana timpânica (Figura 17);

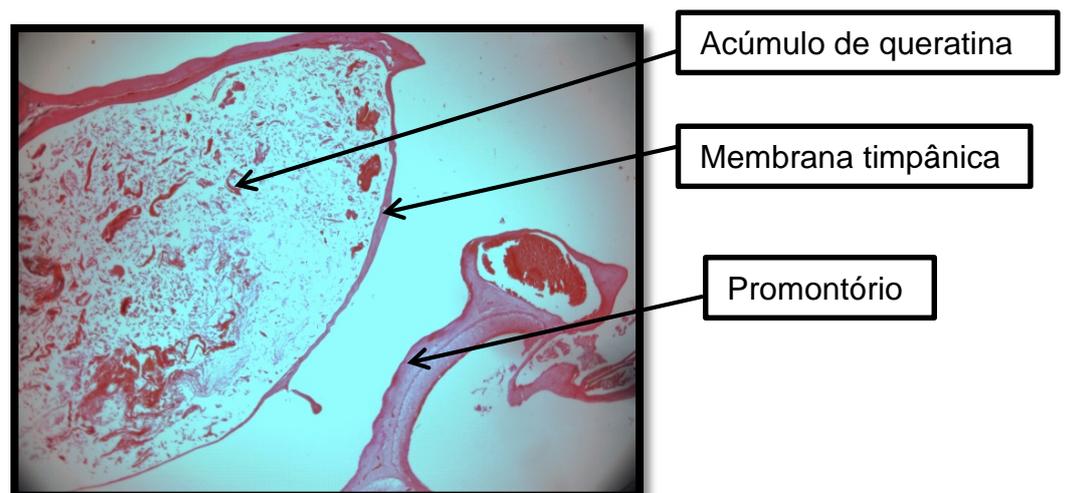


Figura 17 – colesteatoma grau 2

Estágio 3: membrana timpânica deslocada medialmente tocando o promontório do animal (Figura 18);

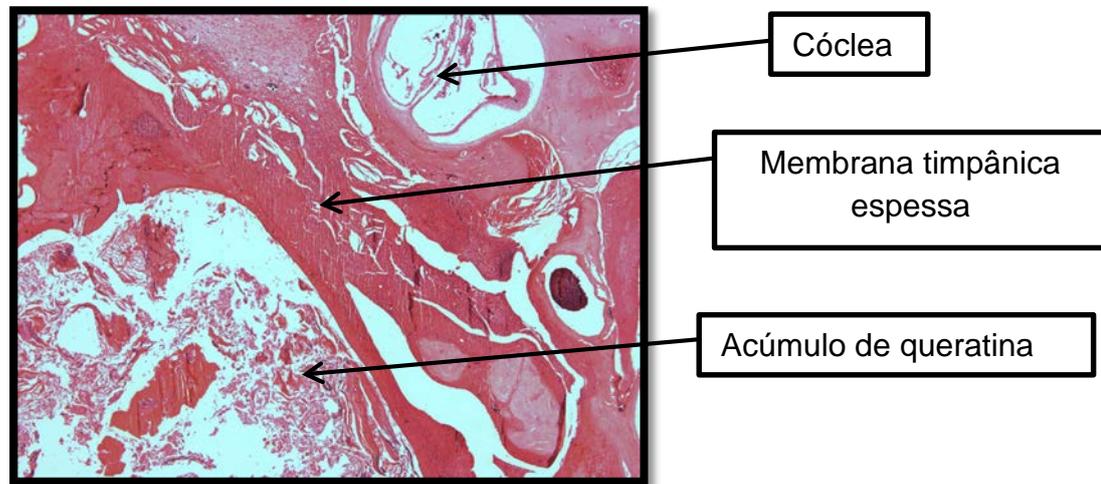


Figura 18 – colesteatoma grau 3

Estágio 4: preenchendo completamente a bula (Figura 19);

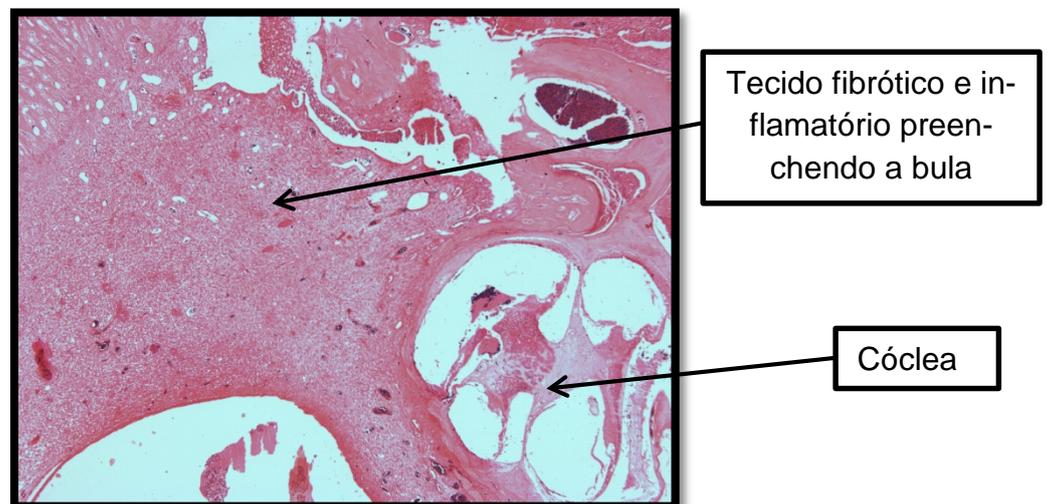


Figura 19 – colesteatoma grau 4

Estágio 5: extensão intracraniana;

A histologia foi analisada conjuntamente pelo pesquisador e pela patologista responsável, na unidade de experimentação animal, e cada lâmina foi avaliada quanto à presença de tecido de granulação, secreção purulenta, granulomas de colesterol e colesteatoma.

Aspectos éticos: o presente projeto foi submetido e aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA)⁵⁰. Os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, que regulamenta a utilização de animais na pesquisa científica. Os cuidados e manipulação dos animais seguiram as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA – Resolução Normativa 12, 2013, CONCEA). A eutanásia seguiu a Diretriz para a Prática de Eutanásia do CONCEA (RN 13 de 2013).

Análise estatística: a análise dos dados do estudo foi realizada utilizando o cálculo de incidências e comparação com os dados já existentes na literatura. O cálculo de amostra foi realizado utilizando uma incidência aproximada de desenvolver colesteatoma de aproximadamente 45%³ no grupo controle e 85%¹⁶ no grupo intervenção, conforme demonstra a literatura^{3,16}. Para uma diferença esperada de 35% entre os grupos, poder estatístico de 80%, alfa de 0,05, seriam necessários vinte animais em cada um dos grupos. A diferença entre os grupos foi calculada utilizando qui-quadrado e a comparação entre os testes diagnósticos com o teste de McNemar.

Delineamento

- Estudo experimental;
 - Grupo controle: 20 animais que foram acompanhados;
 - Grupo intervenção: 20 animais que foram submetidos à obliteração da tuba auditiva e acompanhados;

Desfechos

- Principais:
 - Desenvolvimento do modelo animal;
 - Colesteatoma pela análise histológica;
 - Colesteatoma pela análise endoscópica;

Referências Bibliográficas

1. McGinn MD, Chole RA, Henry KR. Cholesteatoma. Experimental induction in the Mongolian Gerbil, *Meriones Unguiculatus*. *Acta Otolaryngol*. 1982, 93:61–67. [PubMed: 7064697]
2. Sadé J. Retraction pockets and attic cholesteatomas. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1980, 34:62–84.
3. Chole RA, Henry KR, McGinn MD. Cholesteatoma: Spontaneous occurrence in the mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. *Am J Otol*. 1981;2:204–10.
4. Fulghum RS, Chole RA. Bacterial flora in spontaneously occurring aural cholesteatomas in Mongolian gerbils. *Infect Immun*. 1985; 50:678–681. [PubMed: 4066027]
5. Attallah MS. Microbiology of chronic suppurative otitis media with cholesteatoma. *Saudi Med J*. 2000; 21:924–927. [PubMed: 11369953]
6. Tinling SP, Chole RA . Gerbilline cholesteatoma development Part I: Epithelial migration pattern and rate on the gerbil tympanic membrane: comparisons with human and guinea pig. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006 May;134(5):788-93

7. Tinling SP, Chole RA . Gerbilline cholesteatoma development. Part II: temporal histopathologic changes in the tympanic membrane and middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Jun;134(6):953-60
8. Tinling SP, Chole RA. Gerbilline cholesteatoma development Part III. Increased proliferation index of basal keratinocytes of the tympanic membrane and external ear canal. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Jul;135(1):116-23.
9. Lima JP, Ariga S, Velasco I, Schochat E. Effect of the ketamine/xylazine anesthetic on the auditory brainstem response of adult gerbils. *Braz J Med Biol Res.* 2012 Dec;45(12):1244-7. Epub 2012 Sep 11.
10. Von Unge M, Decraemer WF, Buytaert JA, Dirckx JJ. Evaluation of a model for studies on sequelae after acute otitis media in the Mongolian gerbil. *Acta Otolaryngol.* 2009 Mar;129(3):261-7.
11. Larsson C, von Unge M, Bagger-Sjöbäck D. Tympanic membrane changes in experimental cholesteatoma in the gerbil. *Am J Otol.* 1999 May;20(3):309-16.
12. Jung JY, Lee DH, Wang EW, Nason R, Sinnwell TM, Vogel JP, Chole RA. *P. aeruginosa* infection increases morbidity in experimental cholesteatomas. *Laryngoscope.* 2011 Nov;121(11):2449-54.

13. McGinn MD et al. Cholesteatoma induction. Consequences of external auditory canal ligation in gerbils, cats, hamsters, guinea pigs, mice and rats. *Acta Otolaryngol.* 1984 Mar-Apr;97(3-4):297-304.
14. Aberg B et al. A comparative study of enzyme histochemical features in the gerbilline and human cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 1990 Jan-Feb;109(1-2):130-6.
15. Chole RA et al. Cholesteatoma: spontaneous occurrence in the Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. *Am J Otol*, 1981 Jan, 2(3): 204-10.
16. Kim HJ et al. Experimental models of aural cholesteatomas in Mongolian gerbils. 1998 Feb;107(2) 129-34.
17. Da Costa SS, Cruz OLM, De Oliveira, JAA. *Otorrinolaringologia Princípios e Prática*. 2ª edição, 2006.
18. Chole RA, Gagnon PM, Vogel JP. Inactivation of specific *Pseudomonas aeruginosa* biofilm factors does not alter virulence in infected cholesteatomas. *Otol Neurotol.* 2014 Oct;35(9):1585-91.
19. Choufani G, Roper N, Delbrouck C, Hassid S, Gabius HJ. Animal model for cholesteatoma induced in the gerbil: will the profiles of differentiation/growth-regulatory markers be similar to the clinical situation? *Laryngoscope.* 2007 Apr;117(4):706-11.

20. Wolfman DE, Tinling SP. Systemic osteoclast activation by localized pressure. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993 Feb;119(2):165-8.
21. Antunes ML, Fukuda Y, Penido Nde O, Ferreira R. Effect of trans-retinoic acid in the inhibition of cholesteatoma in guinea pigs. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008 Jan-Feb;74(1):53-60.
22. Hinohira Y, Gyo K, Yanagihara N. Experimental cholesteatomas arising from autologous free skin grafting in the middle ear cavity. *Acta Otolaryngol*. 1994 Sep;114(5):533-8.
23. Paparella MM, Hiraide F, Juhn SK, Kaneco J. Cellular events involved in middle ear fluid production. *Ann Rhinol Otol Laryngol*; 1970: 79(4): 766-79.
24. Kim HJ, Tinling SP, Chole RA. Increased proliferation and migration of epithelium in advancing experimental cholesteatomas. *Otol Neurotol* 2002; Nov; 23(6): 840-4.
25. Vennix PPCA, Kuijpers W, Tonnaer ELGM, et al. Cytokeratins in induced epidermoid formation and cholesteatoma lesions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;116:560–5.
26. Vennix PPCA, Kuijpers W, Peters TA, et al. Growth and differentiation of meatal skin grafts in the middle ear of the rat. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:1102–11.

27. Bujia J, Schilling V, Holly A, et al. Hyperproliferation-associated keratin expression in human middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 1993;113:364–8.
28. Sasaki H, Huang CC. Expression of cytokeratins 13 and 16 in middle ear cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;110: 310–7.
29. Wolfman, DE, Chole, RA. Experimental Retraction Pocket Cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1986; 95: 639-44.
30. Maniu A, Harabagiu O, Perde Schrepler M, Catana A, Fanuta B, Mogoanta CA. Molecular biology of cholesteatoma. *Rom K Morphol Embryol*. 2014;55(1):7-13.
31. Yoon TH, Schachern PA, Paparella MM, Aeppli DM. Pathology and pathogenesis of tympanic membrane retraction. *Am J Otolaryngol* 1990 Jan-Feb; 11(1):10-7.
32. Rosito LP, da Costa SS, Schachern PA, Dornelles C, Cureoglu S, Paparella MM. Contralateral ear in chronic otitis media: a histologic study. *Laryngoscope* 2007 Oct;117(10):1809-14.
33. Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of attic cholesteatoma: clinical and immunohistochemical support for combination of retraction theory and proliferation theory. *Am J Otol*. 2000 Nov;21(6):786-92.
34. Louw L. Acquired cholesteatoma pathogenesis: stepwise explanations. *J Laryngol Otol*. 2010 Jun;124(6):587-93.

35. Harris L, Cushing SL, Hubbard B, Fisher D, Papsin BC, James AL. Impact of cleft palate type on the incidence of acquired cholesteatoma. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013 May;77(5):695-8.
36. Spilsbury K, Ha JF, Semmens JB, Lannigan F. Cholesteatoma in cleft lip and palate: a population-based follow-up study of children after ventilation tubes. *Laryngoscope* 2013 Aug;123(8):2024-9.
37. Dominguez S, Harker LA. Incidence of cholesteatoma with cleft palate. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1988 Nov-Dec;97(6):659-60.
38. Vashishth A, Singh Nagar TR, Mandal S, Venkatachalam VP. Extensive intratemporal cholesteatomas: presentation, complications and surgical outcomes. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015 Feb; 272(2):289-9.
39. Wu JF, Jin Z, Yang JM, Liu YH, Duan ML. Extracranial and intracranial complications of otitis media: 22-year clinical experience and analysis. *Acta Otolaryngol* 2012 Mar;132(3):261-5.
40. Mor N, Finkel DA, Hanson MB, Rosenfeld RM. Middle ear cholesteatoma treated with a mastoidectomy: a systematic review of the measures used. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014 Dec;151(6):923-6.
41. Yamamoto-Fukuda T, Hishikawa Y, Shibata Y, Kobayashi T, Takahashi H, Koji T. Pathogenesis of middle ear cholesteatoma: a new model of experimentally induced cholesteatoma in Mongolian gerbils. *Am J Pathol* 2010 Jun;176(6):2602-6.

42. Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of sinus cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264:1137–43.
43. Sadé J, Avraham S, Brown M. Atelectasis, retraction pockets and cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 1981;92:501–12.
44. Da Costa SS, Rosito LP, Dornelles C, Sperling N. The contralateral ear in chronic otitis media: a series of 500 patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134:290–3.
45. Rosito LP, da Costa SS, Schachern PA, Dornelles C, Cureoglu S, Papparella MM. Contralateral ear in chronic otitis media: a histologic study. *Laryngoscope* 2007; 117:1809-1814.
46. Netto LFS, Costa SS, Sleifer P, Braga MEL. The impact of chronic suppurative otitis media on children's and teenagers' hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009; 73:1751-1756.
47. Silva MN, Muller Jdos S, Selaimen FA, Oliveira DS, Rosito LP, Costa SS. Tomographic evaluation of the contralateral ear in patients with severe chronic otitis media. *Braz J Otorhinolaryngol* 2013; 79:475-79.
48. Jackler RK, Santa Maria PL, Varsak YK, Nguyen A, Blevins NH. A new theory on the pathogenesis of acquired cholesteatoma: Mucosal traction. *Laryngoscope* 2015;125 Suppl 4:S1-S14.

49. Steinbach E, Gruninger G. Experimental production of cholesteatoma in rabbits by using non-irritants (skin tolerants). J Laryngol Otol. 1980 Mar;94(3):269-79.

50. Lei N° 11.794, de 8 DE Outubro de 2008.

Artigo em Português

Resumo

Introdução: a otite média crônica colesteatomatosa é uma doença com grande impacto clínico e com compreensão ainda incompleta. A dificuldade em realizar estudos histológicos e com longo tempo de acompanhamento em humanos é um importante fator que entrava esse avanço. Dessa forma, o uso de modelos animais para sua elucidação se mostra bastante pertinente, sendo que os esquilos da Mongólia despontam como um dos mais operacionais para esse fim. **Objetivos:** indução de colesteatoma em esquilos da Mongólia por meio da obliteração da tuba auditiva e análise do processo evolutivo através de otoendoscopias seriadas. **Materiais e métodos:** o estudo foi realizado entre março/16 e novembro/17 na unidade de experimentação animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Foram utilizados quarenta animais, divididos em dois grupos de igual número. No grupo controle, os animais foram apenas acompanhados através de otoendoscopias seriadas; já no grupo intervenção, além do acompanhamento, os animais foram submetidos ao procedimento de obliteração da tuba auditiva. **Resultados:** ao final de dezesseis semanas de acompanhamento, observamos através da análise histológica a formação de colesteatoma em 29 das 38 orelhas no grupo intervenção (76,3%) e 18 das 34 orelhas no grupo controle (52,9%), diferença essa que foi estatisticamente significativa ($p=0,027$). Além disso, a presença de doença em estágios mais avançados (graus 2, 3 e 4) foi mais frequente no grupo intervenção (58,6%) em relação ao grupo controle (27,9%) ($p=0,039$). Na análise otoendoscópica, verificou-se a presença de colesteatoma em 11 das 38 orelhas no grupo intervenção (28,9%) e em 7 das 34

orelhas no grupo controle (20,6%), sem significância estatística ($p=0,586$). **Conclusões:** a obliteração da tuba auditiva aumentou significativamente a incidência de colesteatoma em esquilos da Mongólia, os quais se apresentaram de forma mais agressiva. A análise através de otoendoscopias seriadas sugere que o colesteatoma em esquilos da Mongólia se inicie no conduto auditivo externo e, então, progrida em direção à bula desses animais.

Palavras-chave: colesteatoma, esquilos da Mongólia, modelos experimentais.

Introdução

A otite média crônica colesteatomatosa caracteriza-se por ser uma patologia com alta morbidade, elevados custos para o sistema de saúde e com significativo risco de complicações, tanto intratemporais quanto extratemporais¹⁷. Sua compreensão ao longo das últimas décadas evoluiu de maneira expressiva, sobretudo em seus aspectos clínicos e fisiopatológicos. No entanto, numerosas lacunas persistem no entendimento de sua patogênese e diversas teorias já foram elaboradas com o intuito de explicá-la. Em nosso grupo de pesquisa, entendemos que a teoria da invaginação timpânica seja uma das mais operacionais e evidências clínicas e experimentais^{2,31,32,33,34} demonstram que o desenvolvimento desta patologia seguiria uma sequência de retração timpânica progressiva, perda de sua propriedade de autolimpeza e formação do colesteatoma.

No entanto, alguns trabalhos têm falhado em demonstrar com clareza essa evolução^{42,43}. Provavelmente a baixa incidência desta patologia em humanos e também a dificuldade em assegurar o seguimento desses pacientes du-

rante longos períodos sejam fatores que dificultam a completa elucidação da patogênese envolvida nessa doença. Sendo assim, buscando outros meios de explicar a história natural da otite média crônica, a partir de 2008 iniciamos o estudo da orelha contralateral como uma forma de inferirmos sobre os eventos sucedidos na orelha principal. Propõe-se isso ao considerarmos que a anatomia entre a orelha principal e a contralateral apresentam características semelhantes, compartilham uma evolução embriológica comum e que estariam sujeitas a desencadeantes ambientais similares. Nesses experimentos, encontramos elevada prevalência de alterações na orelha contralateral analisando seus aspectos clínicos, histológicos, auditivos e radiológicos^{44,45,46,47}. Em trabalho conduzido por *Rosito et al* (2018), prelo, analisaram pacientes com diagnóstico de colesteatoma e observaram que 95,8% das alterações na orelha contralateral à doença consistiam em retrações timpânicas, sinais otoscópicos que remetiam a retrações prévias, ou ainda evidências de progressão dessas retrações, como o próprio colesteatoma. Esses achados revelam uma poderosa correlação entre os padrões de crescimento do colesteatoma na orelha principal e os locais de retração da membrana timpânica na orelha contralateral e, portanto, sugerem que a invaginação da membrana timpânica seria um evento que, através de mecanismos ainda não completamente elucidados, precederia o desenvolvimento do colesteatoma. A disfunção da tuba auditiva ocasionando prejuízo na ventilação e consequente pressão negativa no interior da orelha média parece ser um fator causal importante. Estudos conduzidos em indivíduos com fenda palatina, excelente modelo para estudo da disfunção tubária, demonstram relevantes prevalências de otite média crônica^{35,36,37} nessa população.

Entretanto, apesar de evidências clínicas suportarem a ideia de um processo evolutivo que conduz uma retração timpânica até a formação de um colesteatoma, permanece desconhecido o porquê de inúmeras retrações, muitas vezes severas, não apresentarem esse comportamento e permanecerem estáveis. Provavelmente existam inúmeros gatilhos inflamatórios e infecciosos necessários para que esse processo patológico evolua; contudo, esses questionamentos ainda carecem de um entendimento pleno.

Em busca dessas respostas e considerando a dificuldade em realizar trabalhos histológicos e com longo tempo de acompanhamento para o estudo dessa intrigante doença em humanos, o uso de modelos animais para esse fim constitui um método deveras pertinente. Dentre estes, os esquilos da Mongólia despontam como uma das espécies mais operacionais para suprir essa necessidade, pois, juntamente com a espécie humana, são as únicas a desenvolverem colesteatomas espontaneamente. De acordo com *Chole et al* (1981)¹⁵, os colesteatomas dos esquilos da Mongólia apresentam diversas características semelhantes aos dos humanos, tanto macroscopicamente quanto microscopicamente. Alguns estudos ainda demonstraram que, com a obliteração da tuba auditiva, a incidência de colesteatomas se eleva consideravelmente^{13,16}, sendo que estes apresentam características muito similares aos que incidem de forma espontânea¹.

Levando esses questionamentos em consideração, esse estudo objetiva o desenvolvimento de um modelo animal para estudo da otite média crônica colesteatomatosa através da obliteração da tuba auditiva de esquilos da Mongólia e, por meio de otoendoscopias seriadas, algo inexistente na literatura até o momento, analisar as características evolutivas no processo de desenvolvimento

desta doença, buscando avançar na compreensão de sua complexa patogênese.

Métodos

Local: a pesquisa foi realizada na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), entre março de 2016 e novembro de 2017.

Animais: quarenta esquilos da Mongólia (*mongolian gerbils*) com idade superior a três meses, de ambos os sexos, foram incluídos no estudo e divididos em dois grupos (Figura 1).

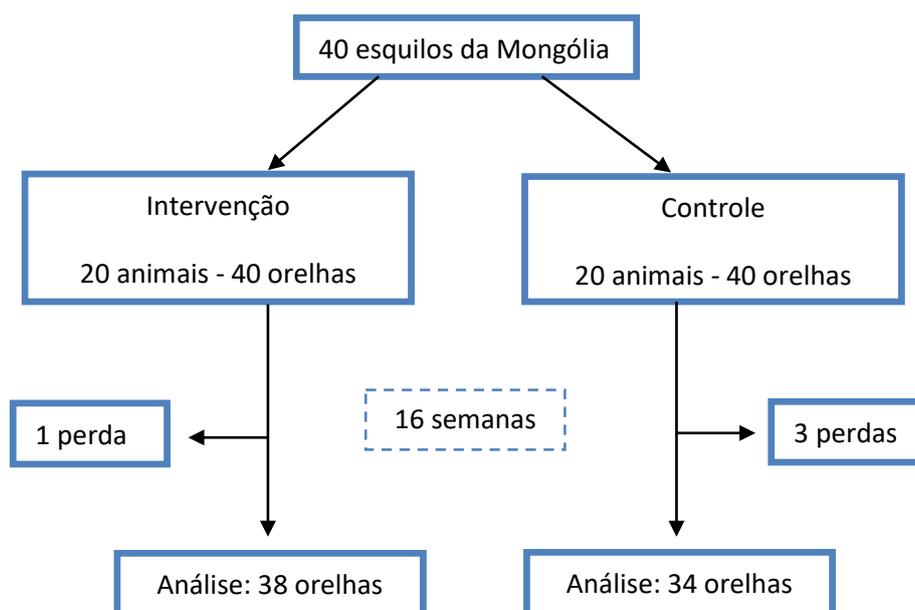


Figura 1 – fluxograma do estudo

Análise pré-procedimento: todos os esquilos da Mongólia foram submetidos à otoendoscopia bilateral no pré-operatório, sob anestesia geral, para gravação e documentação. Utilizamos para realização dessa etapa uma fibra ótica

Karl-Storz de 0º, 2,8mm e 18 cm, exclusiva para uso na unidade de experimentação animal.

Procedimento: a obliteração da tuba auditiva dos esquilos da Mongólia foi realizada através da cauterização do óstio tubário bilateralmente. Os animais foram submetidos à anestesia geral com isoflurano inalatório, tramadol (30mg/Kg) intraperitoneal e bupivacaína com vasoconstritor (1:200.000) subcutâneo (4mg/Kg a 0,5%).

A cauterização foi realizada utilizando cautério monopolar com ponta em agulha inserida de forma transpalatal, sem visualização direta dos óstios tubários e, portanto, sem confirmação visual da obliteração da tuba auditiva. Conforme estudo anatômico realizado por *Chole et al* (1986)²⁹, a agulha foi introduzida cerca de 5mm posterior à transição entre o palato duro e palato mole do animal e angulada aproximadamente trinta graus para direita, inicialmente, e após, utilizando mesma angulação, para a esquerda (Figuras 2a e 2b). Não há claras evidências até então na literatura sobre a intensidade e tempo de cauterização. Sendo assim, esses parâmetros foram ajustados e otimizados no início do estudo. Houve duas perdas nessa etapa relacionadas, muito provavelmente, ao excesso de cauterização na nasofaringe e palato mole durante o procedimento. Ambos animais desenvolveram sinais claros de otite média aguda após a primeira semana e, devido à inapetência, perderam mais de 25% do seu peso corporal inicial, sendo necessário eutanasiá-los, conforme regulamentação do Comitê de ética no uso de animais (CEUA)⁵⁰. Obtivemos como parâmetro ideal a potência de doze miliVolts mantidos por um período de um segundo em cada um dos lados para cauterização de ambos óstios tubários, conforme Figuras 2a e 2b. No pós-operatório imediato a analgesia foi realizada com dipirona (500

mg/kg) por via intramuscular nos animais submetidos à intervenção. A manutenção da analgesia foi realizada com cloridrato de tramadol (10 mg/kg) a cada doze horas, por via intraperitoneal, nos animais que demonstravam sinais clínicos alérgicos, como inapetência e agitação.

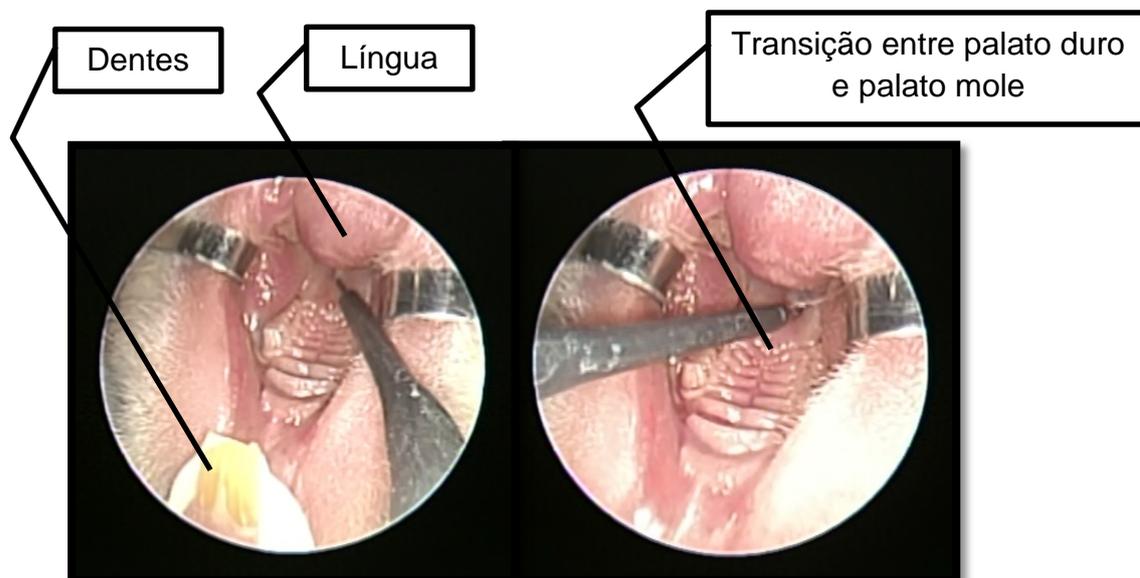


Figura 2a e 2b – inserção do eletrocautério transpalatal

Otoendoscopia: após o arrolamento inicial, todos os esquilos da Mongólia foram sequencialmente submetidos à otoendoscopia bilateral, sob anestesia geral, na primeira, quarta, oitava, décima-segunda e décima-sexta semanas, para avaliação do processo evolutivo da potencial patologia. As otoendoscopias foram avaliadas quanto à presença de descamação do conduto auditivo externo (CAE), tecido de granulação, secreção purulenta ou presença de acúmulo de queratina no conduto auditivo externo com ou sem invasão da orelha média, este último definido como colesteatoma segundo *Chole*¹.

Diferenciamos a descamação do conduto auditivo externo do acúmulo de queratina no CAE (colesteatoma) da seguinte maneira: o primeiro define-se pela presença de uma simples esfoliação do CAE, já o segundo caracteriza-se pela formação de grumos de queratina obstruindo parcial ou totalmente o CAE.

Seguimento: quarenta animais foram inicialmente incluídos no estudo, vinte para o grupo intervenção e vinte para o grupo controle. Utilizamos dezesseis semanas como tempo de seguimento, estabelecido a partir de *Wolfmann et al (1986)*²⁹ que demonstraram em seu trabalho que 75% dos animais desenvolveram colesteatoma após esse período de acompanhamento. Tivemos cinco perdas ao longo do estudo, três pertencentes ao grupo controle e duas ao grupo intervenção. Dois animais, ambos do grupo intervenção, foram eutanasiados devido à perda de peso corporal acima dos valores aceitáveis pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA)⁵⁰, um deles pode ser incluído na análise já que pudemos acompanhá-lo por pelo menos quatro semanas. Outra perda ocorreu pela morte do animal secundária a importantes lesões provocadas após briga com outro animal que estava em mesma caixa moradia. Este pertencia ao grupo controle, sendo que até aquele momento as otoendoscopias estavam normais em ambas às orelhas. As outras duas perdas ocorreram na indução anestésica, ambas na semana um de avaliação, que evoluíram para parada cardiorrespiratória. Os animais pertenciam ao grupo controle e ambos eram fêmeas, as quais, de maneira geral, tiveram comportamento mais agressivo e apresentaram maior incidência de sinais epiléticos durante os momentos de estresse ao longo do estudo.

Histologia: todos os animais que chegaram ao final do estudo foram eutanasiados utilizando sobredose anestésica de isoflurano (9-12%) por via inalatória até parada cardiorrespiratória e comprovação do óbito pelo médico veterinário responsável. Após isso, tiveram seus ossos temporais retirados, armazenados em solução de formol e posteriormente submetidos à análise histológica. As primeiras cinquenta e quatro peças foram descalcificadas com ácido nítrico 10%

trocado a cada 48 horas. O grau de descalcificação foi aferido utilizando uma agulha fina em cada uma dessas trocas, a qual foi considerada como ideal ao transfixar o osso com discreta resistência, sem quebrá-lo. As dezoito peças restantes foram descalcificadas com EDTA trocados a cada 48 horas. Em média, a descalcificação atingiu seu estágio ideal após sete a dez dias.

Em seguida, as peças foram incluídas em parafina e cortadas através de um micrótomo utilizando cortes de 10µm no plano axial. Utilizamos como parâmetro para realização dos cortes das peças o nível midmodiolar que continham em um mesmo plano axial a orelha interna, a orelha média e o conduto auditivo externo. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e avaliadas, juntamente com a patologista responsável pela unidade, utilizando um microscópio óptico binocular E100 Nikon® com aumento de sessenta vezes. Na Figura 3, podemos observar uma imagem histológica de uma orelha normal de um esquilo da Mongólia demonstrando a cóclea, orelha média, membrana timpânica e conduto auditivo externo.

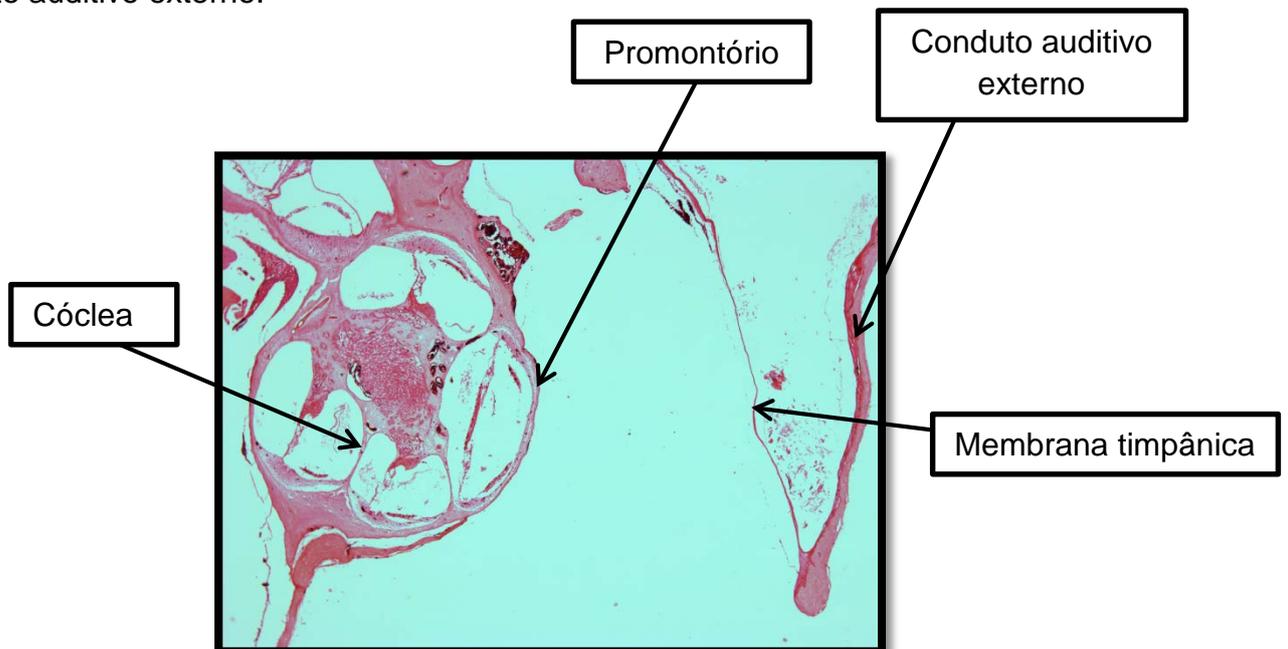


Figura 3 – histologia – orelha normal

Colesteatoma: definimos a presença de colesteatoma utilizando os seguintes parâmetros:

- Endoscopia: não há na literatura clara definição de colesteatoma em esquilos da Mongólia utilizando a otoendoscopia. Conforme descrito anteriormente, consideramos a presença de agrupamentos de queratina no conduto auditivo externo e sobre a membrana timpânica, com presença ou não de secreção purulenta, invadindo ou não a orelha média, como definição de colesteatoma (Figura 4).

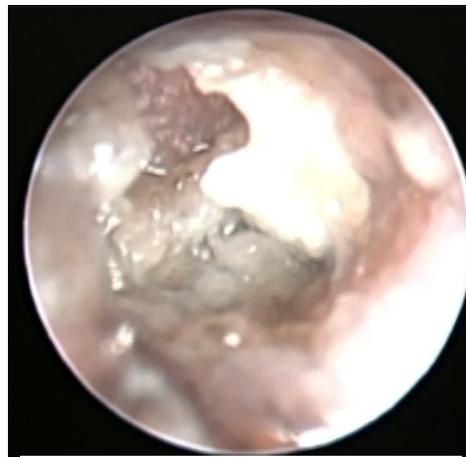


Figura 4 – colesteatoma

- Histologia: de acordo com *Chole et al (1981)*¹, define-se colesteatoma através da histologia pela presença de acúmulos de queratina preenchendo total ou parcialmente o conduto auditivo externo com ou sem invasão da orelha média e bula (Figura 5).

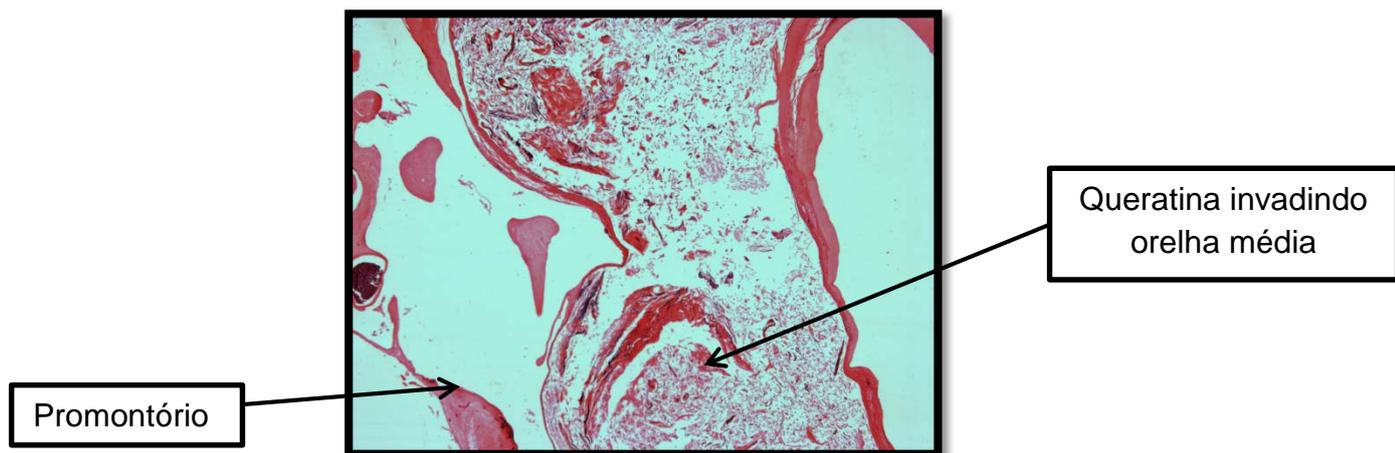


Figura 5 – colesteatoma

Após definido o diagnóstico de colesteatoma, conforme descrito acima, este foi classificado histologicamente de acordo com *Chole et al (1981)*¹. Não há classificação otoendoscópica de colesteatoma em esquilos da Mongólia até o presente momento.

Estágio 1: acúmulo de queratina no conduto auditivo externo sem envolvimento da membrana timpânica (Figura 6);

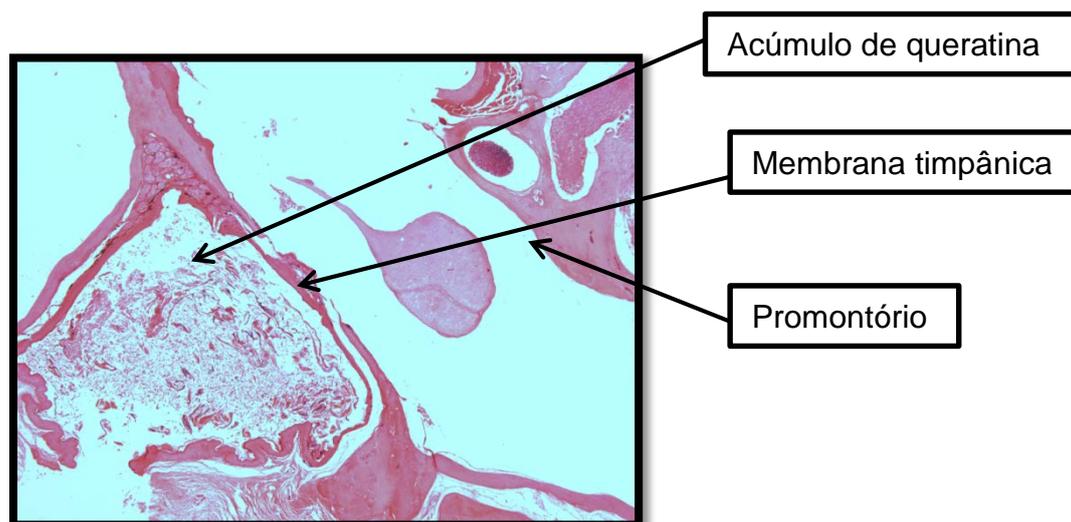


Figura 6 – colesteatoma grau 1

Estágio 2: queratina preenchendo o conduto auditivo externo e deslocando medialmente a membrana timpânica (Figura 7);

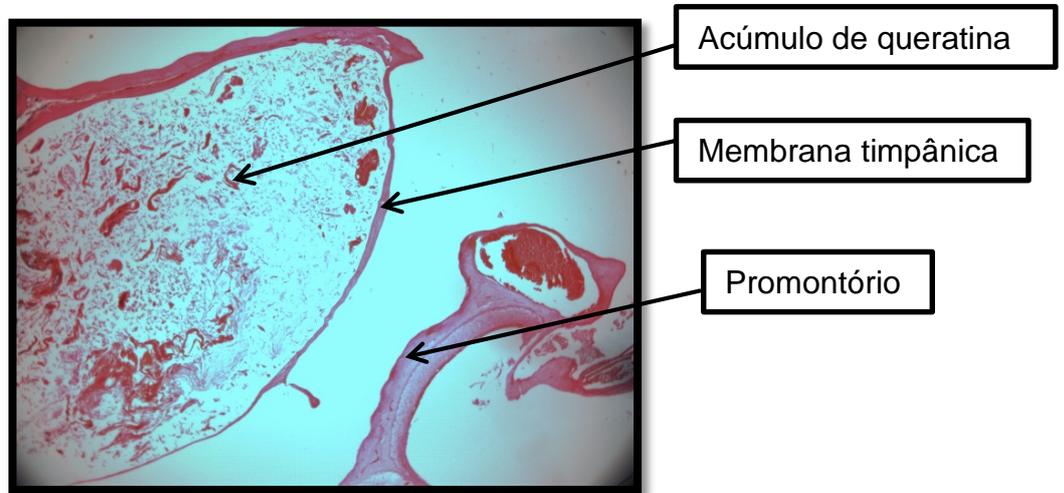


Figura 7 – colesteatoma grau 2

Estágio 3: membrana timpânica deslocada medialmente tocando o promontório do animal (Figura 8);

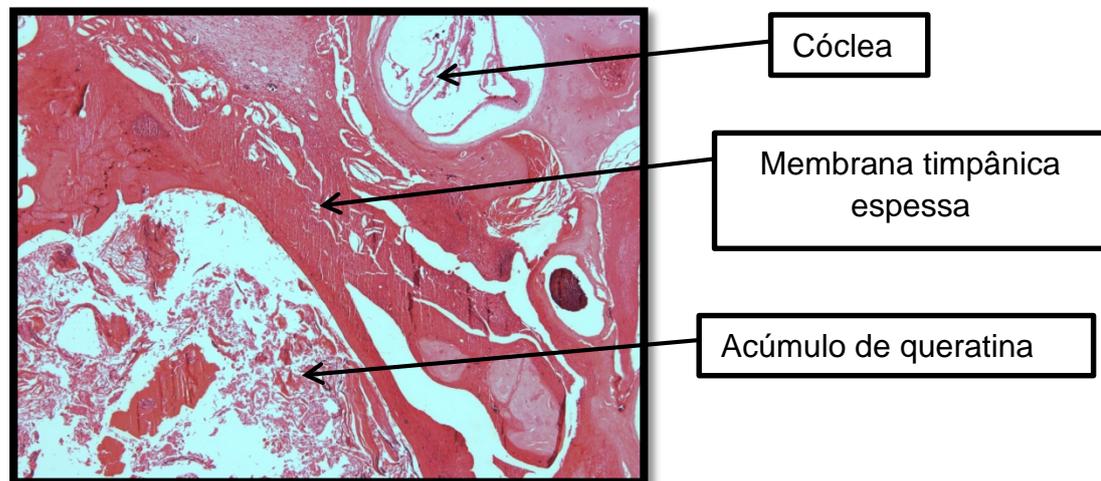


Figura 8 – colesteatoma grau 3

Estágio 4: preenchendo completamente a bula (Figura 9);

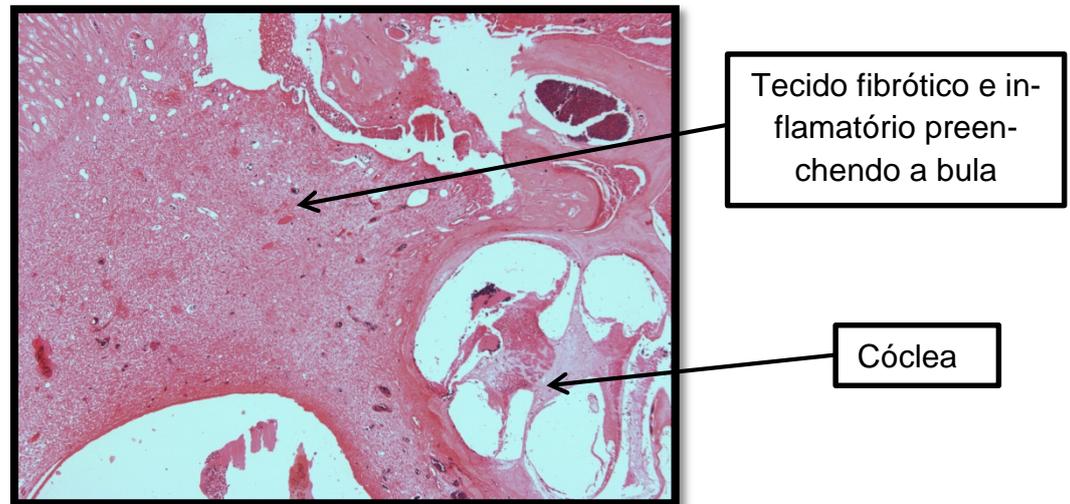


Figura 9 – colesteatoma grau 4

Estágio 5: extensão intracraniana;

A histologia foi analisada conjuntamente pelo pesquisador e pela patologista responsável, na unidade de experimentação animal, e cada lâmina foi avaliada quanto à presença de tecido de granulação, secreção purulenta, granulomas de colesterol e colesteatoma.

Análise estatística: a análise dos dados do estudo foi realizada utilizando o cálculo de incidências e comparação com os dados já existentes na literatura. O cálculo de amostra foi realizado utilizando uma incidência aproximada de desenvolver colesteatoma de aproximadamente 45%³ no grupo controle e 85%¹⁶ no grupo intervenção, conforme demonstra a literatura^{3,16}. Para uma diferença esperada de 35% entre os grupos, poder estatístico de 80%, alfa de 0,05, seriam necessários vinte animais em cada um dos grupos. A diferença entre os grupos foi calculada utilizando qui-quadrado e a comparação entre os testes diagnósticos com o teste de McNemar.

Resultados

Quarenta animais foram arrolados para o estudo, em dois grupos, e acompanhados por dezesseis semanas. Conforme fluxograma do estudo (Figura 1), quatro animais não foram incluídos na análise, totalizando setenta e duas orelhas estudadas. Os grupos foram divididos sem randomização e não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre as características dos seus participantes (Tabela 1).

Tabela 1

	Intervenção	Controle	
Idade	5,3 meses	5,2 meses	
Peso	88,8g	81,8g	p = 0,08
Sexo (M/F)	17/3	17/3	

Tabela 1: linha de base

Ao final de dezesseis semanas de acompanhamento, observamos através da análise histológica (Tabela 2) a formação de colesteatoma em 29 das 38 orelhas no grupo intervenção (76,3%) e 18 das 34 orelhas no grupo controle (52,9%), diferença essa que foi estatisticamente significativa ($p=0,027$). Utilizando a classificação proposta por *Chole et al* (1981)¹, verificamos, por meio da análise histológica, a presença de colesteatomas com graduação que variou de 1 a 4 e não obtivemos nenhum caso de doença em grau 5, com invasão do sistema nervoso central. Dos 47 colesteatomas formados, 25 (53,1%) apresentaram graduação histológica grau 1, sendo que 13 pertenciam ao grupo controle

(13/18 - 72,2%) e 12 ao grupo intervenção (12/29 - 41,3%), conforme Tabela 3. Dentre essas, apenas 14/25 orelhas apresentavam acúmulo de queratina (colestomatoma) ocluindo totalmente o conduto auditivo externo, sendo 8 no grupo intervenção e 6 no grupo controle. A presença de doença em estágios mais avançados (graus 2, 3 e 4) foi mais frequente no grupo intervenção (58,6%) em relação ao grupo controle (27,9%), com significância estatística ($p=0,039$) (Tabela 4).

Se subdividirmos os colesteatomas grau 1 pela histologia: 1) queratina ocluindo parcialmente o CAE, 2) queratina ocluindo totalmente o CAE; e utilizarmos em uma subanálise apenas os grau 1 com queratina ocluindo totalmente o CAE, somados aos graus 2,3 e 4, obteremos uma redução na incidência da patologia em cada um dos grupos em estudo (65,7% - grupo intervenção / 32,2% - grupo controle).

Tabela 2 – Colesteatoma pela Histologia

	Intervenção	Controle	
SIM (%)	29/38 (76,3%)	18/34 (52,9%)	
NÃO (%)	9/38 (23,6%)	16/34 (47,1%)	$p = 0,027$

Tabela 2: colesteatoma pela histologia

Tabela 3 – Grau do Colesteatoma pela Histologia

	Intervenção	Controle
GRAU 1 (%)	12/29 (41,3%)	13/18 (72,2%)
GRAU 2 (%)	6/29 (20,6%)	1/18 (5,6%)
GRAU 3 (%)	3/29 (10,3%)	1/18 (5,6%)
GRAU 4 (%)	8/29 (27,6%)	3/18 (16,7%)

Tabela 3: classificação do colesteatoma pela histologia

Tabela 4 – Colesteatoma em graus avançados pela Histologia

	Intervenção	Controle	
GRAUS 2,3,4 (%)	17/29 (58,6%)	5/18 (27,9%)	p=0,039

Tabela 4: colesteatoma em graus avançados

Na análise endoscópica (Tabela 5), verificou-se a presença de colesteatoma em 11 das 38 orelhas no grupo intervenção (28,9%) e em 7 das 34 orelhas no grupo controle (20,6%), diferença sem significância estatística ($p=0,586$). Utilizando as avaliações otoendoscópicas seriadas, observamos que o desenvolvimento dos colesteatomas ocorreu em média com 10,5 semanas nos animais submetidos à intervenção, em comparação a 14,2 semanas no grupo controle, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,052$) (Tabela 6).

Tabela 5 – Colesteatoma pela Otoendoscopia

	Intervenção	Controle	
SIM (%)	11/38 (28,9%)	7/34 (20,6%)	
NÃO (%)	27/38 (71,1%)	27/34 (79,4%)	p = 0,586

Tabela 5: colesteatoma pela otoendoscopia

Tabela 6– Tempo até formação do colesteatoma

	Intervenção	Controle	
MÉDIA (semanas)	10,5	14,2	p=0,052

Tabela 6: tempo até formação do colesteatoma

Outros achados nas avaliações histológicas foram a presença de granuloma de colesterol (3/38 intervenção – 1/34 controle), tecido de granulação (10/38 intervenção – 4/34 controle) e secreção purulenta (9/38 intervenção – 4/34 controle), cujas incidências não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Já nas análises endoscópicas, além de otoscopias normais (Figura 10), verificamos com grande frequência as opacidades da pars flácida (Figura 11) e as retrações da pars flácida (Figura 12a e 12b), também sem diferença estatística entre os grupos.

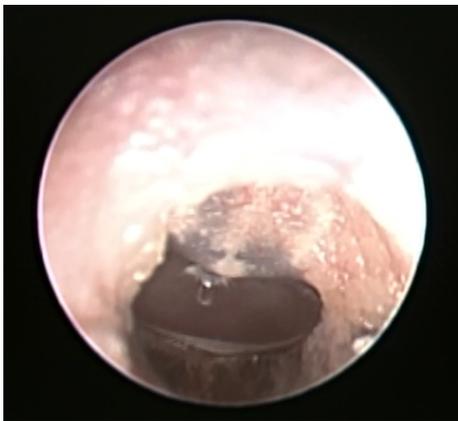


Figura 10 – otoscopia normal



Figura 11 – otite média secretora com opacidade e hiperemia da pars flácida

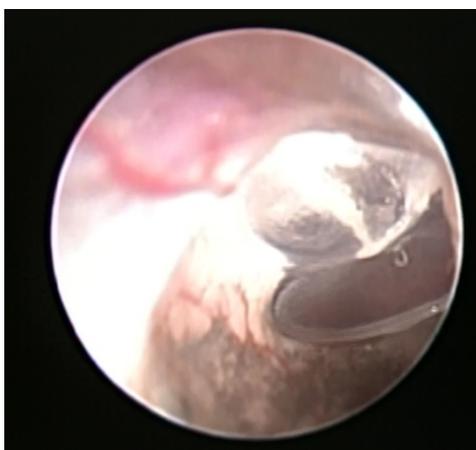


Figura 12a – retração pars flácida



Figura 12b – retração pars flácida

Empregando a avaliação histológica como padrão-ouro para o diagnóstico do colesteatoma em esquilos da Mongólia, a otoendoscopia pode ser considerada como um método diagnóstico de baixa sensibilidade (34%), porém com alta especificidade (95,8%) (Tabela 7). A presença de doença identificada na análise otoendoscópica não se correlacionou com colesteatomas mais avançados verificados na análise histológica.

Descamação do conduto auditivo externo ou acúmulo de cerúmen, com ou sem secreção purulenta, foram observados em 20/72 orelhas (27,77%) na análise otoendoscópica e em 68/72 orelhas (94,4%) na análise histológica.

Tabela 7 – Otoendoscopia

Sensibilidade	34%
Especificidade	95,8%
VPP	89%
VPN	59,2%

Tabela 7 – Teste diagnóstico

VPP: valor preditivo positivo VPN: valor preditivo negativo

Discussão

Apesar dos avanços alcançados no conhecimento do colesteatoma nos últimos anos, ainda carecemos do seu entendimento pleno, principalmente no que se refere a sua patogênese. Esses hiatos na compreensão dessa intrigante doença dificultam seu tratamento e, sobretudo, sua prevenção. Em nosso grupo

de pesquisa, diversos trabalhos clínicos foram realizados com o intuito de avançar no esclarecimento dos aspectos fisiopatológicos envolvidos nesse processo^{44,45,46,47}. Porém, a dificuldade na realização de estudos histológicos e com longo tempo de acompanhamento, além da baixa incidência de colesteatoma em humanos, entravam essa evolução. Pensando nisso, estudos experimentais tornam-se fundamentais na busca por preencher essas lacunas e, dentre as espécies animais, os esquilos da Mongólia despontam como uma das mais interessantes e operacionais.

Neste trabalho, obtivemos, no grupo controle, colesteatomas através da análise histológica em mais da metade das orelhas acompanhadas, ratificando a altíssima propensão ao desenvolvimento espontâneo desta doença em esquilos da Mongólia³. Além disso, a obliteração da tuba auditiva aumentou significativamente essa incidência, ocorrendo em mais de três quartos das orelhas submetidas à intervenção. Dessa forma, inferimos que a disfunção tubária parece ter agregado risco ao desenvolvimento desta patologia nesses animais.

Durante as avaliações sequenciais através da otoendoscopia pudemos verificar alguns indícios que nos auxiliam na explicação dessa evidente vocação que os esquilos da Mongólia possuem para a formação do colesteatoma. A ocorrência de alterações ao exame otoendoscópico, mesmo no grupo controle, ocorreu com elevada frequência. Dentre estas, as principais foram retração da pars flácida, opacificação da pars flácida e descamação do CAE. Esta última, frequentemente, ocasionava oclusão completa do CAE, condição crucial para a gênese do colesteatoma nesses animais. Neste trabalho, a diferenciação entre uma simples descamação do conduto auditivo externo (Figuras 13 e 15) e acúmulo de queratina com potencial patológico (Figuras 14 e 16) nem sempre foi tarefa fácil

por meio da avaliação otoendoscópica e histológica. Outros estudos claramente são necessários buscando viabilizar essa distinção, sendo que a análise das características da microestrutura do epitélio que recobre o conduto auditivo externo provavelmente possua papel chave nessa questão.

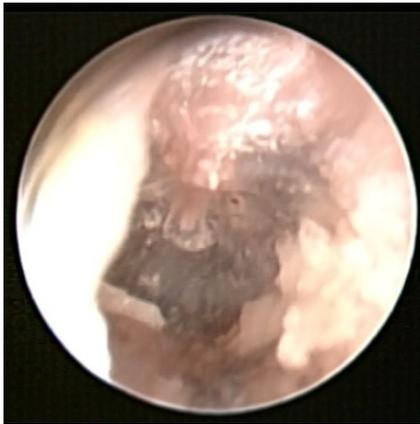


Figura 13 – descamação do conduto auditivo externo

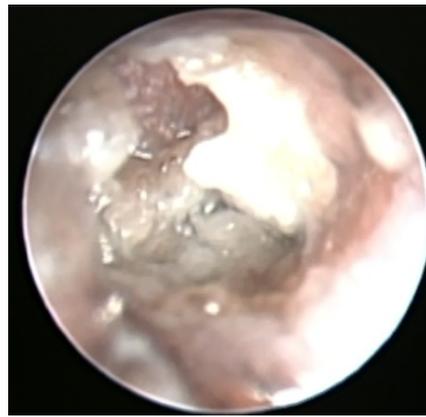


Figura 14 – colesteatoma

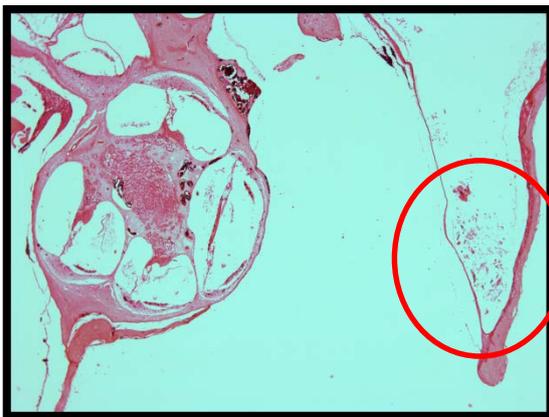


Figura 15 – descamação do conduto auditivo externo (círculo vermelho)

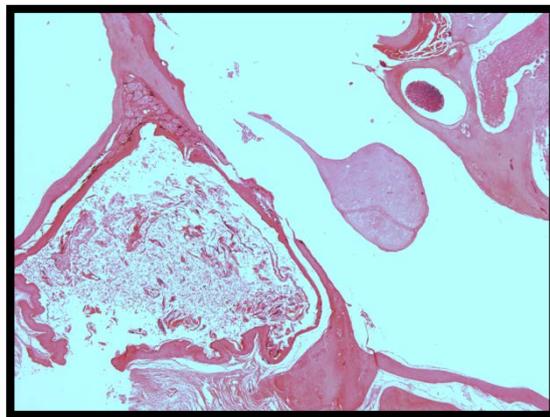


Figura 16 – colesteatoma

Comparando os dois métodos diagnósticos utilizados nesse trabalho, os colesteatomas foram observados com maior frequência na histologia (47/72 – 65,2%) em relação à otoendoscopia (18/72 – 25%). Segundo *Chole et al*¹, o colesteatoma grau 1 pela histologia é definido como acúmulo de queratina ocluindo

parcial ou totalmente o conduto auditivo externo, sem envolvimento da membrana timpânica. No entanto, se utilizarmos para o diagnóstico apenas os casos em que se identificou oclusão completa do conduto auditivo externo, obteremos uma incidência menor (33/72 - 45,8%) e mais próxima à observada na análise otoendoscópica. Além disso, ao avaliarmos novamente os colesteatomas grau 1 pela histologia, observaremos que somente 9/25 (36%) orelhas foram também classificadas como colesteatoma pela otoendoscopia. Contudo, ao incluirmos nesta análise apenas as orelhas com oclusão completa do CAE, essa proporção aumenta significativamente (8/14 – 57,1%). Ponderando isso, talvez devêssemos considerar uma modificação na classificação histológica proposta por *Chole et al*¹ e subdividir os colesteatomas grau 1 em 1a (oclusão parcial do CAE) e 1b (oclusão total do CAE), já que este parece demonstrar uma melhor correlação com a avaliação clínica (otoendoscopia).

Constatamos, ainda, que seis (6/14) orelhas apresentaram queratina ocluindo totalmente o conduto auditivo externo pela análise histológica, porém não foram classificadas dessa maneira na otoendoscopia. Provavelmente isso se deva ao fato de limitarmos os cortes histológicos a uma região específica da orelha do animal (nível midmodiolar), na qual se visualiza o CAE em apenas um corte. É possível que a análise histológica baseada neste corte não retrate o CAE em sua totalidade. O uso de óticas com elevada luminosidade e com amplo campo de visão possibilita avaliar adequadamente a membrana timpânica e o restante do CAE sem que um possível acúmulo de queratina fosse considerado como obliterativo.

Nos animais submetidos à obliteração da tuba auditiva observamos a presença de colesteatomas em graus mais avançados (graus 2, 3, 4), em comparação aos controles (58,6% vs. 27,9%), com significância estatística. Considerando que a obliteração da tuba auditiva induza de forma mais precoce o desenvolvimento desta patologia em esquilos da Mongólia, poderíamos inferir que o grupo que foi submetido à intervenção teve possibilidade de, ao longo das dezesseis semanas, apresentar um maior tempo para progressão da doença e, conseqüentemente, desenvolver colesteatomas com maiores dimensões. Buscando respaldar esse achado, analisamos por meio da otoendoscopia o tempo até o surgimento da patologia nos grupos estudados e notamos que, em média, este ocorreu com 10,5 semanas no grupo intervenção e com 14,2 semanas no grupo controle, sem significância estatística, porém com tendência a isto ($p=0,052$).

McGinn et al (1982)¹ demonstraram a evolução do colesteatoma em esquilos da Mongólia através de um acúmulo de queratina na orelha externa, com posterior avanço em direção à orelha média e bula do animal; em nosso estudo, identificamos de forma clara este fluxo por meio das otoendoscopias seriadas. Presumimos, assim, que a formação da doença nesses animais parece ocorrer inicialmente na porção medial do conduto auditivo externo e camada lateral da membrana timpânica e que gatilhos, possivelmente inflamatórios, deflagrariam esse processo evolutivo. De forma distinta à prevista no início deste estudo, quando hipotetizamos que a origem do colesteatoma em esquilos da Mongólia estaria relacionada a retrações na pars flácida da membrana timpânica, observamos de forma clara, por meio das otoendoscopias seriadas, que esta patologia se inicia, de fato, no conduto auditivo externo e, então, avança medialmente em

direção à bula desses animais. Desse modo, ao considerarmos que uma das hipóteses mais bem aceitas para explicar os colesteatomas em humanos consiste na teoria da invaginação da membrana timpânica, podemos concluir que os colesteatomas dos esquilos da Mongólia possuem uma gênese distinta da observada na espécie humana. Porém, outros estudos conduzidos especificamente com o propósito de elucidar esses questionamentos são necessários.

Ademais, a hiperproliferação de células epiteliais possivelmente seja um dos mecanismos envolvidos na patogênese da otite média crônica colesteatomatosa, a qual tem sido embasada tanto em estudos experimentais^{25,26} quanto em humanos^{27,28}. *Kim et al* (2002)²⁴ demonstraram que ocorre um aumento na produção de citoqueratinas (CK) nos colesteatomas em esquilos da Mongólia, principalmente CK 13/16, e que esta elevação ocorre predominantemente nos locais de maior expansão da doença. Isso sugere que alterações dos queratinócitos epiteliais ocorram durante a formação desta patologia e que mecanismos migratórios e hiperproliferativos estariam envolvidos nessa patogênese. Em nosso estudo, a presença de hiperproliferação das camadas epiteliais (Figuras 17 e 18) foi verificada nos casos em que houve desenvolvimento do colesteatoma, ratificando esses aspectos encontrados em trabalhos prévios. Porém, outros trabalhos com a finalidade de identificar alterações relacionadas à microestrutura do epitélio são essenciais, permitindo uma análise adequada dessas características.



Figura 17 – tecido epitelial normal do CAE.



Figura 18 – hiperproliferação epitelial e de queratina.

Conclusão

Neste trabalho, obtivemos, através da obliteração da tuba auditiva, um aumento estatisticamente significativo na incidência de colesteatoma em esquilos da Mongólia, corroborando, dessa forma, os dados da literatura. Além disso, a doença mostrou-se mais agressiva no grupo submetido à intervenção, alcançando maior graduação pela classificação de *Chole et al*¹ em comparação ao grupo controle.

Isto posto, a realização de otoendoscopias seriadas, algo inexistente na literatura até esse trabalho, nos permitiu evoluir no entendimento desta patologia em esquilos da Mongólia. Entretanto, diversas lacunas ainda persistem e outros estudos seguindo essa mesma linha de pesquisa são fundamentais e já estão em andamento. Esclarecer a patogênese que envolve o desenvolvimento do colesteatoma nesta espécie animal é essencial para que, dessa forma, possamos também avançar na compreensão desta intrigante doença em humanos.

Referências Bibliográficas

1. McGinn MD, Chole RA, Henry KR. Cholesteatoma. Experimental induction in the Mongolian Gerbil, *Meriones Unguiculatus*. *Acta Otolaryngol*. 1982, 93:61–67. [PubMed: 7064697]
2. Sadé J. Retraction pockets and attic cholesteatomas. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1980, 34:62–84.
3. Chole RA, Henry KR, McGinn MD. Cholesteatoma: Spontaneous occurrence in the mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. *Am J Otol*. 1981;2:204–10.
4. Fulghum RS, Chole RA. Bacterial flora in spontaneously occurring aural cholesteatomas in Mongolian gerbils. *Infect Immun*. 1985; 50:678–681. [PubMed: 4066027]
5. Attallah MS. Microbiology of chronic suppurative otitis media with cholesteatoma. *Saudi Med J*. 2000; 21:924–927. [PubMed: 11369953]
6. Tinling SP, Chole RA . Gerbilline cholesteatoma development Part I: Epithelial migration pattern and rate on the gerbil tympanic membrane: comparisons with human and guinea pig. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006 May;134(5):788-93

7. Tinling SP, Chole RA . Gerbilline cholesteatoma development. Part II: temporal histopathologic changes in the tympanic membrane and middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Jun;134(6):953-60
8. Tinling SP, Chole RA. Gerbilline cholesteatoma development Part III. Increased proliferation index of basal keratinocytes of the tympanic membrane and external ear canal. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Jul;135(1):116-23.
9. Lima JP, Ariga S, Velasco I, Schochat E. Effect of the ketamine/xylazine anesthetic on the auditory brainstem response of adult gerbils. *Braz J Med Biol Res.* 2012 Dec;45(12):1244-7. Epub 2012 Sep 11.
10. Von Unge M, Decraemer WF, Buytaert JA, Dirckx JJ. Evaluation of a model for studies on sequelae after acute otitis media in the Mongolian gerbil. *Acta Otolaryngol.* 2009 Mar;129(3):261-7.
11. Larsson C, von Unge M, Bagger-Sjöbäck D. Tympanic membrane changes in experimental cholesteatoma in the gerbil. *Am J Otol.* 1999 May;20(3):309-16.
12. Jung JY, Lee DH, Wang EW, Nason R, Sinnwell TM, Vogel JP, Chole RA. *P. aeruginosa* infection increases morbidity in experimental cholesteatomas. *Laryngoscope.* 2011 Nov;121(11):2449-54.

13. McGinn MD et al. Cholesteatoma induction. Consequences of external auditory canal ligation in gerbils, cats, hamsters, guinea pigs, mice and rats. *Acta Otolaryngol.* 1984 Mar-Apr;97(3-4):297-304.
14. Aberg B et al. A comparative study of enzyme histochemical features in the gerbilline and human cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 1990 Jan-Feb;109(1-2):130-6.
15. Chole RA et al. Cholesteatoma: spontaneous occurrence in the Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. *Am J Otol*, 1981 Jan, 2(3): 204-10.
16. Kim HJ et al. Experimental models of aural cholesteatomas in Mongolian gerbils. 1998 Feb;107(2) 129-34.
17. Da Costa SS, Cruz OLM, De Oliveira, JAA. *Otorrinolaringologia Princípios e Prática*. 2ª edição, 2006.
18. Chole RA, Gagnon PM, Vogel JP. Inactivation of specific *Pseudomonas aeruginosa* biofilm factors does not alter virulence in infected cholesteatomas. *Otol Neurotol.* 2014 Oct;35(9):1585-91.
19. Choufani G, Roper N, Delbrouck C, Hassid S, Gabius HJ. Animal model for cholesteatoma induced in the gerbil: will the profiles of differentiation/growth-regulatory markers be similar to the clinical situation? *Laryngoscope.* 2007 Apr;117(4):706-11.

20. Wolfman DE, Tinling SP. Systemic osteoclast activation by localized pressure. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993 Feb;119(2):165-8.
21. Antunes ML, Fukuda Y, Penido Nde O, Ferreira R. Effect of trans-retinoic acid in the inhibition of cholesteatoma in guinea pigs. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008 Jan-Feb;74(1):53-60.
22. Hinohira Y, Gyo K, Yanagihara N. Experimental cholesteatomas arising from autologous free skin grafting in the middle ear cavity. *Acta Otolaryngol*. 1994 Sep;114(5):533-8.
23. Paparella MM, Hiraide F, Juhn SK, Kaneco J. Cellular events involved in middle ear fluid production. *Ann Rhinol Otol Laryngol*; 1970: 79(4): 766-79.
24. Kim HJ, Tinling SP, Chole RA. Increased proliferation and migration of epithelium in advancing experimental cholesteatomas. *Otol Neurotol* 2002; Nov; 23(6): 840-4.
25. Vennix PPCA, Kuijpers W, Tonnaer ELGM, et al. Cytokeratins in induced epidermoid formation and cholesteatoma lesions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;116:560–5.
26. Vennix PPCA, Kuijpers W, Peters TA, et al. Growth and differentiation of meatal skin grafts in the middle ear of the rat. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:1102–11.

27. Bujia J, Schilling V, Holly A, et al. Hyperproliferation-associated keratin expression in human middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 1993;113:364–8.
28. Sasaki H, Huang CC. Expression of cytokeratins 13 and 16 in middle ear cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;110: 310–7.
29. Wolfman, DE, Chole, RA. Experimental Retraction Pocket Cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1986; 95: 639-44.
30. Maniu A, Harabagiu O, Perde Schrepler M, Catana A, Fanuta B, Mogoanta CA. Molecular biology of cholesteatoma. *Rom K Morphol Embryol*. 2014;55(1):7-13.
31. Yoon TH, Schachern PA, Paparella MM, Aeppli DM. Pathology and pathogenesis of tympanic membrane retraction. *Am J Otolaryngol* 1990 Jan-Feb; 11(1):10-7.
32. Rosito LP, da Costa SS, Schachern PA, Dornelles C, Cureoglu S, Paparella MM. Contralateral ear in chronic otitis media: a histologic study. *Laryngoscope* 2007 Oct;117(10):1809-14.
33. Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of attic cholesteatoma: clinical and immunohistochemical support for combination of retraction theory and proliferation theory. *Am J Otol*. 2000 Nov;21(6):786-92.
34. Louw L. Acquired cholesteatoma pathogenesis: stepwise explanations. *J Laryngol Otol*. 2010 Jun;124(6):587-93.

35. Harris L, Cushing SL, Hubbard B, Fisher D, Papsin BC, James AL. Impact of cleft palate type on the incidence of acquired cholesteatoma. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013 May;77(5):695-8.
36. Spilsbury K, Ha JF, Semmens JB, Lannigan F. Cholesteatoma in cleft lip and palate: a population-based follow-up study of children after ventilation tubes. *Laryngoscope* 2013 Aug;123(8):2024-9.
37. Dominguez S, Harker LA. Incidence of cholesteatoma with cleft palate. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1988 Nov-Dec;97(6):659-60.
38. Vashishth A, Singh Nagar TR, Mandal S, Venkatachalam VP. Extensive intratemporal cholesteatomas: presentation, complications and surgical outcomes. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015 Feb; 272(2):289-9.
39. Wu JF, Jin Z, Yang JM, Liu YH, Duan ML. Extracranial and intracranial complications of otitis media: 22-year clinical experience and analysis. *Acta Otolaryngol* 2012 Mar;132(3):261-5.
40. Mor N, Finkel DA, Hanson MB, Rosenfeld RM. Middle ear cholesteatoma treated with a mastoidectomy: a systematic review of the measures used. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014 Dec;151(6):923-6.
41. Yamamoto-Fukuda T, Hishikawa Y, Shibata Y, Kobayashi T, Takahashi H, Koji T. Pathogenesis of middle ear cholesteatoma: a new model of experimentally induced cholesteatoma in Mongolian gerbils. *Am J Pathol* 2010 Jun;176(6):2602-6.

42. Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of sinus cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264:1137–43.
43. Sadé J, Avraham S, Brown M. Atelectasis, retraction pockets and cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 1981;92:501–12.
44. Da Costa SS, Rosito LP, Dornelles C, Sperling N. The contralateral ear in chronic otitis media: a series of 500 patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134:290–3.
45. Rosito LP, da Costa SS, Schachern PA, Dornelles C, Cureoglu S, Papparella MM. Contralateral ear in chronic otitis media: a histologic study. *Laryngoscope* 2007; 117:1809-1814.
46. Netto LFS, Costa SS, Sleifer P, Braga MEL. The impact of chronic suppurative otitis media on children's and teenagers' hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009; 73:1751-1756.
47. Silva MN, Muller Jdos S, Selaimen FA, Oliveira DS, Rosito LP, Costa SS. Tomographic evaluation of the contralateral ear in patients with severe chronic otitis media. *Braz J Otorhinolaryngol* 2013; 79:475-79.
48. Jackler RK, Santa Maria PL, Varsak YK, Nguyen A, Blevins NH. A new theory on the pathogenesis of acquired cholesteatoma: Mucosal traction. *Laryngoscope* 2015;125 Suppl 4:S1-S14.

49. Steinbach E, Gruninger G. Experimental production of cholesteatoma in rabbits by using non-irritants (skin tolerants). J Laryngol Otol. 1980 Mar;94(3):269-79.

50. Lei N° 11.794, de 8 DE Outubro de 2008.

Article in English

Abstract

Objective: Cholesteatomatous chronic otitis media is a disease with significant clinical impact but is incompletely understood. The difficulty in performing histological studies with long follow-up duration in humans is an important factor that interferes with this progress. Thus, the use of animal models is highly pertinent, and Mongolian gerbils have emerged as one of the most useful for this purpose. In this study, we aimed to induce cholesteatoma in Mongolian gerbils through obliteration of the eustachian tube, and to analyze disease progress through serial otoendoscopy.

Methods: The present study was conducted between March 2016 and November 2017 at the Animal Experimentation Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil). Forty Mongolian gerbils were divided into two groups of 20 animals each. In the control group, animals were only followed through serial otoendoscopies. In the intervention group, aside from follow-up, the animals underwent a eustachian tube obliteration procedure.

Results: At the end of 16 weeks' follow-up, cholesteatoma formation was observed in 29 of the 38 (76.3%) ears in the intervention group and in 18 of 34 (52.9%) in the control group; the difference that was statistically significant ($p = 0.027$). In addition, the presence of more advanced stages of disease (grades 2, 3 and 4) was more prevalent in the intervention group (58.6%) than in the control group (27.9%) ($p = 0.039$). In otoendoscopic analysis, cholesteatoma was evident in 11 of the 38 (28.9%) ears in the intervention group and in 7 of 34 (20.6%) in the control group ($p = 0.586$).

Conclusions: Obliteration of the eustachian tube significantly increased the incidence of cholesteatoma in Mongolian gerbils, which progressed more aggressively. Analysis using serial otoendoscopies suggests that cholesteatoma in Mongolian gerbils begins in the external auditory canal, then progresses toward the bulla in these animals.

Key words: cholesteatoma, mongolian gerbils, experimental models.

Introduction

Cholesteatomatous chronic otitis media is a pathology with high morbidity, high costs to the health system, and is associated with significant risk for complications, both intratemporal and extratemporal¹⁷. Over the past decades, understanding of the disease has evolved, especially in clinical and pathophysiological aspects. However, many gaps persist in our understanding of its pathogenesis, and several theories have been proposed. In our research group, we understand that the theory of tympanic invagination is one of the most operative. Clinical and experimental evidence^{2,31,32,33,34} has demonstrated that the development of this pathology follows a sequence of progressive tympanic retraction, loss of its self-cleaning, and cholesteatoma formation. Nevertheless, previous studies have failed to clearly demonstrate this evolution^{42,43}.

The low incidence of this pathology in humans and the difficulty in ensuring follow-up of these patients over long periods are factors that have probably hindered the complete elucidation of the pathogenesis of this disease. Therefore, in our search for other means to explain the natural history of chronic otitis media, we initiated study of the contralateral ear as a method to infer events in the main

ear in 2008. We propose this when considering that the anatomy between the main ear and the contralateral ear exhibit similar characteristics, share a common embryological evolution, and that they are subject to similar environmental triggers. In these experiments, we found a high prevalence of alterations in the contralateral ear when analyzing clinical, histological, audiological and radiological aspects^{44,45,46,47}. In a study by Rosito et al (2018), prelo, the authors analyzed patients diagnosed with cholesteatoma and found that 95.8% of contralateral ear alterations consisted of tympanic retractions, otoscopic signs that preceded previous retractions, or evidence of progression of these retractions, such as the cholesteatoma itself. These findings revealed a powerful correlation between the growth patterns of cholesteatoma in the main ear and the sites of retraction of the tympanic membrane in the contralateral ear. This, therefore, suggests that the invagination of the tympanic membrane would be an event that, through mechanisms not yet fully elucidated, would precede the development of cholesteatoma. Eustachian tube dysfunction causing ventilation impairment and consequent negative pressure within the middle ear appears to be an important causal factor. Studies involving individuals with cleft palate—an excellent model for the study of tubal dysfunction—demonstrate relevant prevalences of chronic otitis media in this population^{35,36,37}.

Although clinical evidence supports the concept of an evolutionary process leading to a tympanic retraction until the formation of a cholesteatoma, it remains unknown why innumerable retractions, often severe, do not exhibit this behavior and remain stable. There are likely many inflammatory and infectious triggers necessary for this pathological process to evolve; however, these questions still

lack full understanding. In search of adequate answers and, considering the difficulty in performing histological and long-term follow-up studies of this intriguing disease in humans, the use of animal models for this purpose is highly valuable. Among these, Mongolian gerbils have emerged as one of the most operational species to meet this need because, together with humans, they are the only species to develop cholesteatomas spontaneously. According to Chole et al. (1981)¹⁵, cholesteatomas in Mongolian gerbils exhibit several characteristics similar to those of humans, both macroscopically and microscopically. Some studies have also shown that, with the obliteration of the eustachian tube, the incidence of cholesteatomas rises considerably^{13,16}, with characteristics very similar to those that occur spontaneously¹. Taking these questions into consideration, the present study aimed to develop an animal model to study chronic cholesteatomatous otitis media through the obliteration of the eustachian tube in the Mongolian gerbil. Through serial otoendoscopies, something that has not been available in the literature to date, we analyzed evolutionary characteristics in the development of this disease, seeking to advance understanding of its complex pathogenesis.

Methods

This research was performed at the Animal Experimentation Unit (UEA) of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (HCPA, Porto Alegre, Brazil), between March 2016 and November 2017. Forty Mongolian gerbils > 3 months of age of both sexes were included in the study and divided into two groups of 20 animals each (Figure 1).

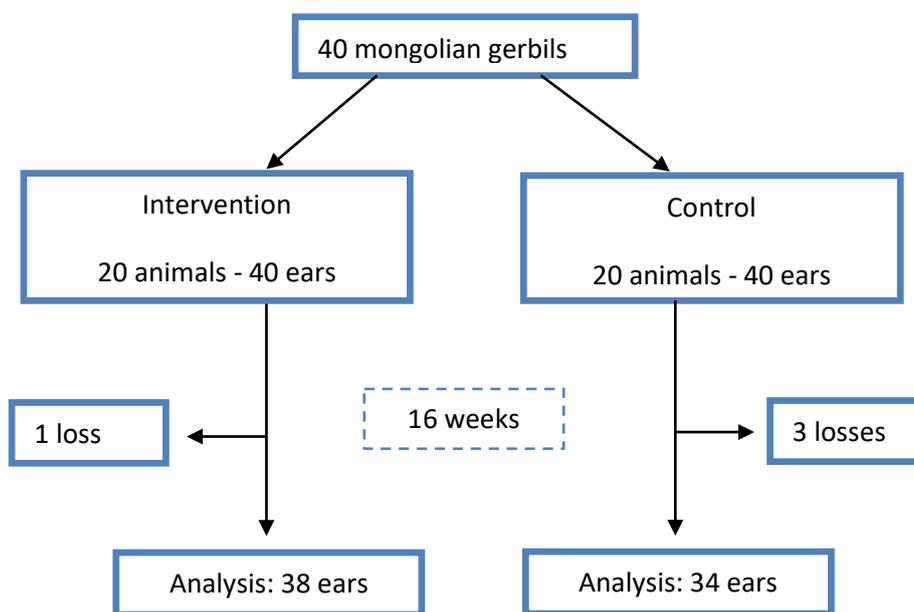


Figure 1 – study flow chart

All Mongolian gerbils underwent bilateral otoendoscopy preoperatively under general anesthesia for recording and documentation. A Karl-Storz optical fiber (0°, 2.8 mm, and 18 cm) was used for this stage, exclusively for use in the animal experimentation unit.

Procedure

Obliteration of the eustachian tube in Mongolian gerbils was performed by cauterization of the tubal ostium bilaterally. The animals underwent the procedure while under general anesthesia using inhaled isoflurane, intraperitoneal tramadol (30 mg/kg), and subcutaneous vasoconstrictor (1:200,000) bupivacaine (4 mg/kg to 0.5%).

Cauterization was performed using monopolar cautery with a needle tip inserted in a transpalatal approach, without direct visualization of the tubal ostia and, therefore, without visual confirmation of the obliteration of the eustachian tube. According to an anatomical study by Chole et al (1986)²⁹, the needle was introduced approximately 5 mm posterior to the transition between the hard palate and soft palate of the animal, and angled approximately 30° to the right initially and, after, using the same angulation, to to the left (Figures 2a and 2b). To date, there has been no clear evidence in the literature regarding the intensity and duration of cauterization. Therefore, these parameters were adjusted and optimized at the beginning of the study. There were two losses (i.e., death) at this stage, most likely related to excess cauterization in the nasopharynx and soft palate during the procedure. Both animals developed clear signs of acute otitis media after the first week and, due to their inappetence, lost more than 25% of their initial body weight, and were euthanized according to the regulations of the Committee on Animal Ethics (CEUA)⁵⁰. A power of 12 mV, held for a period of 1 s, was used on each side for cauterization of both tubal ostia (Figures 2a and 2b). In the immediate postoperative period, analgesia included intramuscular dipyrone (500 mg/kg) in animals that underwent the intervention. Maintenance of analgesia was performed using tramadol hydrochloride (10 mg/kg) every 12 h intraperitoneally in animals exhibiting clinical signs of pain such as inappetence and agitation.

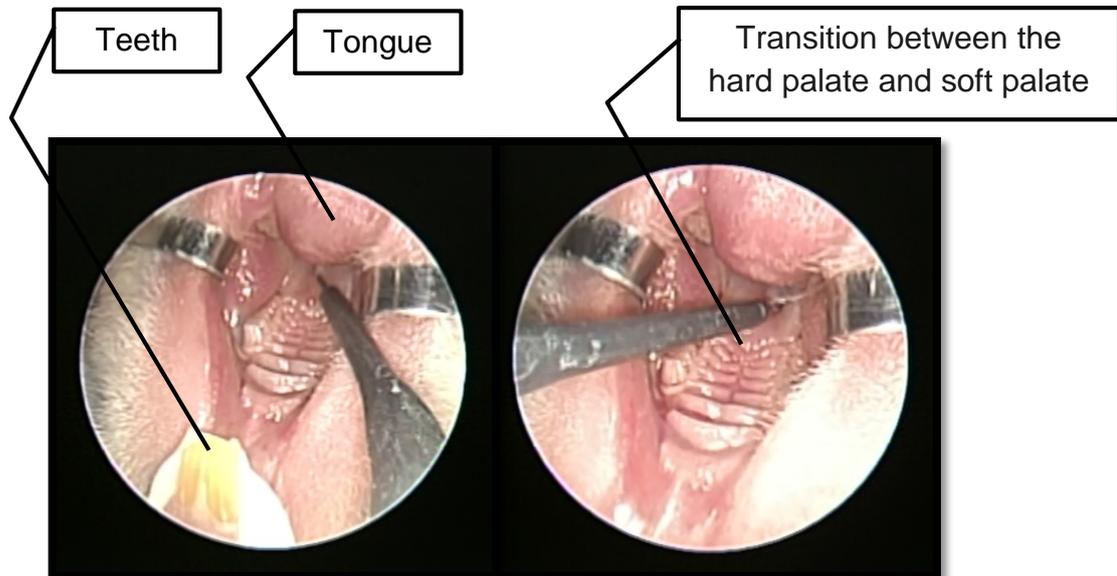


Figure 2a e 2b – needle tip inserted in a transpalatal approach

Otoendoscopy

To evaluate the evolutionary process of potential pathology, all Mongolian gerbils sequentially underwent bilateral otoendoscopy under general anesthesia at one, four, eight, 12 and 16 weeks. Otoendoscopies were evaluated for the presence of external auditory canal desquamation (CAE), granulation tissue, purulent secretion, or presence of keratin accumulation in the external auditory canal with or without middle ear invasion; the latter defined as a cholesteatoma according to Chole et al¹.

CAE was differentiated from keratin accumulation in the CAE (cholesteatoma) in the following way: the former was defined by the presence of a simple exfoliation of the CAE, while the latter was characterized by the formation of partially or totally obstructing keratin clumps in the CAE.

Follow-up

Forty animals were initially included in the study: 20 in the intervention group; and 20 in the control group. Sixteen weeks was used as a follow-up time,

established by Wolfmann et al. (1986)²⁹, who reported that 75% of animals developed cholesteatoma after this follow-up period. Five losses occurred throughout the study: three in the control group and two in the intervention group. Two animals, both in the intervention group, were euthanized due to the loss of body weight above values acceptable to the CEUA⁵⁰; however, one was included in the analysis because it was followed for at least four weeks. Another loss occurred due to secondary lesions incurred after a fight with another animal that was housed in the same box. This animal belonged to the control group and, until that moment, the otoendoscopies were normal in both ears. The two other losses occurred in anesthetic induction, both at week one of evaluation, which progressed to cardiorespiratory arrest. The animals belonged to the control group and both were females, which, in general, exhibited more aggressive behavior and had a higher incidence of epileptic signs during stressful moments during the study.

Histology

All animals that reached the end of the study were euthanized using isoflurane anesthetic overdose (9-12%) by inhalation until cardiorespiratory arrest and evidence of death by the attending veterinarian. Subsequently, their temporal bones were removed, stored in formalin solution, and subsequently submitted to histological analysis. The first 54 pieces were decalcified with 10% nitric acid, which was changed every 48 h. The degree of decalcification was measured using a fine needle in each of these exchanges, which was considered to be ideal when transferring the bone with slight resistance without breaking it. The remaining 18 pieces were decalcified with EDTA changed every 48 h. On average, decalcification reached its ideal stage after seven to 10 days.

The pieces were then embedded in paraffin and sectioned using a microtome (10 µm thickness) in the axial plane. Sectioning was performed in manner in which pieces at the midmodiolar level were contained in the same axial plane as the inner ear, middle ear and external auditory canal. The slides were stained with hematoxylin and eosin and evaluated, together with the pathologist responsible for the unit, using a binocular optical microscope (Nikon E100, Nikon, Tokyo, Japan) at a 60x magnification. A histological image of a normal ear of a Mongolian squirrel, revealing the cochlea, middle ear, tympanic membrane and external auditory canal, is shown in Figure 3.

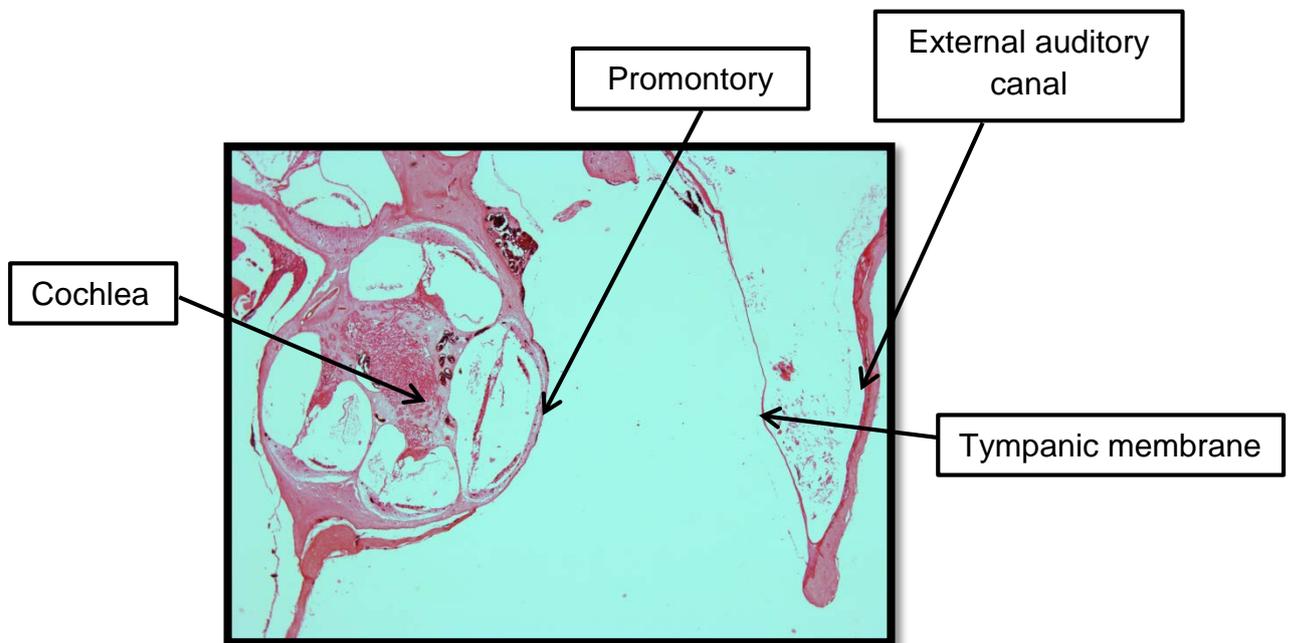


Figure 3 – histology – normal ear

Cholesteatoma

The presence of cholesteatoma was defined using the following parameters:

Endoscopy: there is no clear definition of cholesteatoma in Mongolian gerbils using otoendoscopy. As described previously, the presence of keratin clusters in the external auditory canal and on the tympanic membrane, with or without purulent secretion, invading or not invading the middle ear, was considered to be cholesteatoma (Figure 4).

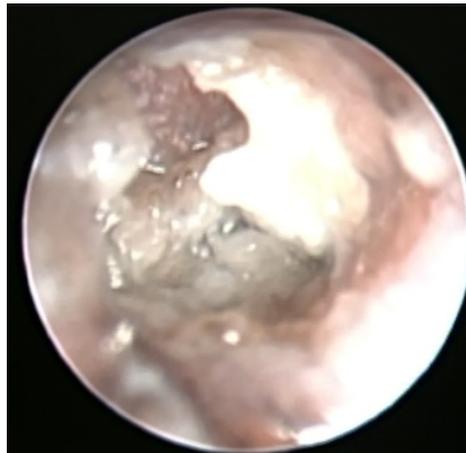


Figure 4 – cholesteatoma

Histology: According to Chole et al. (1981)¹, cholesteatoma is defined through histology by the presence of keratin accumulations, totally or partially filling the external auditory canal, with or without invasion of the middle ear and bull (Figure 5).

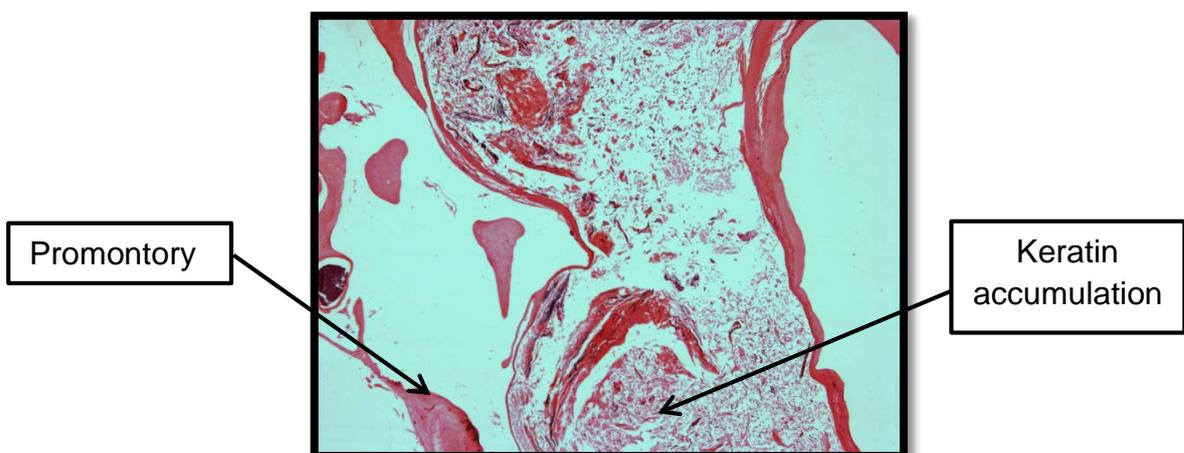


Figure 5 – cholesteatoma

After a diagnosis of cholesteatoma was established, as described above, it was histologically classified according to Chole et al (1981). There is no currently established otoendoscopic classification of cholesteatoma in Mongolian gerbils.

Stage 1: accumulation of keratin in the external auditory canal without involvement of the tympanic membrane (Figure 6);

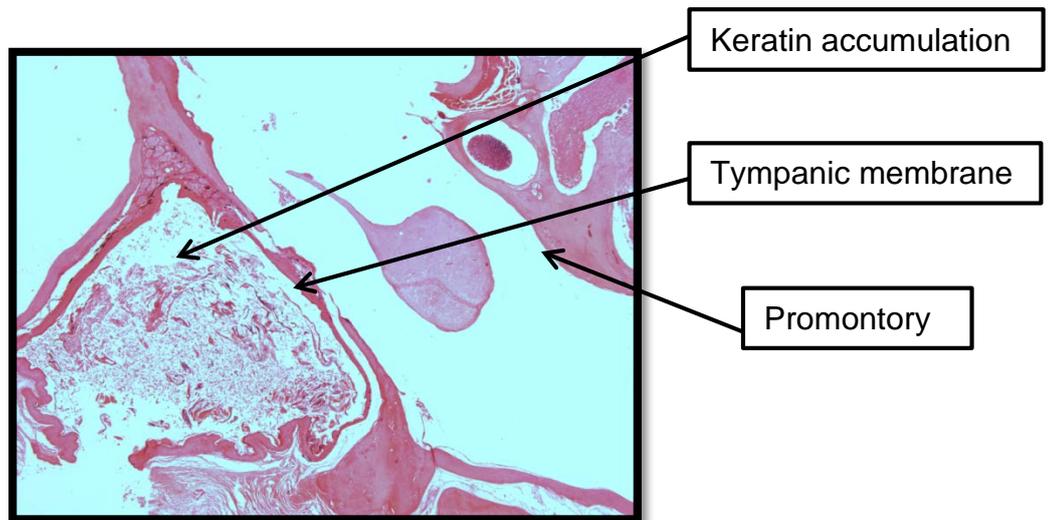


Figure 6 – stage 1 cholesteatoma

Stage 2: keratin filling the external auditory canal and medially displacing the tympanic membrane (Figure 7);

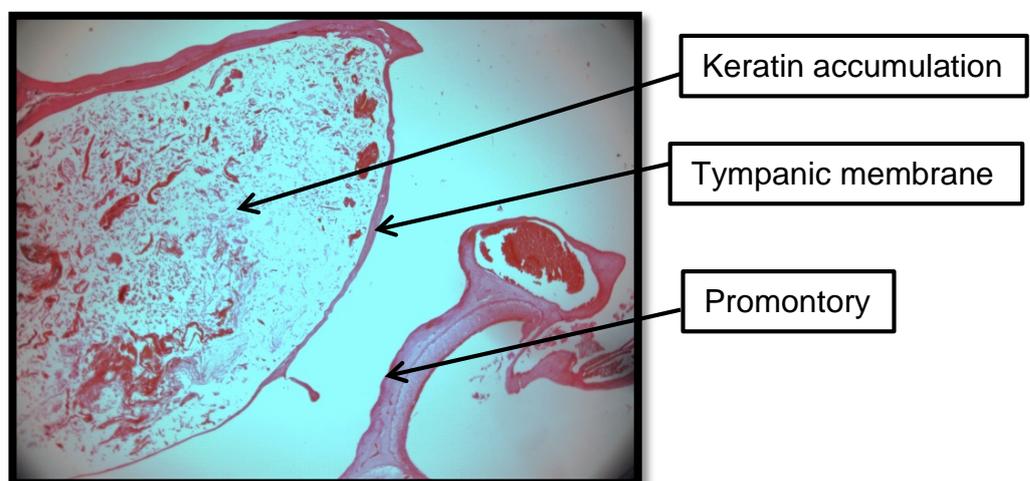


Figure 7 – stage 2 cholesteatoma

Stage 3: medially displaced tympanic membrane touching the promontory of the animal (Figure 8);

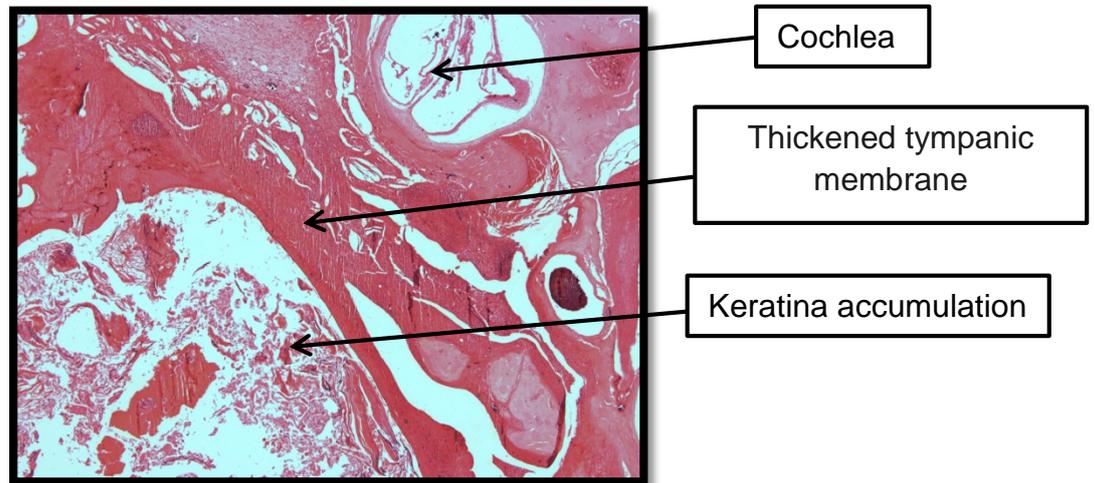


Figure 8 – stage 3 cholesteatoma

Stage 4: completely filling the bulla (Figure 9);

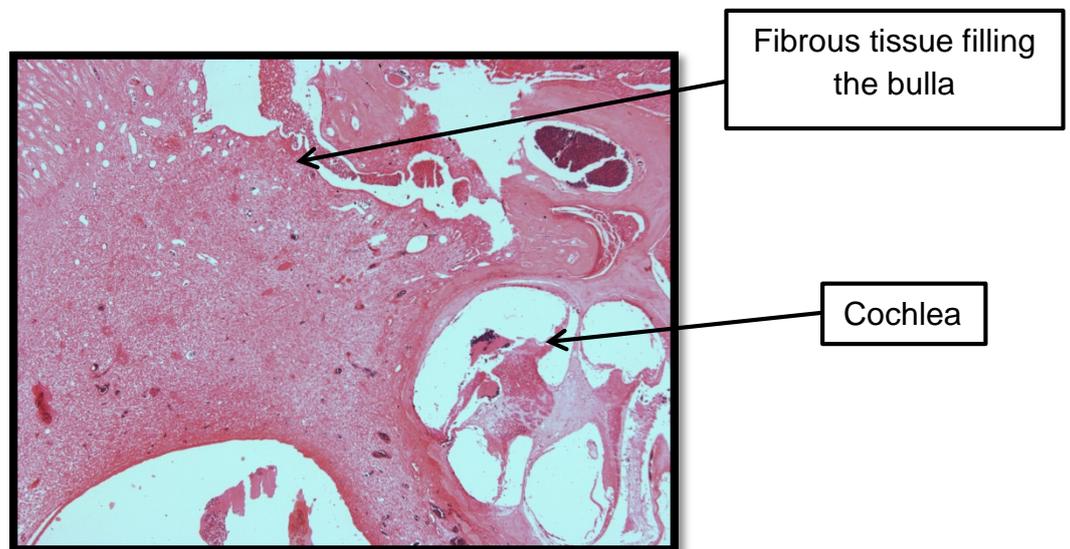


Figure 9 – stage 4 cholesteatoma

Stage 5: intracranial extension

Histology was analyzed jointly by the investigator and the responsible pathologist in the UAE. Each slide was evaluated for the presence of granulation tissue, purulent secretion, cholesterol granulomas, and cholesteatoma.

Statistical analysis

Data analysis was performed using the calculation of incidences and comparison with data available in the literature. The sample calculation was performed using an approximate incidence of developing cholesteatoma of approximately 45%³ in the control group and 85%¹⁶ in the intervention group, as reported in the literature^{3,16}. For an expected difference of 35% between groups, a statistical power of 80%, at an alpha of 0.05, would require 20 animals in each of the groups. Differences between the groups were assessed using the chi-squared test and comparison between the diagnostic tests with the McNemar test.

Results

A total of 40 animals, divided into two groups of 20 each, were followed for 16 weeks. According to the study flowchart (Figure 1), four animals were not included in the analysis, resulting in 72 ears studied. The groups were divided without randomization and did not demonstrate statistically significant differences in their characteristics (Table 1).

Table 1

	Intervention	Control	
Age	5,3 months	5,2 months	
Weight	88,8g	81,8g	p = 0,08
Gender (M/F)	17/3	17/3	

Table 1: baseline

At the end of the 16-week follow-up, cholesteatoma formation was observed in 29 of 38 (76.3%) ears in the intervention group and 18 of 34 (52.9%) in the control group, which was a statistically significant difference ($p = 0.027$). Using the classification proposed by Chole et al (1981)¹, the presence of cholesteatomas with a range from 1 to 4, was verified using histological analysis. There were no cases of disease in grade 5, with invasion of the central nervous system. Of the 47 cholesteatomas formed, 25 (53.1%) presented histological grade 1, 13 of which belonged to the control group (13/18 [72.2%]) and 12 in the intervention group (12/29 [41.3%]) (Table 3). Of these, only 14/25 ears exhibited accumulation of keratin (cholesteatoma) occluding the entire external auditory canal (eight in the intervention group and six in the control group). The presence of disease in more advanced stages (i.e., grades 2, 3 and 4) was more prevalent in the intervention group (58.6%) than in the control group (27.9%), a difference that was statistically significant ($p = 0.039$) (Table 4).

When grade 1 cholesteatomas were subdivided according to histology: keratin partially occluding the CAE; keratin completely occluding the CAE; and using a subanalysis only the grade 1 with keratin completely occluding the CAE, added to grades 2, 3 and 4, a reduction in the incidence of pathology in each of

the groups under study was obtained (65.7% [intervention group]; 32.2% [control group]).

Table 2 – Cholesteatoma - Histology

	Intervention	Control	
YES (%)	29/38 (76,3%)	18/34 (52,9%)	
NO (%)	9/38 (23,6%)	16/34 (47,1%)	p = 0,027

Table 2: cholesteatoma - histology

Table 3 – Cholesteatoma stage - Histology

	Intervention	Control	
STAGE 1 (%)	12/29 (41,3%)	13/18 (72,2%)	
STAGE 2 (%)	6/29 (20,6%)	1/18 (5,6%)	
STAGE 3 (%)	3/29 (10,3%)	1/18 (5,6%)	
STAGE 4 (%)	8/29 (27,6%)	3/18 (16,7%)	

Table 3: cholesteatoma stage - histology

Table 4 – Cholestatoma in more advanced stages – Histology

	Intervention	Control	
STAGES 2,3,4 (%)	17/29 (58,6%)	5/18 (27,9%)	p=0,039

Table 4: cholesteatoma in more advanced stages

In endoscopic analysis (Table 5), cholesteatoma was present in 11 of 38 (28.9%) ears in the intervention group and in seven of 34 (20.6%) in the control group, a difference that was not statistically significant ($p = 0.586$). Using serial otoendoscopic evaluation, the development of cholesteatomas occurred, on average, at 10.5 weeks in animals that underwent the intervention compared with 14.2 weeks in the control group, a difference that was not statistically significant ($p = 0.052$) (Table 6).

Table 5 – Cholesteatoma - Otoendoscopy

	Intervention	Control	
YES (%)	11/38 (28,9%)	7/34 (20,6%)	
NO (%)	27/38 (71,1%)	27/34 (79,4%)	$p = 0,586$

Table 5: cholesteatoma - otoendoscopy

Table 6 – Time to the onset of cholesteatoma

	Intervention	Control	
AVERAGE (weeks)	10,5	14,2	$p=0,052$

Table 6: time to the onset of cholesteatoma

Other findings in the histological evaluations were the presence of granuloma of cholesterol (intervention, 3/38; control, 1/34), granulation tissue (intervention, 10/38; control, 4/34) and purulent secretion (intervention, 9/38; control, 4/34), differences that were not statistically significant. In endoscopic analyses, in addition to normal otoscopies (Figure 10), pars flaccid opacities (Figure 11)

and the pars flaccid retractions (Figures 12a and 12b) were found, with no statistical difference between the groups.

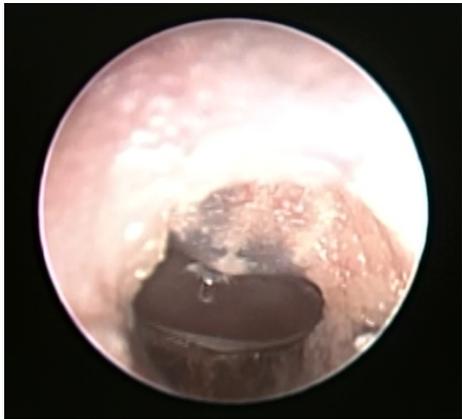


Figure 10 – normal otoscopy



Figure 11 – pars flaccid opacities

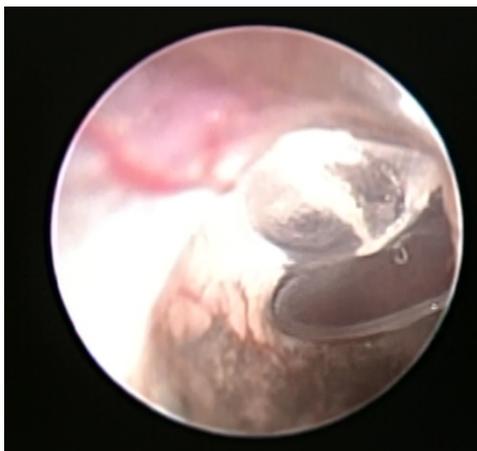


Figure 12a – pars flaccid retraction



Figure 12b – pars flaccid retraction

Otoendoscopy is considered to be a diagnostic method with low sensitivity (34%), but high specificity (95.8%) (Table 7), using histological evaluation as a gold standard for the diagnosis of cholesteatoma in Mongolian gerbils. The presence of disease identified in the otoendoscopic analysis was not correlated with more advanced cholesteatomas verified in the histological analysis.

External auditory canal depletion or accumulation of cerumen, with or without purulent secretion, was observed in 20/74 (27.02%) ears in the otoendoscopic analysis and in 68/74 (91.8%) in the histological analysis.

Sensitivity	34%
Specificity	95,8%
PPV	89%
NPV	59,2%

Table 7 – diagnostic method

PPV: positive predictive value NPV: negative predictive value

Discussion

Despite the advances in knowledge regarding cholesteatoma in recent years, full understanding, especially its pathogenesis, remains lacking. These gaps in understanding of this intriguing disease make it difficult to treat and, more importantly, prevent it. In our research group, several clinical studies were performed with the purpose of clarifying the pathophysiology involved in this process^{44,45,46,47}. However, the difficulty in performing histological studies—especially with a long follow-up period—in addition to the low incidence of cholesteatoma in humans, has hindered this process. With this in mind, experimental studies have become central in the quest to fill these gaps and, among animal species, Mongolian gerbils have emerged as one of the most interesting and useful.

In this study, we induced cholesteatomas in the control group through histological analysis in more than one-half of the ears followed, confirming the very high propensity for the spontaneous development of this disease in Mongolian gerbils³. Moreover, obliteration of the eustachian tube significantly increased this incidence, occurring in more than three-quarters of the ears that underwent the intervention. Thus, we infer that tubal dysfunction appears to have added risk to the development of this pathology in these animals.

During sequential evaluations through otoendoscopy, we were able to verify evidence that helped explain the propensity of Mongolian gerbils for the formation of cholesteatoma. Changes in the otoendoscopic examinations, even in the control group, occurred with high frequency. Among these, pars flaccid retraction, pars flaccid opacification, and CAE desquamation were prominent. The latter often caused complete occlusion of the CAE, a crucial condition for the genesis of cholesteatoma in these animals. In this work, the differentiation between a simple peeling of the external auditory canal (Figures 13 and 15) and accumulation of keratin with pathological potential (Figures 14 and 16) was not always an easy task through otoendoscopic and histological evaluation. Clearly, more studies are necessary to make this distinction possible, and the analysis of microstructural characteristics of the epithelium covering the external auditory canal probably plays a key role in this question.



Figure 13 – peeling of the external auditory canal

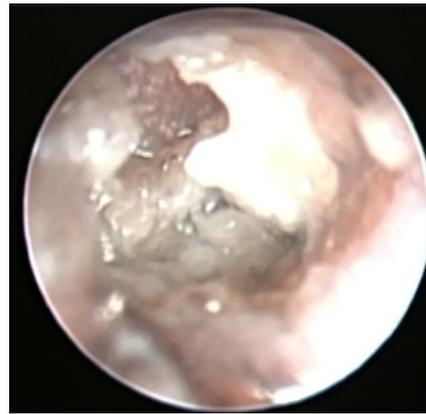


Figure 14 – cholesteatoma

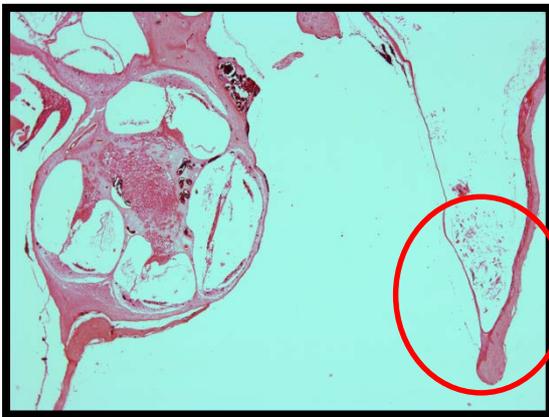


Figure 15 – peeling of the external auditory canal (red circle)

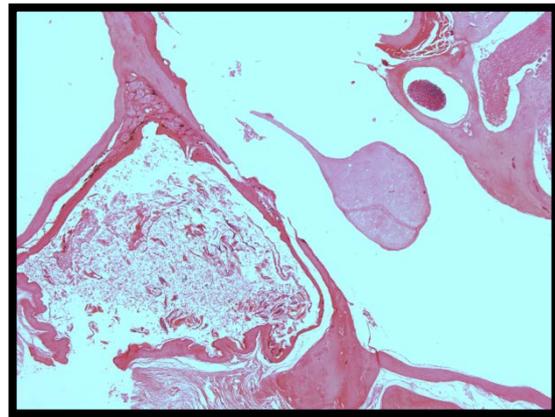


Figure 16 – cholesteatoma

Comparing the two diagnostic methods used in this study, cholesteatomas were observed more frequently in histology (47/72 [65.2%]) than in otoendoscopy (18/72 [25%]). According to Chole et al¹, cholesteatoma grade 1 by histology is defined as accumulation of keratin partially or totally occluding the external auditory canal without involvement of the tympanic membrane. However, if we considered only the cases in which complete occlusion of the external auditory canal was identified, we obtained a lower incidence (33/72 [45.8%]), which is closer to that observed in the otoendoscopic analysis. In addition, when evaluating grade 1 cholesteatomas again, we observed that only 9/25 (36%) ears were

also classified as cholesteatoma by otoendoscopy. However, when we included only the ears with complete occlusion of the CAE in this analysis, this proportion increased significantly (8/14 [57.1%]). Therefore, perhaps a modification in the histological classification proposed by Chole et al¹ should be considered, in which cholesteatoma grade 1 is subdivided into 1a (partial occlusion of the EAC) and 1b (total occlusion of the EAC). This appears to demonstrate a better correlation with the evaluation (otoendoscopy).

We also found that six of 14 ears presented keratin completely occluding the external auditory canal by histological analysis, but were not classified in this way in otoendoscopy. This was probably due to the fact that we limited the histological sections to a specific region of the animal's ear (midmodiolar level), in which the CAE is visualized in only one section. It is possible that the histological analysis based on this section does not portray the CAE in its entirety. The use of optics with high luminosity and a wide field of view makes it possible to properly evaluate the tympanic membrane and the remainder of the CAE without any possible accumulation of keratin being considered as obliterative.

In animals that underwent eustachian tube obliteration, we observed the presence of cholesteatomas in more advanced stages (grades 2, 3, 4), compared with controls (58.6% versus 27.9%), with a statistically significant difference. Considering that obliteration of the eustachian tube induces the development of this pathology in Mongolian gerbils earlier, it could be inferred that the group that underwent the intervention had the possibility of presenting a longer time for disease progression over the 16 weeks and, consequently, to develop cholesteatomas with larger dimensions. To support this finding, through otoendoscopy, we analyzed the time to the onset of the pathology in the studied groups and noticed that,

on average, this occurred in 10.5 weeks in the intervention group and 14.2 weeks in the control group, with no statistical significance, but a positive trend ($p = 0.052$).

McGinn et al. (1982)¹ demonstrated the evolution of cholesteatoma in Mongolian gerbils through an accumulation of keratin in the external ear, with later advancement toward the middle ear and bulla; in our study, we clearly identified this flow through serial otoendoscopies. We presume, therefore, that the formation of the disease in these animals appears to occur initially in the medial portion of the external auditory canal and lateral layer of the tympanic membrane, which, possibly through an inflammatory pathway, would trigger this process. In contrast to the beginning of this study, when we hypothesized that the origin of the cholesteatoma in Mongolian gerbils would be related to retractions in the flaccid pars of the tympanic membrane, we clearly observed through serial otoendoscopies that this pathology starts in the external auditory canal and then advances medially toward the bulla of these animals. Thus, when we consider that one of the most well-accepted hypotheses for explaining cholesteatomas in humans is the invagination of the tympanic membrane, we can conclude that cholesteatomas in Mongolian gerbils have a different genesis than that observed in humans. However, future studies specifically addressing this hypothesis are warranted.

In addition, hyperproliferation of epithelial cells is one of the possible mechanisms involved in the pathogenesis of chronic cholesteatomatous otitis media, which has been based both in experimental^{25,26} studies and in humans^{27,28}. Kim et al (2002)²⁴ demonstrated that there is an increase in cytokeratine (CK) production in cholesteatomas in Mongolian gerbils, mainly CK 13/16, and that this increase occurs predominantly in sites with the greatest spread of the disease. This

suggests that alterations of epithelial keratinocytes occur during the formation of this pathology and that migratory and hyperproliferative mechanisms would be involved in this pathogenesis. In our study, the presence of hyperproliferation of the epithelial layers (Figures 17 and 18) was verified in cases in which the cholesteatoma developed, confirming these aspects found in previous studies. However, future studies aimed at identifying alterations related to the microstructure of the epithelium are essential, and would enable adequate analysis of these characteristics.



Figure 17 – normal epithelial tissue

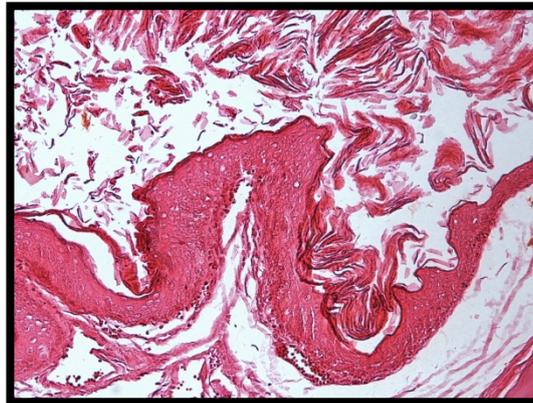


Figure 18 – Keratin and epithelial hyperproliferation

Conclusion

In this study, we demonstrated a statistically significant increase in the incidence of cholesteatoma in Mongolian gerbils through corpus obliteration of the eustachian tube, thus corroborating data reported in the literature. In addition, the disease was more aggressive in the intervention group, reaching a higher

grade according to the classification described Chole et al¹, compared with the control group.

This fact—the accomplishment of serial otoendoscopies, something non-existent in the literature until this work—enabled us to further the understanding of this pathology in Mongolian gerbils. However, several gaps persist, and other studies following this same line of research are fundamental and are already underway. Clarifying the pathogenesis of cholesteatoma in this animal species is essential so that we can also advance the understanding of this intriguing disease in humans.

References

1. McGinn MD, Chole RA, Henry KR. Cholesteatoma. Experimental induction in the Mongolian Gerbil, *Meriones Unguiculatus*. *Acta Otolaryngol*. 1982, 93:61–67. [PubMed: 7064697]
2. Sadé J. Retraction pockets and attic cholesteatomas. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1980, 34:62–84.
3. Chole RA, Henry KR, McGinn MD. Cholesteatoma: Spontaneous occurrence in the mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. *Am J Otol*. 1981;2:204–10.

4. Fulghum RS, Chole RA. Bacterial flora in spontaneously occurring aural cholesteatomas in Mongolian gerbils. *Infect Immun.* 1985; 50:678–681. [PubMed: 4066027]
5. Attallah MS. Microbiology of chronic suppurative otitis media with cholesteatoma. *Saudi Med J.* 2000; 21:924–927. [PubMed: 11369953]
6. Tinling SP, Chole RA . Gerbilline cholesteatoma development Part I: Epithelial migration pattern and rate on the gerbil tympanic membrane: comparisons with human and guinea pig. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 May;134(5):788-93
7. Tinling SP, Chole RA . Gerbilline cholesteatoma development. Part II: temporal histopathologic changes in the tympanic membrane and middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Jun;134(6):953-60
8. Tinling SP, Chole RA. Gerbilline cholesteatoma development Part III. Increased proliferation index of basal keratinocytes of the tympanic membrane and external ear canal. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Jul;135(1):116-23.
9. Lima JP, Ariga S, Velasco I, Schochat E. Effect of the ketamine/xylazine anesthetic on the auditory brainstem response of adult gerbils. *Braz J Med Biol Res.* 2012 Dec;45(12):1244-7. Epub 2012 Sep 11.

10. Von Unge M, Decraemer WF, Buytaert JA, Dirckx JJ. Evaluation of a model for studies on sequelae after acute otitis media in the Mongolian gerbil. *Acta Otolaryngol.* 2009 Mar;129(3):261-7.
11. Larsson C, von Unge M, Bagger-Sjöbäck D. Tympanic membrane changes in experimental cholesteatoma in the gerbil. *Am J Otol.* 1999 May;20(3):309-16.
12. Jung JY, Lee DH, Wang EW, Nason R, Sinnwell TM, Vogel JP, Chole RA. *P. aeruginosa* infection increases morbidity in experimental cholesteatomas. *Laryngoscope.* 2011 Nov;121(11):2449-54.
13. McGinn MD et al. Cholesteatoma induction. Consequences of external auditory canal ligation in gerbils, cats, hamsters, guinea pigs, mice and rats. *Acta Otolaryngol.* 1984 Mar-Apr;97(3-4):297-304.
14. Aberg B et al. A comparative study of enzyme histochemical features in the gerbilline and human cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 1990 Jan-Feb;109(1-2):130-6.
15. Chole RA et al. Cholesteatoma: spontaneous occurrence in the Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. *Am J Otol.* 1981 Jan, 2(3): 204-10.
16. Kim HJ et al. Experimental models of aural cholesteatomas in Mongolian gerbils. 1998 Feb;107(2) 129-34.

17. Da Costa SS, Cruz OLM, De Oliveira, JAA. Otorrinolaringologia Princípios e Prática. 2ª edição, 2006.
18. Chole RA, Gagnon PM, Vogel JP. Inactivation of specific *Pseudomonas aeruginosa* biofilm factors does not alter virulence in infected cholesteatomas. *Otol Neurotol*. 2014 Oct;35(9):1585-91.
19. Choufani G, Roper N, Delbrouck C, Hassid S, Gabius HJ. Animal model for cholesteatoma induced in the gerbil: will the profiles of differentiation/growth-regulatory markers be similar to the clinical situation? *Laryngoscope*. 2007 Apr;117(4):706-11.
20. Wolfman DE, Tinling SP. Systemic osteoclast activation by localized pressure. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993 Feb;119(2):165-8.
21. Antunes ML, Fukuda Y, Penido Nde O, Ferreira R. Effect of trans-retinoic acid in the inhibition of cholesteatoma in guinea pigs. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008 Jan-Feb;74(1):53-60.
22. Hinohira Y, Gyo K, Yanagihara N. Experimental cholesteatomas arising from autologous free skin grafting in the middle ear cavity. *Acta Otolaryngol*. 1994 Sep;114(5):533-8.
23. Paparella MM, Hiraide F, Juhn SK, Kaneco J. Cellular events involved in middle ear fluid production. *Ann Rhinol Otol Laryngol*; 1970: 79(4): 766-79.

24. Kim HJ, Tinling SP, Chole RA. Increased proliferation and migration of epithelium in advancing experimental cholesteatomas. *Otol Neurotol* 2002; Nov; 23(6): 840-4.
25. Vennix PPCA, Kuijpers W, Tonnaer ELGM, et al. Cytokeratins in induced epidermoid formation and cholesteatoma lesions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;116:560–5.
26. Vennix PPCA, Kuijpers W, Peters TA, et al. Growth and differentiation of meatal skin grafts in the middle ear of the rat. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:1102–11.
27. Bujia J, Schilling V, Holly A, et al. Hyperproliferation-associated keratin expression in human middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 1993;113:364–8.
28. Sasaki H, Huang CC. Expression of cytokeratins 13 and 16 in middle ear cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;110: 310–7.
29. Wolfman, DE, Chole, RA. Experimental Retraction Pocket Cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1986; 95: 639-44.
30. Maniu A, Harabagiu O, Perde Schrepler M, Catana A, Fanuta B, Mogoanta CA. Molecular biology of cholesteatoma. *Rom K Morphol Embryol*. 2014;55(1):7-13.

31. Yoon TH, Schachern PA, Paparella MM, Aeppli DM. Pathology and pathogenesis of tympanic membrane retraction. *Am J Otolaryngol* 1990 Jan-Feb; 11(1):10-7.
32. Rosito LP, da Costa SS, Schachern PA, Dornelles C, Cureoglu S, Paparella MM. Contralateral ear in chronic otitis media: a histologic study. *Laryngoscope* 2007 Oct;117(10):1809-14.
33. Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of attic cholesteatoma: clinical and immunohistochemical support for combination of retraction theory and proliferation theory. *Am J Otol.* 2000 Nov;21(6):786-92.
34. Louw L. Acquired cholesteatoma pathogenesis: stepwise explanations. *J Laryngol Otol.* 2010 Jun;124(6):587-93.
35. Harris L, Cushing SL, Hubbard B, Fisher D, Papsin BC, James AL. Impact of cleft palate type on the incidence of acquired cholesteatoma. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013 May;77(5):695-8.
36. Spilsbury K, Ha JF, Semmens JB, Lannigan F. Cholesteatoma in cleft lip and palate: a population-based follow-up study of children after ventilation tubes. *Laryngoscope* 2013 Aug;123(8):2024-9.
37. Dominguez S, Harker LA. Incidence of cholesteatoma with cleft palate. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1988 Nov-Dec;97(6):659-60.

38. Vashishth A, Singh Nagar TR, Mandal S, Venkatachalam VP. Extensive intratemporal cholesteatomas: presentation, complications and surgical outcomes. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015 Feb; 272(2):289-9.
39. Wu JF, Jin Z, Yang JM, Liu YH, Duan ML. Extracranial and intracranial complications of otitis media: 22-year clinical experience and analysis. *Acta Otolaryngol* 2012 Mar;132(3):261-5.
40. Mor N, Finkel DA, Hanson MB, Rosenfeld RM. Middle ear cholesteatoma treated with a mastoidectomy: a systematic review of the measures used. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014 Dec;151(6):923-6.
41. Yamamoto-Fukuda T, Hishikawa Y, Shibata Y, Kobayashi T, Takahashi H, Koji T. Pathogenesis of middle ear cholesteatoma: a new model of experimentally induced cholesteatoma in Mongolian gerbils. *Am J Pathol* 2010 Jun;176(6):2602-6.
42. Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of sinus cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264:1137-43.
43. Sadé J, Avraham S, Brown M. Atelectasis, retraction pockets and cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 1981;92:501-12.
44. Da Costa SS, Rosito LP, Dornelles C, Sperling N. The contralateral ear in chronic otitis media: a series of 500 patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134:290-3.

45. Rosito LP, da Costa SS, Schachern PA, Dornelles C, Cureoglu S, Paparella MM. Contralateral ear in chronic otitis media: a histologic study. *Laryngoscope* 2007; 117:1809-1814.
46. Netto LFS, Costa SS, Sleifer P, Braga MEL. The impact of chronic suppurative otitis media on children's and teenagers' hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009; 73:1751-1756.
47. Silva MN, Muller Jdos S, Selaimen FA, Oliveira DS, Rosito LP, Costa SS. Tomographic evaluation of the contralateral ear in patients with severe chronic otitis media. *Braz J Otorhinolaryngol* 2013; 79:475-79.
48. Jackler RK, Santa Maria PL, Varsak YK, Nguyen A, Blevins NH. A new theory on the pathogenesis of acquired cholesteatoma: Mucosal traction. *Laryngoscope* 2015; 125 Suppl 4:S1-S14.
49. Steinbach E, Gruninger G. Experimental production of cholesteatoma in rabbits by using non-irritants (skin tolerants). *J Laryngol Otol.* 1980 Mar;94(3):269-79.
50. Law N° 11.794, October 8th / 2008.

Considerações finais

O desenvolvimento deste modelo animal por meio da obliteração da tuba auditiva e o acompanhamento através das otoendoscopias seriadas permitiu que pudéssemos fazer algumas considerações sobre o desenvolvimento da doença nessa espécie animal:

1. A obliteração da tuba auditiva eleva consideravelmente a incidência de colesteatoma, com significância estatística;
2. Os animais submetidos à obliteração da tuba auditiva apresentaram-se ao final do estudo com colesteatomas em graus mais avançados;
3. A identificação do colesteatoma através de otoendoscopias é menos sensível em comparação à análise histológica, porém apresenta alta especificidade e alto valor preditivo positivo para o diagnóstico;
4. A análise otoendoscópica seriada nos permitiu observar, de forma clara, que esta patologia em esquilos da Mongólia se inicia, de fato, no conduto auditivo externo e, então, avança medialmente em direção à bula desses animais.

Perspectivas

Após o desenvolvimento do modelo animal de maneira efetiva em todas suas etapas, seguindo nessa linha de pesquisa, algumas perspectivas surgem bastante promissoras:

1. Comparação entre o colesteatoma desenvolvido por obliteração da tuba auditiva e através da ligadura do conduto auditivo externo (pesquisa já em andamento);
2. Análise de marcadores e proteínas inflamatórias que possam auxiliar na compreensão da doença, assim como na identificação dos casos que evoluirão com maior agressividade;
3. Utilização de procedimentos e medicamentos que possam inibir o desenvolvimento do colesteatoma ou retardar sua evolução;