

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

FELIPE DA COSTA HUVE

**USO DE ESQUILOS DA MONGÓLIA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA  
ESTUDO DO COLESTEATOMA DE ORELHA MÉDIA:  
COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE OBLITERAÇÃO DA TUBA AUDITIVA E  
DO CONDUTO AUDITIVO EXTERNO**

PORTO ALEGRE  
2019

FELIPE DA COSTA HUVE

**USO DE ESQUILOS DA MONGÓLIA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA  
ESTUDO DO COLESTEATOMA DE ORELHA MÉDIA:  
COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE OBLITERAÇÃO DA TUBA AUDITIVA E  
DO CONDUTO AUDITIVO EXTERNO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr, Sady Selaimen da Costa  
Coorientador: Maurício Noschang Lopes da Silva

PORTO ALEGRE  
2019

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Juarez e Angela e ao meu irmão Henrique, minha família, pelo suporte e pelos valores ensinados que foram, são e sempre serão a base na qual me apoio para seguir em busca de meus sonhos e conquistas pessoais.

À minha esposa Christine, por me incentivar a querer ser melhor, a buscar mais; sendo compreensiva nos momentos de ausência, amparando-me nos momentos difíceis e compartilhando comigo os momentos de alegria.

Aos meus colegas de residência médica, hoje também otologistas, Jefferson, Fábio e João Augusto, agradeço não somente pela ajuda durante a execução deste trabalho, mas principalmente pela amizade construída ao longo desses anos, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu preceptor, idealizador e coorientador deste trabalho e, por assim dizer, meu mentor, Dr. Maurício, pelo exemplo de médico, pela paciência para ensinar e, sobretudo, a satisfação de dividir o conhecimento. É a quem busco e sei que sempre poderei contar para dividir meus anseios e ajudar a solucionar minhas dúvidas.

Ao meu orientador, professor Sady Selaimen da Costa, exemplo de dedicação e competência, com sua incansável busca pela perfeição, sendo fonte de inspiração não só para mim mas para todos aqueles que tem o privilégio de estarem a sua volta. O conhecimento que detém e a didática com a qual o difunde fazem com que, a cada ano, jovens otorrinolaringologistas escolham a otologia como área de atuação, assim como eu o fiz. A sua orientação foi de suma importância e traz relevância a este trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

OMC – otite média crônica

OMCC – otite média crônica colesteatomatosa

OMCNC – otite média crônica não-colesteatomatosa

MT – membrana timpânica

CAE – auditivo externo

TA – tuba auditiva

OCL – orelhas contralateral

CK - citoqueratina

OCLs – orelhas contralaterais

PCR – reação em cadeia da polimerase

CKs – citoqueratinas

TNF-alfa – fator de necrose tumoral do tipo alfa

MMPs – metaloproteinases

HCPA – hospital de clínicas de Porto Alegre

UEA – unidade de experimentação animal

EDTA - ácido etileno-diamino-tetracético

CEUA – comissão de ética no uso de animais

## SUMÁRIO

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                                  | 5  |
| 1.1      | Base teórica.....  | 6  |
| 1.2      | Patogênese do colesteatoma.....                          | 8  |
| 1.3      | Uso de espécies animais para estudo do colesteatoma..... | 14 |
| 1.4      | Justificativa.....                                       | 20 |
| 1.5      | Objetivos gerais.....                                    | 21 |
| <b>2</b> | <b>MÉTODOS</b> .....                                     | 22 |
| 2.1      | Local e população do estudo.....                         | 22 |
| 2.2      | Critérios de exclusão.....                               | 25 |
| 2.3      | Procedimentos realizados.....                            | 25 |
| 2.4      | Aspectos éticos.....                                     | 32 |
| 2.5      | Análise estatística.....                                 | 32 |
| 2.6      | Delineamento de pesquisa.....                            | 33 |
| 2.7      | Desfechos.....   | 33 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                 | 35 |
|          | <b>ARTIGO EM PORTUGUÊS</b> .....                         | 42 |
|          | <b>ARTIGO EM INGLÊS</b> .....                            | 61 |

## 1 INTRODUÇÃO

A otite média crônica (OMC) pode ser definida como um processo inflamatório, infeccioso ou não, ocupando focal ou generalizadamente a fenda auditiva<sup>1,2</sup>. Essa por sua vez pode ser dividida em colesteatomatosa (OMCC) e não-colesteatomatosa (OMCNC), sendo a primeira forma, segundo SCHUKNECHT (1974)<sup>3</sup> caracterizada pela presença de queratina esfoliada dentro da orelha média ou de qualquer área pneumatizada do osso temporal, nascendo a partir de um epitélio escamoso queratinizado.

Estima-se que a incidência anual de OMCC seja de 3/100.000 em crianças e 12,6/100.000 adultos<sup>4,5</sup>. Mesmo não possuindo dados epidemiológicos nacionais, sabemos que o colesteatoma é uma doença pouco frequente em nosso meio. Apesar de apresentar uma predileção pela etnia caucasiana, possui incidência similar entre as diferentes classes socioeconômicas<sup>6</sup>.

A OMCC apresenta evolução insidiosa e mais agressiva que a OMCNC, com maiores taxas de erosão óssea e extensão para estruturas vizinhas. O acometimento da cadeia ossicular, que ocorre quase que invariavelmente em todos pacientes em um dado momento, leva a perda auditiva de caráter condutivo ou misto. Nosso grupo de pesquisa já demonstrou, em uma amostra de crianças e adolescentes, que as diferenças aéreo-ósseas (*gap*) eram significativamente maiores em pacientes com colesteatoma quando comparados aos que apresentavam apenas perfuração da membrana timpânica (MT)<sup>7</sup>. Somado a isso, a eliminação de secreção de aspecto purulento e com odor fétido característico implica o prejuízo direto das relações sociais, especialmente na população pediátrica. Não obstante, com a progressão do processo inflamatório atingindo outras regiões do osso temporal, complicações como paralisias do nervo facial, fístulas labirínticas ou liquóricas, com ou sem labirintite, aumentam a morbidade e as sequelas associadas. A extensão para o sistema nervoso central pode acarretar em tromboflebite do seio lateral, meningite e até mesmo abscessos cerebrais, elevando o potencial de mortalidade atribuído à doença<sup>8,9</sup>.

O tratamento da OMCC é fundamentalmente cirúrgico, com o objetivo primário de eliminação completa da doença e controle do processo inflamatório na orelha média. A manutenção ou melhora da função auditiva através da preservação

ou reconstrução do sistema tímpano-ossicular nem sempre é possível, mas ainda assim é o maior objetivo secundário da cirurgia. Com este intuito, inúmeras técnicas cirúrgicas já foram propostas, com especial destaque para as timpanomastoidectomias. Estas, por sua vez, subdividem-se em abertas ou fechadas dependendo da preservação ou não da parede posterior do conduto auditivo externo (CAE). A escolha pela técnica a ser utilizada irá depender de alguns fatores como a extensão da doença, os limiares auditivos, o grau de pneumatização da mastoide, o funcionamento da tuba auditiva (TA), o estado da orelha contralateral (OCL) e a presença de complicações ou de malformações associadas<sup>6,10</sup>.

Apesar do avanço obtido nos métodos diagnósticos, possibilitando um reconhecimento precoce da OMCC e acompanhamento desde muito cedo dos pacientes, ainda não é possível abortar de maneira consistente sua progressão para estágios mais avançados. Embora o tratamento cirúrgico possibilite o controle da doença, infelizmente muitas vezes ele só é promovido quando danos irreversíveis e, inclusive, algumas complicações já estão instalados. Considerando isso, diversos grupos de estudo, bem como o nosso, vem concentrando seus esforços em busca de compreender melhor os mecanismos intrínsecos da patogênese do colesteatoma, permitindo que atuemos mesmo antes do seu surgimento.

## 1.1 Base Teórica

A MT é um dos componentes mais importantes do aparato auditivo e sendo assim, também está sujeita ao processo de doença como pode ser observado nos quadros de OMC e OMCC<sup>11</sup>. Assim como algumas condições iatrogênicas, a ocorrência de processos inflamatórios na orelha média tem o potencial de provocar alterações estruturais na MT levando a perfurações ou, inclusive, ao comprometimento das suas propriedades viscoelásticas permitindo a formação de bolsas de retração<sup>12</sup>. Para que se possam compreender algumas das teorias aventadas para explicar a patogênese do colesteatoma, deve-se inicialmente ter conhecimento das características biológicas da MT.

A MT compõem-se de duas partes: a *pars tensa* e a *pars flácida*, que diferem entre si do ponto de vista histológico e funcional. Estruturalmente, a MT é constituída por 3 camadas: uma camada externa composta por um epitélio escamoso

queratinizado, uma camada fibrosa mesodérmica intermediária e uma camada interna mucosa derivada da endoderme<sup>13</sup>. As principais diferenças morfológicas entre as *pars tensa* e *flácida* residem na composição da camada fibrosa intermediária<sup>14,15</sup>.

A camada epidérmica externa é formada por 4 camadas celulares, sendo da mais profunda a mais superficial as camadas basal, espinhosa, granulosa e córnea. Os queratinócitos da camada basal sofrem divisão celular e dirigem-se superficialmente repondo as células córneas mortas. À medida que as células se deslocam para a superfície, elas produzem proteínas de alto peso molecular como a citoqueratina (CK) e outras proteínas especializadas que ao interagirem formam a queratina. Esta camada superficial de células mortas e queratinizadas confere características de maior resistência, proteção contra invasão de microorganismos e impermeabilidade a água<sup>16</sup>.

A epiderme da MT possui dois padrões de migração epitelial conhecidos. O primeiro, considerado um mecanismo de autolimpeza, consiste em um movimento centrífugo partindo da região do umbigo timpânico a um ritmo aproximado de 0,05 a 0,07mm por dia tendo como objetivo a remoção de queratina, cerume e corpos estranhos localizados na orelha externa<sup>17</sup>. O segundo padrão observado é um movimento centrípeto que parece ser essencial no processo de cicatrização de soluções de continuidade da MT. O mecanismo exato de controle desta função migratória ainda não é completamente entendido. Alguns estudos mostraram a presença de fatores de crescimento epidérmicos e dos fibroblastos<sup>18,19</sup> associados à cicatrização da MT enquanto outros apontaram para a importância de microfilamentos da proteína contrátil actina F no processo de migração do epitélio escamoso<sup>13</sup>.

A camada epidérmica contém ainda células de Langerhans, linfócitos T e mastócitos sugerindo que a MT possa apresentar resposta imune e assim sendo, participe ativamente do mecanismo de defesa da orelha<sup>14</sup>.

Assim como outros tecidos, entre a camada externa da MT e a camada fibrosa intermediária encontra-se uma camada formada por glicoproteínas e proteoglicanos secretados pelas células epidérmicas basais denominada lâmina basal. Esta por sua vez, mantém-se unida por glicoproteínas de adesão a uma camada de fibras reticulares, a lâmina reticular, que é secretadas pelo tecido conjuntivo da camada intermediária. A união das lâminas basal e reticular compõem



a membrana basal<sup>16</sup>. Além de permitir a adesão entre o epitélio da camada externa e o tecido conjuntivo da camada fibrosa, a lâmina basal também funciona como uma barreira de filtração seletiva, influencia a diferenciação e proliferação das células epiteliais, e ainda serve de apoio para o processo de migração epitelial.

A camada fibrosa intermediária, também denominada de lâmina própria, apresenta uma composição diferente dependendo da sua localização na MT. Na região da *pars flácida*, é mais espessa e composta por uma rede de tecido conectivo frouxo, de fibras colágenas (principalmente tipo I) e elásticas (caracterizando sua flacidez) assim como por uma rede de vasos sanguíneos e nervos. Também encontramos nesta região a presença abundante de mastócitos repletos de histamina que podem estar associados a reações de hipersensibilidade influenciando diretamente na patogênese das otites médias com efusão<sup>12,13</sup>.

Na região da *pars tensa*, essa camada fibrosa intermediária é formada por tecido conectivo frouxo contendo vasos sanguíneos e fibras nervosas, além de uma camada fibrosa constituída por fibras radiais externas e circulares internas. Entre estes dois extratos encontramos ainda fibras transversais e parabólicas. Estas fibras são compostas principalmente por colágeno do tipo II e III, além de colágeno tipo I e procolágenos tipos I, III e IV. Fibras elásticas são raras nessa região; entretanto, alguns estudos mostraram finas fibrilas, possivelmente de reticulina ou ceratina. Este arranjo estrutural único exerce um importante papel na capacidade vibratória da membrana timpânica e a perda desta estrutura, como resultado de processos inflamatórios, infecciosos ou atelectásicos, pode levar a flacidez da MT<sup>13</sup>.

A camada mucosa interna é composta por uma fina camada de epitélio escamoso simples não queratinizado podendo em algumas áreas da *pars flácida* apresentar algumas células cilíndricas pseudoestratificadas ou cubóides ciliadas ou não, em contiguidade com a mucosa que reveste a orelha média<sup>11</sup>.

## 1.2 Patogênese do colesteatoma

Ao longo dos últimos dois séculos diversos autores propuseram teorias para explicar o desenvolvimento do colesteatoma. Como podemos ver a seguir, existem, basicamente, seis hipóteses que tentam explicar a etiopatogênese desta doença.

Teoria congênita: proposta por KORNER e VIRCHOW em 1863<sup>20</sup>, consiste na formação de grandes massas epiteliais a partir da multiplicação de células epiteliais, representando restos embrionários no interior da fenda auditiva<sup>20</sup>. Em 1963 CAWTHORNE relatou o caso de um paciente jovem com membrana timpânica íntegra que desenvolveu colesteatoma de orelha média sugerindo que este teria origem em restos embrionários de epitélio escamoso presentes na fenda auditiva. Outros autores também relataram alguns casos de colesteatoma identificados em jovens com MT íntegra<sup>6</sup>. Se restam dúvidas quanto ao desenvolvimento de colesteatomas congênitos na orelha média, o mesmo não pode ser dito de outras áreas do osso temporal. GACEK (1975)<sup>21</sup>, propôs que a região do forame lacerado seria propícia para persistência de restos epiteliais podendo levar a formação de cistos epidermóides predispondo o surgimento de colesteatomas no ápice petroso.

Teoria da implantação: SCHÖER em 1958<sup>22</sup>, sugeriu que o colesteatoma se formaria por implantação direta de células epiteliais na orelha média. Isso poderia ocorrer de forma secundária a traumatismos ou iatrogenicamente após procedimentos cirúrgicos. McKENNAN e CHOLE (1989)<sup>23</sup> descreveram algumas particularidades atribuídas aos colesteatomas pós traumáticos como o seu início tardio, o seu desenvolvimento atípico com massas epiteliais resultantes de grandes dimensões, devido à boa pneumatização das mastoides em questão, conferindo-lhes um maior risco de fístulas liquóricas e necessidade de tratamento por cirurgias com técnicas abertas. No que diz respeito aos casos pós cirúrgicos, SHEEHY et al. (1977)<sup>24</sup> relataram a ocorrência de pérolas de colesteatoma junto a membrana timpânica após timpanoplastias com enxerto *overlay*. Outros autores atentaram para possibilidade de surgimento de colesteatoma após procedimentos de miringotomia para inserção de tubo de ventilação, podendo esta ocorrer pelo deslocamento de um pequeno retalho da MT para dentro da orelha média<sup>6</sup>.

Teoria da metaplasia: sugerida primeiramente por WENDT em 1873<sup>25</sup>, vindo a ser corroborada por SADÉ (1983)<sup>26</sup>, baseava-se no desenvolvimento de metaplasia escamosa do epitélio respiratório após agressão provocada por um processo inflamatório crônico subjacente, assim como por algum outro evento traumático desencadeante. Embora outros autores<sup>27,28</sup> também tenham conduzido trabalhos

concluindo que a mucosa da orelha média poderia sofrer transformação para epitélio escamoso, carecem evidências de que o mesmo venha a se tornar queratinizado.

Teoria da migração epitelial: descrita por HABERMANN (1889)<sup>29</sup> e BEZOLD (1890)<sup>30</sup>, tomava como base o fenômeno de epitelização ocorrido em seios e trajetos fistulosos. Em relação ao colesteatoma de orelha média, postula que na presença de uma retração ou perfuração marginal da MT e mediante inversão do fluxo epitelial (que nos humanos é do umbus do martelo em direção ao meato auditivo externo) ocorreria migração de epitélio escamoso do CAE para o interior da orelha média. No entanto, os fatores envolvidos nesta inversão de fluxo migratório, bem como aqueles que levariam a formação do colesteatoma ao invés da simples epitelização da orelha média, não foram ainda muito bem explicados. Além do mais, alguns estudos em seres humanos não evidenciaram hiperproliferação da epiderme normal de pacientes com colesteatoma<sup>31</sup> e outros não foram capazes de identificar alteração no padrão de migração epitelial na orelha contralateral de colesteatomas unilaterais<sup>32</sup>. Embora seja considerada por muitos o mecanismo mais comumente envolvido no desenvolvimento dos colesteatomas adquiridos, supõe-se que, para que as células migrem para orelha média a partir da pele do CAE ou da própria MT seria necessário um fator estimulador (como uma reação inflamatória subjacente) e uma ponte facilitadora (como retrações ou perfurações da MT) como pré-requisitos<sup>6</sup>.

Teoria da retração: proposta primeiramente por BEZOLD (1890)<sup>30</sup>. Também chamada de teoria da invaginação, tem a disfunção tubária como processo inicial. Segundo esta teoria, a pressão negativa gerada na orelha média secundária a função alterada da tuba auditiva poderia levar a efusão e retração da MT, mais comumente em sua *pars flácida*. Somando-se a isso a presença de um estímulo infeccioso e inflamatório poderíamos ter como resultado o desenvolvimento do colesteatoma. Muitos autores acreditavam que a ocorrência da doença na região atical seriam secundária a migração epitelial através de perfurações na membrana de Shrapnell. Entretanto, na prática clínica a presença de perfurações nesta área ocorre com muito menos frequência do que os casos observados de colesteatomas aticais, corroborando a ideia de que a doença nesta região inicia-se por retração da MT<sup>6</sup>. Em contrapartida, o processo de formação do colesteatoma na *pars tensa*, mais comumente no quadrante pósterio-superior da MT, não foi muito bem

esclarecido. Presume-se que, devido a processos inflamatórios recorrentes ou persistentes na orelha média, ocorre um enfraquecimento da lâmina própria da MT nessa região, conferindo-lhe um aspecto atrófico. A MT então atrófica torna-se vulnerável ao processo de retração na presença de pressão negativa na orelha média. O verdadeiro mecanismo pelo qual se desenvolve esta atrofia, assim como o processo de transição de uma bolsa de retração para o colesteatoma propriamente dito ainda não foram totalmente esclarecidos.

Teoria da hiperplasia/hiperproliferação epitelial: MANASSE em 1917<sup>33</sup> e LANGE em 1925<sup>34</sup> foram os primeiros a sugerir que células epiteliais da *pars flácida* poderiam proliferar para o tecido sub-epitelial do espaço de Prussak levando à formação de um colesteatoma mesmo na ausência de invaginações ou perfurações prévias da MT. Mesmo sendo inequívocas as evidências da proliferação das células basais e invasão do tecido subepitelial, para que isto fosse possível a lamina basal da MT deveria invaginar-se ou sofrer microrrupturas permitindo a proliferação das células epiteliais em direção aos tecidos subjacentes. Segundo CHOLE e TINLING (1985)<sup>35</sup>, a ruptura da lâmina basal seria secundária à liberação de lisozimas e colagenases específicas na presença de processos inflamatórios subjacentes ou pelas próprias células epiteliais da MT. LIM e SAUNDERS (1972)<sup>36</sup> utilizaram o conceito do “guiamento pelo contato”, inicialmente descrito por WEISS (1959)<sup>37</sup> e posteriormente por GIACOMETTI (1968)<sup>38</sup>, para explicar o mecanismo de migração epitelial de colesteatomas adquiridos. Em seu trabalho observaram a formação de projeções papilares da membrana basal do colesteatoma que seriam guiadas em direção a orelha média pelas aderências entre o epitélio da matriz e a fibrina presente na camada mucosa da MT, na vigência de um processo inflamatório subjacente. Entretanto, VENNIX et al. (1996)<sup>39</sup> ao estudar o potencial invasor do colesteatoma através do perfil de diferenciação de queratinócitos encontrados na matriz e em perfurações da MT não observou a presença de distorções na lâmina basal.

Diversos autores entendem a teoria da invaginação da MT como a que melhor explicaria a ocorrência do colesteatoma. Alinhando-se a este pensamento, nosso grupo de pesquisa conduziu uma série de trabalhos envolvendo o estudo da OCL de pacientes com OMC. Partindo do pressuposto que ambas orelhas seguem o mesmo

desenvolvimento embriológico, possuem anatomia e micro-anatomia semelhantes e estão expostas aos mesmos fatores ambientais, inferimos que esta seria uma boa forma, embora indireta, de avaliarmos os mecanismos sucedidos na orelha principal. Esta teoria veio a se fortalecer a medida que encontramos uma alta prevalência de alterações clínicas, auditivas, radiológicas e histológicas presentes na orelha contralateral<sup>40,41,42,43</sup>. Em 2008, COSTA et al.<sup>41</sup> ao avaliar por otoendoscopia 198 pacientes com OMCC encontrou alterações em 83,3% das orelhas contralaterais (OCLs), sendo que 24,8% dos pacientes apresentavam retrações severas e 13,3% evidenciavam colesteatoma. ROSITO et al. em 2018<sup>43</sup> observou que, quando presente, as retrações na OCL ocorriam mais comumente na mesma região da MT onde se desenvolveu o colesteatoma na orelha principal. Achados como estes sugerem que a retração da MT poderia sim representar um evento ao menos inicial na fisiopatologia do desenvolvimento do colesteatoma. Neste contexto, a disfunção tubária desponta como principal fator causal devido ao prejuízo na ventilação e consequente pressão negativa gerada no interior da orelha média. Esta teoria é reforçada ao nos depararmos com a elevada prevalência de OMC encontrada em estudos de pacientes com fenda palatina<sup>44,45,46</sup>.

Mesmo diante do exposto, não é possível demonstrar de maneira inequívoca esta evolução, à medida que nem todas as retrações, nem mesmo as severas, irão vir a formar colesteatomas. SADÉ et al. (1981)<sup>47</sup>, em uma coorte envolvendo 308 orelhas de 215 pacientes, com retrações da MT de localização e graus variados, observou somente 3 casos (0,97%) de colesteatoma durante um tempo de seguimento médio de 3 anos. Este estudo possui como uma grande limitação o fato de muitos pacientes terem sofrido algum tipo de intervenção como colocação de tubos de ventilação ou timpanoplastias.

Algumas evidências clínicas e experimentais<sup>48,49,50,51,52</sup> apontam que a evolução desta patologia iniciaria por retração da MT seguida por perda de propriedade de autolimpeza nesta região com acúmulo de queratina e consequente formação do colesteatoma. No entanto, para alguns autores parece imprescindível que uma série de insultos inflamatórios e infecciosos devam atuar como determinantes neste processo. SUDHOFF e TOSS (2000)<sup>50</sup> propuseram uma combinação da teoria de invaginação e da proliferação de queratinócitos. Através da análise imunohistoquímica de colesteatomas aticais, observaram proliferação de queratinócitos dentro de cones epiteliais levando a áreas de descontinuidade da

membrana basal, especialmente na presença de intenso processo inflamatório subepitelial. JUHN et al. (2008)<sup>53</sup>, referem que a liberação de citocinas por células imunes locais são responsáveis por desencadear o estado hiperproliferativo dos queratinócitos. O controle ineficaz desta resposta inflamatória aliado à presença de bactérias no local com seus produtos nocivos, são capazes de magnificar este processo. MANIU et al. (2014)<sup>54</sup>, em revisão sobre a biologia molecular do colesteatoma, concluíram que o mesmo pode ser considerado decorrente de uma desordem no controle da proliferação celular. O que permanece incerto é se falta desse controle ocorre devido à falha de genes supressores, ao processo inflamatório subjacente ou a mecanismos ainda desconhecidos.

Embora diferentes umas das outras, as teorias não são excludentes entre si, ou seja, não são capazes de, isoladamente, explicar a patogênese de todos os colesteatomas. É incontestável a existência de colesteatomas congênitos, a formação de colesteatomas por implantação e até mesmo por invaginação da MT, mas estas situações não podem ser responsabilizadas por todos os casos da doença. Acredita-se que a combinação de várias dessas teorias permite um melhor entendimento da patogênese do colesteatoma e neste sentido, a hipótese do *continuum*, postulada por PAPARELLA em 1970<sup>55</sup>, permite uma concepção mais abrangente e multifatorial. Segundo a mesma, a otite média persiste ao longo de uma série contínua de eventos epiteliais e subepiteliais, sendo que após um insulto inicial, uma otite serosa ou purulenta vem a tornar-se seromucóide, mucóide e, caso não haja regressão espontânea ou terapêutica do quadro, sobrevém a cronificação. Pode-se dizer, tomando como base essa hipótese, que o colesteatoma não representa um evento isolado, mas sim o ápice de uma única patologia, a OMC<sup>6</sup>.

Estudos em humanos com o propósito de compreender melhor a história natural dessa doença e desvendar os mecanismos intrincados na sua patogênese são extremamente difíceis de serem realizados. A baixa incidência na população, a lenta progressão da doença, a dificuldade em manter o seguimento dos pacientes, assim como a dificuldade em realizar estudos histológicos em ossos temporais humanos, criou espaço para que diversos modelos animais fossem desenvolvidos com este objetivo.

### 1.3 Uso de espécies animais para estudo do colesteatoma

Modelos experimentais com uso de animais são utilizados em todas as áreas de pesquisa médica na busca do aperfeiçoamento do conhecimento acerca das doenças. Além de auxiliar no entendimento dos fenômenos naturais, permitem ampliar a compreensão dos processos etiopatogênicos e fisiopatológicos, bem como de suas possibilidades diagnósticas e terapêuticas<sup>56,57</sup>. A pesquisa animal pode ser classificada em 4 categorias, segundo o modelo de experimentação: induzido, espontâneo, negativo e órfão. O modelo induzido, como subentendido pelo nome, representa uma situação na qual a doença a ser investigada é induzida experimentalmente, permitindo a livre escolha de espécies. O modelo espontâneo consiste na observação de variantes genéticas da doença humana que ocorrem naturalmente em determinada espécie animal. Em contraponto a estes dois modelos, no modelo negativo utiliza-se uma espécie na qual a doença não se desenvolve ou que demonstre a falta de reatividade a algum estímulo específico, tendo como principal aplicação o estudo dos mecanismos de resistência contra a afecção pesquisada. Por último, o modelo órfão é aquele onde se observa uma condição que ocorre naturalmente em espécies não-humanas e que ainda não foi descrita em humanos. Quando esta doença vem futuramente a ser identificada em humanos, o modelo órfão é então “adotado” para ajudar na compreensão da mesma. Dentre esses 4 modelos, os mais utilizados (inclusive no estudo do colesteatoma), são os modelos induzido e espontâneo<sup>58</sup>.

A escolha do modelo animal a ser utilizado deve ser criteriosa e é fundamental no planejamento da pesquisa. Para tal, não se pode assumir que a proximidade filogenética ou mesmo a conformidade anatômica sejam características totalmente confiáveis e, por conseguinte, suficientes para presumir um comportamento fisiológico da doença similar entre diferentes espécies. A escolha de um modelo inadequado suscitará muitas limitações na análise e interpretação dos desfechos da pesquisa, assim como na extrapolação de seus resultados para os seres humanos<sup>58,59</sup>.

FRIEDMANN em 1955<sup>60</sup> foi um dos primeiros a utilizar modelos animais para tentar explicar a formação do colesteatoma. Assim como outros autores à época, conduziu estudos utilizando porcos-da-índia como modelo experimental<sup>61,62,63,64</sup>.

PAPARELLA et al. (1970)<sup>55</sup> provocaram o desenvolvimento de otite média em macacos após obliteração da TA por meio de introdução de uma esponja de silicone em seu óstio na rinofaringe. Em 1980, STEINBACH<sup>65</sup> procedeu a ligadura do CAE de coelhos e após 12 semanas de seguimento obteve uma incidência de 33,3% de colesteatoma.

Em 1981 CHOLE et al.<sup>66</sup> relataram a ocorrência de forma espontânea do colesteatoma em 45,7% das orelhas examinadas de esquilos da Mongólia, com comportamento destrutivo e padrão histológico semelhante ao encontrado em humanos. Como tal fato não havia sido observado em nenhum outro modelo anteriormente estudado, a utilização deste espécime passou a ser preferida por muitos pesquisadores para estudo da patogênese do colesteatoma.

No ano seguinte, em 1982, MCGINN et al.<sup>67</sup>, procederam a ligadura do CAE destes animais através de uma incisão retroauricular. Com dois meses de seguimento era possível ver restos de queratina na superfície lateral da membrana timpânica e, após três meses, 100% as orelhas examinadas apresentavam colesteatoma em estágios iniciais. Ainda observaram que o colesteatoma induzido não diferia histologicamente daquele encontrado de forma espontânea. Em 1984, o mesmo grupo comparou os resultados da ligadura do CAE destes animais com a de porcos-da-índia, ratos, camundongos e gatos. Em todas espécies este procedimento levava a depósitos de queratina na MT. Nos esquilos da Mongólia, entretanto, este processo ocorria mais rapidamente e, após 52 dias de seguimento, todas orelhas examinadas apresentavam colesteatoma em estágio ao menos inicial. Nas demais espécies, a queratina acumulava-se lentamente, não ocorrendo deslocamento medial da MT mesmo 10 meses após o procedimento<sup>68</sup>.

Na tentativa de reproduzir o mecanismo de invaginação da MT, WOLFMAN et al. (1986)<sup>69</sup> realizaram a eletrocauterização bilateral da TA via transpalatal de 16 espécimes. Retração da *pars flácida* e colesteatoma foram encontrados em 6 das 8 orelhas (75%) avaliadas 16 semanas após o procedimento. Naquelas onde a doença não se desenvolveu presume-se que a obliteração da TA auditiva após o procedimento nunca foi atingida ou, quando ocorreu, sua função acabou retornando ao normal.

Em 1998, KIM e CHOLE procederam a obliteração do CAE, eletrocauterização da TA e injeção de propilenoglicol na orelha média de esquilos da



Mongólia. Dentre as orelhas avaliadas 12 semanas após as intervenções, a incidência de colesteatoma encontrada foi de 100%, 80% e 50%, respectivamente<sup>70</sup>.

LARSSON et al.<sup>71</sup> em 1999 identificaram um espessamento total da MT devido a um aumento de células epiteliais na camada externa e de fibras colágenas na lâmina própria após ligadura do CAE nestes animais. Contraditoriamente, von UNGE et al. (1999)<sup>72</sup>, utilizando o mesmo modelo experimental atribuíram o aumento da espessura da lâmina própria da MT ao edema associado. Para os autores, na presença de edema ocorre uma diminuição na densidade das fibras colágenas, mas não de seu número total, fazendo com que estas se separem espacialmente umas das outras culminando com a perda de suas propriedades elásticas.

TINLING et al. em 2006<sup>73</sup>, observaram que os esquilos da Mongólia apresentavam migração epitelial muito semelhante à verificada em humanos, partindo do umbus em direção à periferia da MT. Entretanto, nos porcos-da-índia o sentido da migração ocorria da região superior para inferior, diferindo da encontrada na espécie humana.

Em outro estudo publicado no mesmo ano, TINLING et al.<sup>74</sup> analisaram as características histopatológicas e otomicroscópicas durante o desenvolvimento do colesteatoma espontâneo em esquilos da Mongólia. A avaliação das alterações encontradas em 131 orelhas levou os autores à conclusão de que o desenvolvimento do colesteatoma nestes animais segue uma sequência de eventos: inicialmente ocorre espessamento leve da *pars flácida*, sem presença de efusão na orelha média; em seguida, soma-se ao espessamento da *pars flácida* o achado de efusão na orelha média; progressivamente, inicia-se o acúmulo de debris celulares no CAE junto à MT; finalmente, ocorre completa oclusão do CAE e desenvolvimento do colesteatoma. Para os autores, embora nem sempre visível inicialmente pela otomicroscopia, um insulto inflamatório inicial na orelha média induz à hiperproliferação de queratinócitos na membrana basal da MT e aumento na produção de queratina em sua superfície lateral. Partindo deste ponto, muitas orelhas acabaram não progredindo para a oclusão do CAE devido a uma capacidade de autolimpeza, inclusive podendo retornar ao estado de normalidade. Em 17 orelhas, no entanto, ocorreu o desenvolvimento do colesteatoma sugerindo que a falha deste mecanismo de autolimpeza epitelial seja um fator determinante para a ocorrência da doença.

Ainda em 2006, esse mesmo autor realizou a obliteração do CAE, ou a

cauterização elétrica da TA ou os dois métodos combinados em esquilos da Mongólia. Das 28 orelhas analisadas (14 com alguma intervenção e 14 controles), 8 desenvolveram colesteatoma espontaneamente (3 casos) ou por indução (5 casos), histologicamente indistinguíveis uns dos outros, independentemente do tempo de seguimento ou do método utilizado. Neste estudo, a única orelha submetida a cauterização da TA que desenvolveu colesteatoma não apresentava histologicamente sinais de retração da *pars* flácida da MT, sugerindo que este achado não seja imprescindível para o desenvolvimento da doença. Ainda, observaram que o índice de proliferação de queratinócitos basais da MT e do CAE era 7 vezes maior nas orelhas com colesteatoma quando comparadas às orelhas controles normais. Por fim, concluíram que o colesteatoma em esquilos da Mongólia se desenvolve seguindo um ciclo: 1) um processo inflamatório na orelha média pode desencadear, ou ocorrer em conjunto com um distúrbio do mecanismo de *clearance* da queratina esfoliada, resultando em acúmulo da mesma no fundo do CAE ou sobre a MT; 2) uma disfunção no ciclo celular leva ao aumento do índice de proliferação basal de queratinócitos da MT; 3) este aumento da proliferação, não acompanhado de um aumento na maturação dos queratinócitos provoca o espessamento deste epitélio; 4) com maior produção de queratina e bloqueio da abertura do CAE, gradualmente outras áreas até então não atingidas da MT e do CAE começam a sofrer as mesmas alterações; 5) O acúmulo gradual de queratina resulta na distensão da MT em direção à orelha média e conseqüentemente ao desenvolvimento do colesteatoma nestes animais<sup>75</sup>.

FUKUDA et al. (2010)<sup>76</sup>, propuseram um novo modelo experimental utilizando esquilos da Mongólia. Eles realizaram a retirada da *pars flácida* da MT da orelha de machos e implantaram neste local a porção correspondente da MT de fêmeas. Posteriormente, realizaram a obliteração do CAE para induzir colesteatoma. Este grupo foi denominado de modelo híbrido. Como controles utilizaram as outras orelhas de machos e fêmeas, não transplantadas, nas quais também realizaram a obliteração do CAE. Através da análise de reação em cadeia da polimerase (PCR) das células epiteliais do colesteatoma, rastream a presença de um gene relacionado exclusivamente ao cromossomo X, o qual está presente de forma unitária nos machos (XY) e de forma unitária ou dupla nas fêmeas (XX). No grupo do modelo híbrido, o gene foi identificado de forma unitária ou dupla, assim como nos orelhas controles das fêmeas. Já nas orelhas controles dos machos, o gene foi

encontrado exclusivamente de forma unitária. Também realizaram a pesquisa deste gene nas células epiteliais da epiderme do CAE do grupo modelo híbrido, identificando somente um único gene (células XY). Estes achados permitiram que os autores concluíssem que as células epiteliais presentes no colesteatoma tem sua origem fundamentalmente na MT e não nas células do fundo do CAE ou da orelha média.

KIM et al.<sup>77</sup> em 2002, analisaram o padrão de expressão de citoqueratinas (CKs) no CAE e na MT de esquilos da Mongólia submetidos a ligadura do CAE. Nos casos onde se desenvolveu colesteatoma a expressão de CKs foi mais intensa na *pars tensa* da MT do que na camada suprabasal do CAE, em contraponto ao encontrado em orelhas normais. Ainda, ao observarem aumento de expressão de CK4 na pele do fundo do CAE e a transição da CK13/16 da camada basal para suprabasal insinuaram que o processo de migração epitelial também estaria alterado, sendo parte integrante da patogênese do colesteatoma.

Em 2003, WILMOTH et al.<sup>78</sup> estudaram a expressão de fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF-alfa) e metaloproteinases da matriz (MMPs) em esquilos da Mongólia após cauterização da TA. Observaram que os níveis de TNF-alfa aumentavam a medida que o processo inflamatório da orelha média tornava-se crônico e, completados 84 dias após o procedimento, a diferença era significativa quando comparado às orelhas controles, orelhas com otite média aguda e orelhas que sofreram a cauterização da TA mas não desenvolveram processo inflamatório. Já ao analisar os níveis de MMPs, os mesmos já mostravam-se aumentados após 7 dias do procedimento. Por meio destes achados, a hipótese dos autores foi que a presença de um processo inflamatório na orelha média induziria a ativação de MMPs levando a deterioração do estroma fibroso da MT. Adicionalmente, algumas citocinas liberadas, como por exemplo o TNF-alfa, teriam a capacidade de regular a atividade das MMPs. Estas observações sugerem que a produção de TNF-alfa e MMPs secundária ao processo inflamatório crônico da orelha média podem levar a alterações irreversíveis da MT, induzindo retrações localizadas ou até mesmo sua atelectasia total, evoluindo com destruição óssea local e desenvolvimento do colesteatoma.

Em seres humanos o colesteatoma apresenta um grande poder de erosão óssea, atingindo primeiramente a cadeia ossicular e menos frequentemente o labirinto, podendo se estender além dos limites do osso temporal<sup>6</sup>. No que tange ao

potencial destrutivo do colesteatoma induzido em esquilos da Mongólia alguns autores estudaram as características de reabsorção óssea presente neste modelo. Segundo ABERG et al. (1993)<sup>79</sup>, em todos os casos de colesteatoma onde foram identificados sinais de reabsorção óssea havia um espesso tecido de granulação envolvendo a superfície do osso, contendo numerosos macrófagos de reabsorção. Ainda, relataram que o grau de reação inflamatória aguda ou crônica não apresenta correlação direta com o grau de envolvimento ósseo. Diferentemente de CHOLE et al. (1984)<sup>80</sup> que acreditavam que o processo de reabsorção óssea derivava principalmente da proliferação e ativação osteoclástica aumentada, ABERG et al.<sup>79</sup> identificaram estas células apenas ocasionalmente em áreas de reabsorção lacunar. Desta forma, os autores concluíram que o processo inflamatório subjacente não constitui um pré-requisito para o envolvimento ósseo encontrado no colesteatoma, mas pode ser um evento secundário capaz de intensificar ou, até mesmo, promover o processo de destruição óssea. Ainda, segundo outros estudos<sup>81,82</sup>, ficou evidenciado que a destruição óssea pode ocorrer mesmo sem contato direto do colesteatoma com o osso subjacente, como demonstrado por CHOLE et al. em 1985<sup>81</sup>. Neste trabalho o autor encontrou sinais de reabsorção óssea mesmo separando o colesteatoma do promontório por uma membrana artificial. Como postulado acima sugere-se que o efeito pressórico causado pelo colesteatoma em crescimento sobre a mucosa da orelha média seria o evento primário, levando a formação de um tecido de granulação com liberação de enzimas lisosomais e hidrolíticas, bem como ativação de macrófagos de reabsorção e consequente destruição óssea local<sup>79</sup>.

CHOUFANI et al. (2007)<sup>83</sup>, encontraram diferenças estatisticamente significativas entre uma série de marcadores biológicos envolvidos na resposta inflamatória, na diferenciação e na adesão celular, encontrados no colesteatoma induzido pela ligadura do CAE em esquilos da Mongólia quando comparados com os encontrados em humanos. Em virtude das discrepâncias encontradas entre estes marcadores, os autores questionam a verdadeira relevância deste modelo em relação a sua forma clínica.

#### 1.4 Justificativa

A dificuldade de realização de estudos em humanos torna a utilização de modelos animais uma ferramenta fundamental para a compreensão da patogênese do colesteatoma. Dentre os modelos estudados, o uso de esquilos da Mongólia é o mais amplamente utilizado. Está bem estabelecido na literatura que o colesteatoma desenvolvido espontaneamente nestes animais é semelhante ao induzido através da obliteração do CAE, sendo que este método eleva a incidência para próximo a 100%<sup>66,67,74</sup>. No entanto, este modelo de indução não reproduz a fisiopatologia da forma clínica da doença, tendo em vista que o colesteatoma de orelha média em humanos ocorre mesmo na vigência de um CAE patente. Seguindo esta linha de raciocínio, ao iniciarmos dentro do nosso grupo de pesquisa o desenvolvimento de modelos experimentais para estudo do colesteatoma, consideramos o método de cauterização da TA como o de escolha para tal.

Em nosso primeiro trabalho, BAUER et al. (prelo), induziram colesteatoma através da cauterização da TA destes animais e realizaram acompanhamento com otoendoscopias seriadas, algo até então não descrito na literatura. A análise histológica ao término de 16 semanas de seguimento documentou a formação de colesteatoma em 29 das 38 orelhas que sofreram a intervenção (76,3%) e em 18 das 34 orelhas do grupo controle (52,9%) segundo a classificação histológica de *Chole* et al (1981)<sup>66</sup>, números semelhantes ao encontrados por outros autores<sup>69,70</sup>.

Em virtude de todo o exposto anteriormente, acreditamos que o mecanismo de formação do colesteatoma em esquilos da Mongólia pelo método mais amplamente utilizado, o de obliteração do CAE, não seja o mais compatível com o mecanismo observado em humanos. Apesar de alguns trabalhos apresentados anteriormente terem mostrado diferenças na expressão de marcadores biológicos entre este modelo animal e o humano<sup>83</sup> a busca por novos marcadores e por algumas semelhanças fisiopatológicas ainda pode ser explorada. Com esta perspectiva em mente, procuramos com este trabalho continuar o desenvolvimento de modelos animais em nosso grupo de pesquisa, promovendo agora a comparação dos achados histológicos entre os métodos de cauterização da TA e obliteração do CAE em esquilos da Mongólia, visando agregar conhecimento para que possamos avançar na compreensão dos mecanismos intrincados envolvidos na patogênese do

### 1.5 Objetivos Gerais

- Desenvolvimento de um modelo animal para estudo dos colesteatomas utilizando esquilos da Mongólia;
- Comparar as incidências dos colesteatomas dos esquilos da Mongólia induzidos através da cauterização da tuba auditiva e da obliteração do conduto auditivo externo.
- Analisar e comparar histologicamente as características dos colesteatomas induzidos utilizando os dois métodos anteriormente citados.

## 2 MÉTODOS

### 2.1 Local e população do estudo

O estudo foi realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), em sua Unidade de Experimentação Animal (UEA), no período de novembro de 2017 a novembro de 2018.

Foram utilizados para este trabalho 27 esquilos da Mongólia (*M. unguiculatus*) provenientes de um biotério com sede na cidade de Santa Maria e credenciado junto ao HCPA. Todos os animais eram do sexo masculino com idade variando de 102 a 151 dias de vida ( $125 \pm 16,3$ ) na avaliação inicial. Após a chegada na UEA, antes do início dos procedimentos de pesquisa, passaram por um período de aclimação/quarentena não inferior a 15 dias.

Foram mantidos em alojamento específico para a espécie durante o período do estudo, com umidade relativa do ar em 40-60%, temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), ciclo de luz de 12 h claro/12 h escuro e sistema de exaustão de ar (Figura 1). Foram agrupados em caixas moradia com no máximo 4 animais, recebendo ração padrão para a espécie e água *ad libitum* (Figura 2). Os métodos de enriquecimento do ambiente utilizados foram papel toalha, iglu, toco de madeira e sementes de girassol.

Figura 1 – Alojamento.



Fonte: o autor.

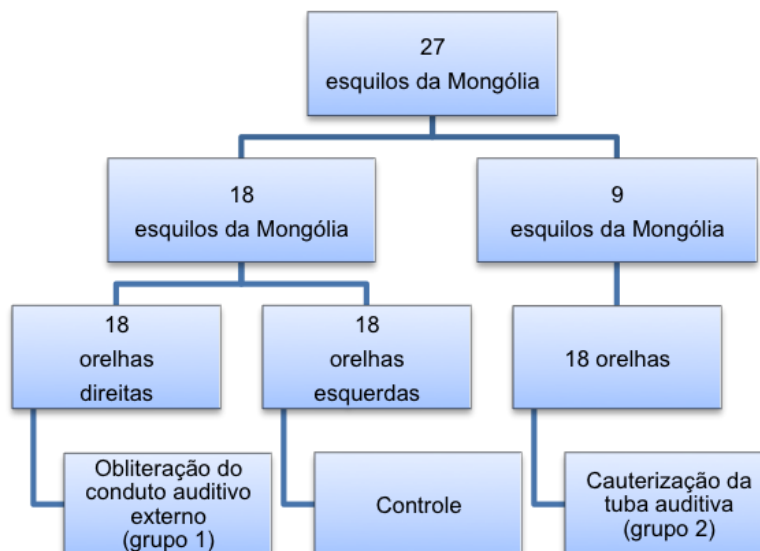
Figura 2 – caixa moradia



Fonte: o autor.

Os animais foram divididos em 3 grupos de maneira que obtivéssemos o mesmo número de orelhas entre eles para comparação conforme apresentado na Figura 3. Assim sendo, dezoito (18) animais foram submetidos a obliteração do CAE de suas orelhas direitas ( $n=18$  orelhas), correspondendo ao grupo 1. As orelhas esquerdas destes animais foram utilizadas para compor o grupo controle ( $n=18$  orelhas). Os 9 animais restantes foram submetidos a cauterização das TA bilateralmente, perfazendo um total de 18 orelhas, integrando o grupo 2.

Figura 3 – Divisão dos animais em grupos de pesquisa.



Fonte: o autor.



Antes de iniciar os procedimentos da pesquisa todos os espécimes foram submetidos à otoendoscopia bilateral, sob anestesia geral inalatória, com ótica da marca Karl-Storz de 0º, 2,7 mm de diâmetro e 18cm de comprimento. A gravação dos exames foi realizada em DVD para análise posterior. (Figuras 4 e 5).

Figura 4 – avaliação otoendoscópica pré procedimento.



Fonte: o autor.

Figura 5 – Otoendoscopia de orelha esquerda normal de um Esquilo da Mongólia.



Fonte: o autor.

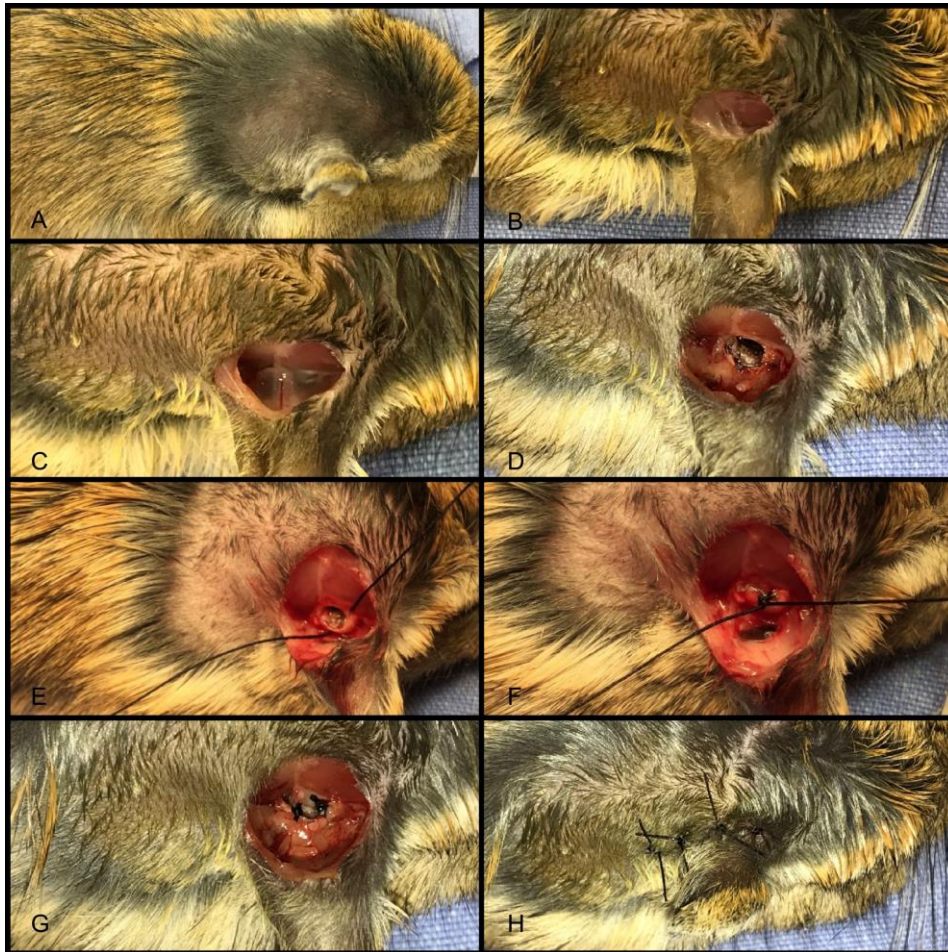
## 2.2 Critérios de exclusão

Os animais que apresentassem achados compatíveis com otite média colesteatomatosa, estenose do CAE ou outra malformação da orelha externa, na ocasião da otoendoscopia pré-procedimento, seriam excluídos da análise dos resultados, assim como os animais que apresentassem preenchimento total do CAE por cerume e/ou restos epiteliais.

## 2.3 Procedimentos realizados

Obliteração do conduto auditivo externo: conduzida no centro cirúrgico da UEA sob anestesia geral por indução e manutenção com isoflurano (na concentração de 4-5% e 2-3%, respectivamente) diluído em oxigênio a 100% (com fluxo de O<sub>2</sub> = 0,5L/min). Como analgésico, recebiam cloridrato de tramadol (50mg/mL) na dose de 30mg/kg, por via intraperitoneal, previamente ao procedimento. Realizava-se a tricotomia da região retroauricular direita e antisepsia com iodoform aquoso, seguida de aplicação de anestesia local com 0,1 mL de bupivacaína 0,5% com adrenalina na concentração final de 1:200.000. Conforme descrito por McGINN et al.<sup>67</sup> em 1982, após a infiltração era realizada a incisão retroauricular a direita de aproximadamente 1cm de extensão com bisturi lâmina 15 e dissecação do tecido subcutâneo até identificar-se a porção membranosa do CAE. Após, procedia-se a incisão do CAE e sutura de sua porção cartilaginosa com fio cirúrgico do tipo seda 4.0. O fechamento da pele foi feito com fio mononylon 4.0 (Figura 6). Em caso de desconforto no período pós-operatório, a mesma dose de tramadol seria administrada por via intraperitoneal a cada 12 horas nos primeiros 3 dias e demais administrações conforme necessidade e avaliação do médico veterinário responsável na unidade.

Figura 6 – Obliteração do conduto auditivo externo



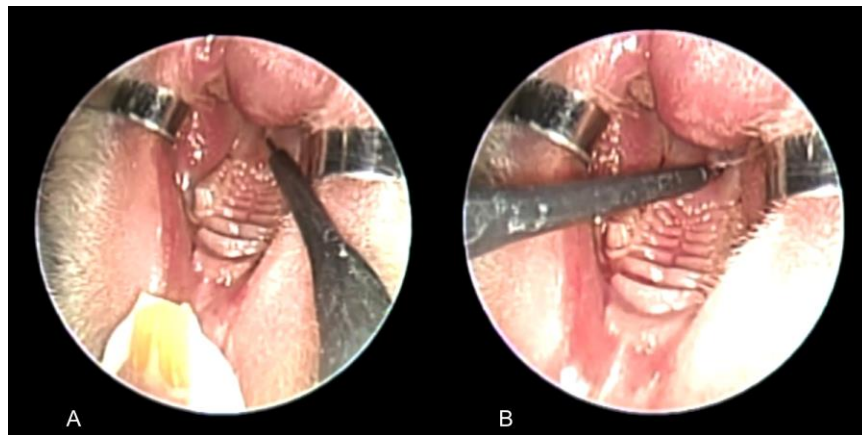
A) tricotomia região retroauricular direita. B) incisão da pele com bisturi lâmina 15. C) identificação da porção membranosa do CAE. D) incisão do CAE. E-F) sutura da porção cartilaginosa do CAE com fio seda 4-0. G) aspecto final da ligadura do CAE. H) sutura da pele com fio mononylon 4-0.

Fonte: o autor.

Cauterização da tuba auditiva: conduzida no centro cirúrgico da UEA sob o mesmo tipo de anestesia, bem como cuidados pós operatórios supra citados. Não era realizado nenhum tipo de anestesia tópica. A cauterização foi realizada utilizando cautério monopolar com ponta em agulha, via transpalatal. Seguindo a técnica descrita em por WOLFMAN e CHOLE (1986)<sup>69</sup> a agulha foi introduzida no palato mole a aproximadamente 5mm da transição entre este e o palato duro, sendo levemente lateralizada para direita e após para esquerda para atingir os respectivos óstios tubários (Figura 7). Em não havendo evidências na literatura sobre a intensidade e tempo de permanência da cauterização optamos por utilizar como parâmetros a potência de 12mvolts pelo período de 1 a 2 segundos em cada lado para cauterização de ambas tubas auditivas. Vale ressaltar que por ser um método

indireto (sem haver a visualização direta dos óstios tubários), o procedimento de todos os espécimes do grupo 2 foi realizado sempre pelo mesmo pesquisador.

Figura 7 – Cauterização da tuba auditiva.



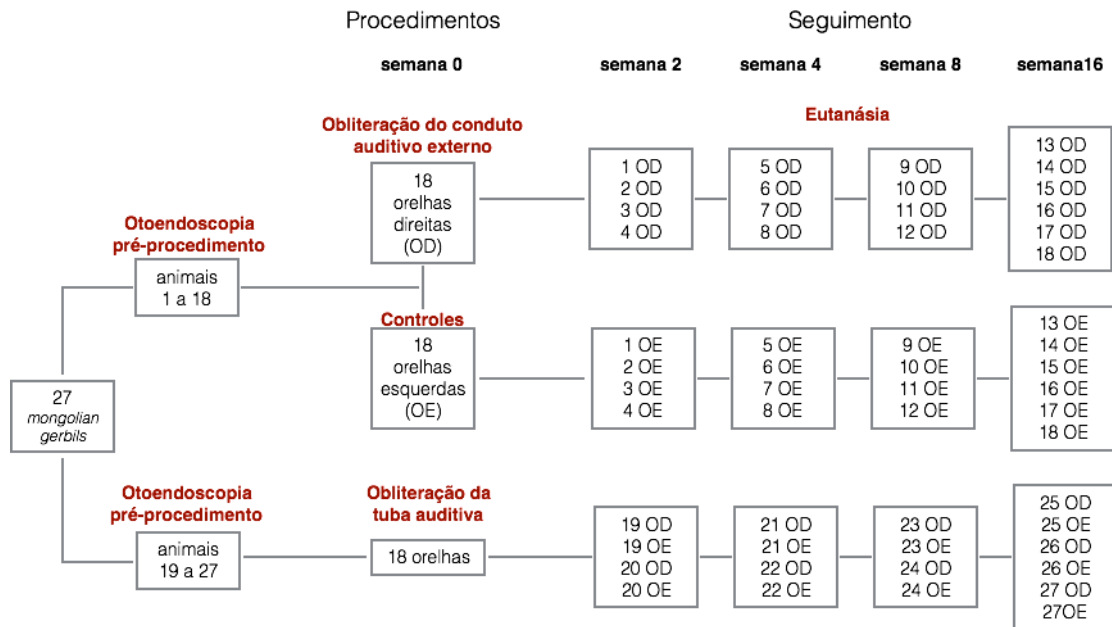
A) cauterização da TA esquerda. B) cauterização da TA direita.

Fonte: o autor.

Seguimento: McGINN et al. (1982)<sup>67</sup> através da obliteração do CAE observou a formação de colesteatoma após 12 semanas de seguimento em todas as orelhas operadas. WOLFMANN e CHOLE (1986)<sup>69</sup> encontraram colesteatoma em 75% das orelhas após 16 semanas da cauterização da TA. Neste mesmo trabalho os autores descreveram alterações na MT e presença de líquido na orelha média percebidos após 2 semanas do procedimento.

Considerando os dados apresentados acima, optamos por acompanhar os animais após os procedimentos do estudo em intervalos de tempo que variaram de duas a dezesseis semanas até o momento da eutanásia, conforme ilustrado na Figura 8 e discorrido abaixo.

Figura 8 – Fluxograma de seguimento após as intervenções.



OD: orelha direita. OE: orelha esquerda. *mongolian gerbils*: esquilos da Mongólia.  
 Fonte: o autor.

Após obliteração do conduto auditivo externo (grupo 1) e grupo controle:

Quatro animais com 2 semanas de seguimento, 4 com 4 semanas, outros 4 com 8 semanas e os restantes 6 animais ao completarem 16 semanas após o procedimento inicial.

Após cauterização da tuba auditiva (grupo 2):

Dois animais com 2 semanas, 2 com 4 semanas, 2 com 8 semanas e 3 ao completarem 16 semanas de seguimento.

Eutanásia: A eutanásia dos espécimes foi realizada com sobredose anestésica de isoflurano (9-12%), vaporizado em oxigênio a 100% (fluxo de O<sub>2</sub> de 0,5 L/min) em concentração igual ou superior a 5%, fornecido por via inalatória. Os sinais clínicos condizentes com óbito - ausência de movimento respiratório, ausência de batimentos cardíacos, ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal - foram monitorados por um período adicional de 10 minutos após a parada

respiratória. Somente após este período era dada a comprovação do óbito pelo médico veterinário.

Após a eutanásia todas as orelhas pertencentes aos três grupos foram reavaliadas por otoendoscopia bilateral.

Histologia: após a eutanásia os ossos temporais direito e esquerdo foram retirados dos animais e fixados em solução de formol pelo período de 48h. Ao término deste prazo iniciava-se o processo de descalcificação utilizando ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) 10%, trocado a cada 24h horas. O grau de descalcificação foi verificado através da introdução de uma agulha fina na peça anatômica em cada uma dessas trocas. Ao término de 7 dias, em média, a descalcificação atingiu seu estágio ideal quando podia-se transfixar o osso com discreta resistência, sem no entanto quebrá-lo.

Após processamento, as peças foram incluídas em parafina e submetidas a cortes entre 5 e 10  $\mu\text{m}$  no plano axial através de um micrótomo. Para análise microscópica foram escolhidos os cortes mais representativos a nível da linha média do CAE, que incluíssem necessariamente em um mesmo plano o CAE, a MT, o promontório e parte da bula do animal. Todas as etapas descritas foram realizadas por profissionais especializados do laboratório de patologia experimental do HCPA e acompanhadas pelo pesquisador responsável por esse trabalho.

Após fixação as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (Figura 9) e avaliadas em conjunto com patologista da UEA (cegado em relação ao grupo ao qual pertencia a orelha em análise) utilizando um microscópio óptico binocular E100 Nikon®, com aumento de sessenta vezes.

Figura 9 – corte histológico corado em hematoxilina e eosina de osso temporal de um esquilo da Mongólia de aspecto normal.



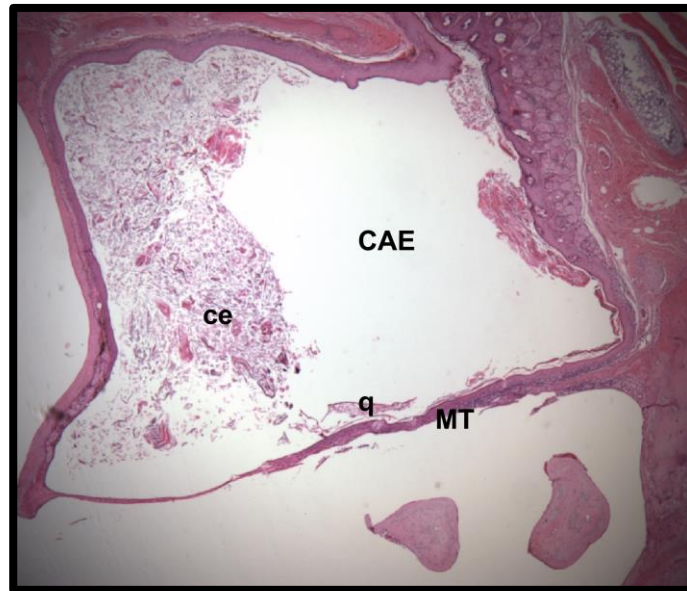
C: cóclea; MT: membrana timpânica; MA: martelo; CAE: conduto auditivo externo.

Fonte: BAUER et al., 2017, no prelo.

Quanto à definição e classificação histológica do colesteatoma, seguimos a proposta por CHOLE et al. em 1981<sup>66</sup>. Segundo os autores, define-se colesteatoma perante a presença de acúmulo de queratina junto a MT preenchendo de forma parcial ou total o CAE, associado ou não à invasão da orelha média, ou demais estruturas intracranianas. Ele classifica os achados histológicos em 5 estágios conforme apresentado a seguir:

- Estágio 1: acúmulo de queratina no CAE e/ou junto a MT, sem deslocamento medial da mesma (Figura 10);
- Estágio 2: queratina preenchendo o CAE e provocando o deslocamento medial da MT, sem contato com o promontório (Figura 11);
- Estágio 3: a MT é deslocada medialmente tocando o promontório do animal (Figura 12);
- Estágio 4: presença de material inflamatório e queratina preenchendo bula do animal;
- Estágio 5: presença de extensão do processo inflamatório para região intracraniana.

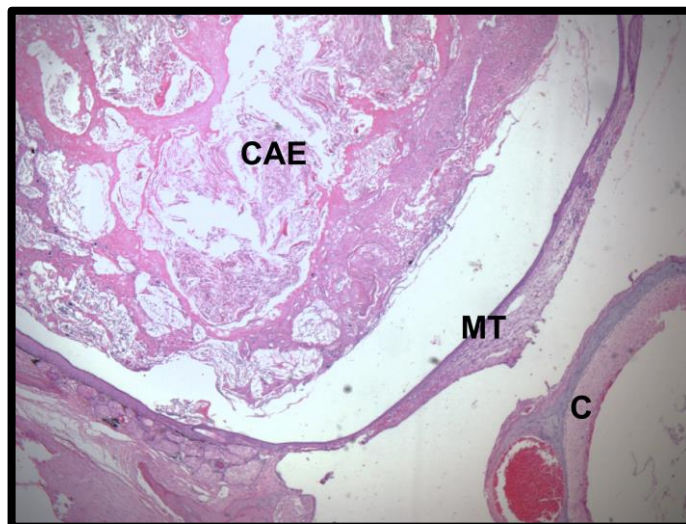
Figura 10 – Colesteatoma estágio I: Acúmulo de cerume/restos epiteliais e queratina junto a membrana timpânica, sem seu deslocamento medial.



CAE: conduto auditivo externo; MT: membrana timpânica; ce: cerume/restos epiteliais; q: queratina.

Fonte: o autor.

Figura 11 – Colesteatoma estágio 2: acúmulo de restos epiteliais e queratina preenchendo todo conduto auditivo externo provocando o deslocamento medial da membrana timpânica, sem contato com a mucosa do promontório.

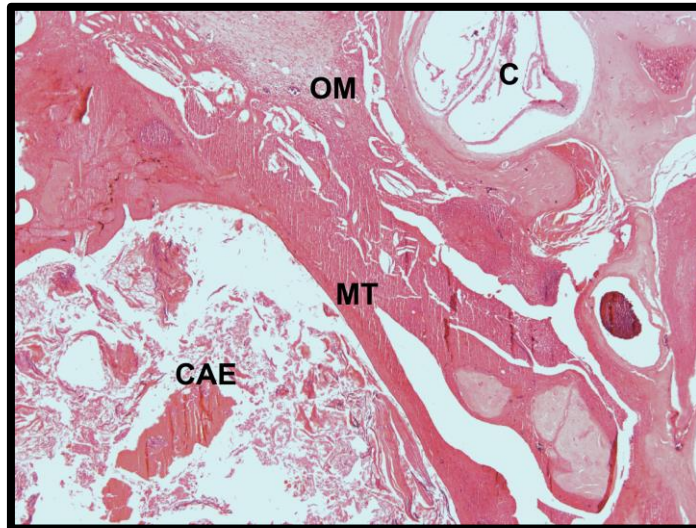


CAE: conduto auditivo externo; MT: membrana timpânica. O espaço entre a massa de queratina e restos epiteliais no CAE e a MT pode ser atribuída a artefato na confecção da peça.

Fonte: o autor.



Figura 12 – Colesteatoma grau 3: deslocamento medial da membrana timpânica em contato com a mucosa da cóclea. Presença de reação inflamatória preenchendo a orelha média.



CAE: conduto auditivo externo; MT: membrana timpânica;  
C: cóclea; OM: orelha média.  
Fonte: BAUER et al., 2017, no prelo.

## 2.4 Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido para avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do HCPA. Todos os procedimentos do estudo foram realizados de acordo com a Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008<sup>84</sup>, que regulamenta a utilização de animais na pesquisa científica. Os cuidados e a manipulação dos animais respeitaram as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA – Resolução Normativa 30, 2016, CONCEA, que revogou a Resolução Normativa 12, 2013)<sup>85</sup>. A eutanásia foi realizada conforme a Diretriz para a Prática de Eutanásia do CONCEA (Resolução normativa 13 de 2013)<sup>86</sup>.

## 2.5 Análise estatística

O cálculo de amostra foi realizado através do software GPower 3.1.9.2. Considerando as incidências de colesteatoma espontâneo (13%)<sup>74</sup>, secundário a cauterização da TA (aproximadamente 80%)<sup>69,70</sup>, e após obliteração do CAE (entre 80-100%)<sup>67,70</sup>, um poder estatístico de 80% e erro alfa de 0,05, seriam necessárias

31 orelhas no total. Para obter 3 grupos de igual tamanho seriam necessárias 11 orelhas para cada.

Como um dos objetivos principais do estudo foi avaliar os estágios de formação do colesteatoma, cada grupo foi dividido em 4 subgrupos conforme o tempo de seguimento. Baseado em estudos anteriores que tiveram o mesmo propósito optou-se por alocar pelo menos 4 orelhas em cada subgrupo, ou seja, um mínimo de 16 orelhas por grupo (total de 24 animais)<sup>67,69,70,75</sup>.

Considerando uma possível perda de 10% na amostra (conforme pesquisa preliminar com animais dessa mesma espécie realizada na UEA do HCPA) foram inicialmente submetidos aos procedimentos da pesquisa um total de 27 animais (54 orelhas).

A diferença de incidência de colesteatoma entre os grupos foi calculada utilizando o teste de qui-quadrado de homogeneidade de proporções pelo software SPSS Statistics 24.0.

## 2.6 Delineamento de Pesquisa

- Estudo experimental:
  - Grupo controle: 18 orelhas, sem intervenção.
  - Grupo 1: 18 orelhas submetidas à obliteração do conduto auditivo externo.
  - Grupo 2: 18 orelhas submetidas a cauterização da tuba auditiva.

## 2.7 Desfechos

- Primários:
  - Desenvolvimento do modelo animal de obliteração do conduto auditivo externo de esquilos da Mongólia em nosso serviço.
  - Aprimoramento do modelo animal de cauterização da tuba auditiva de esquilos da Mongólia em nosso serviço.
  - Comparar as incidências de colesteatoma induzido por obliteração do conduto auditivo externo e por cauterização da tuba auditiva em

esquilos da Mongólia.

- Secundários:
  - Identificar potenciais diferenças nos achados histológicos dos colesteatomas desenvolvidos nos grupos estudados.

## REFERÊNCIAS

1. Juhn SK et al. Pathogenesis of otitis media. *Ann Rhinol Otol Laryngol*. 1977;86(4);481-493.
2. Paparella MM. Current concepts in otitis media. *Henry Ford Hosp Med J*. 1983; 31(1);30-36.
3. Schucknecht HF. Surgical pathology. Pathology of the ear. Cambridge: Harvard University, 1974.
4. Tos M. Etiologic factors in secretory otitis. *Adv Otorrhinolaryngol*. 1988; 40: 57-64.
5. Quantin L, Carrera Fernandez S, Moretti J. Congenital cholesteatoma of external auditory canal. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2002; 12(2):175-179.
6. Costa SS, Cruz OLM, De Oliveira, JAA. *Otorrinolaringologia Princípios e Prática*. 2ª edição, 2006.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Johnson F, McMinn R, Atfield G. Ultrastructural and biochemical observations on tympanic membrane. *J Anat* 1968 Sep; 103: 297-310.
12. Stenfeldt K, Johansson C, Hellström S. The collagen structure of the tympanic membrane: collagen types I, II, and III in the healthy tympanic membrane, during healing of a perforation, and during infection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006 Mar;132(3):293-8.
13. Lim DJ. Structure and function of the tympanic membrane: a review. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 1995;49(2):101-15.

14. Lim DJ. Tympanic membrane. II. Pars flaccida. *Acta Otolaryngol.* 1968 Dec;66(6):515-32.
15. Lim DJ. Tympanic membrane. Electron microscopic observation. I: pars tensa. *Acta Otolaryngol.* 1968;66(3):181-98.
16. Junqueira LC, Carneiro, J, Abrahamsohn, P. *Histologia básica: texto e atlas.* 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
17. Litton WB. Epithelial migration over tympanic membrane and external canal. *Arch Otolaryngol.* 1963 Mar;77:254-7.
18. Lee AJ, Jackler RK, Kato BM, Scott NM. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor: progress toward clinical application. *Am J Otol* 1994;15(1):10-8.
19. Somers T, Goovaerts G, Schelfhout L, Peeters S, Govaerts PJ, Offeciers E. Growth factors in tympanic membrane perforations. *Am J Otol* 1998;19(4):428-34.
20. Derlacki EL, Clemis JD. Congenital cholesteatoma of the middle ear and mastoid. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1965; 74: 706-727.
21. Gacek, RR: Diagnosis and Management of Primary Tumors of the Petrous Apex. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1975;84(18): 1-20.
22. Schroer R. 2 cases of traumatic cholesteatoma of middle ear. *Z Laryngol Rhinol Otol.* 1958 Sep;37(9):573-81.
23. McKennan KX, Chole RA. Post-traumatic cholesteatoma. *Laryngoscope* 1989; 99(8): 779-782.
24. Sheehy JL, Brackmann DE, Graham MD. Cholesteatoma surgery: residual and recurrent disease: a review of 1024 cases. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1977; 86(4): 451-462.
25. Wendt H. "Desquamative entzündung des mittelohrs ("Cholesteatom des Felsenbeins")," *Arch Heilkunde*, vol. 14, p. 428, 1873.
26. Sadé J, Babiacki A, Pinkus G. The metaplastic and congenital origin of cholesteatoma. *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 96, no. 1-2, pp. 119-129, 1983.
27. Birrel JF. Cholesteatosis of the attic. *J Laryngol Otol* 1958;72: 620-625.
28. Sceccher, G. A review of cholesteatoma pathology. *Laryngoscopy* 1969; 79: 1907-1920.
29. Habermann J. Zur entstehung des cholesteatoms des mittelohrs. *Archiv für Ohrenheilkunde* 1889; vol. 27, no. 1, pp. 42-50.

30. Bezold F. Perforation of Shrapnell's membrane and occlusion of the tubes: an aetiological study. *Archives of Otolaryngology*, vol. 19, pp. 232–254, 1890.
31. Aberg, B et al. Evaluation of epidermal hyperproliferation in patients with cholesteatoma. *Am J Otol* 1991; 12:93-96.
32. Moriarty BG, Johnson AP, Patel P. Patterns of epithelial migration in the unaffected ear in patients with history of unilateral cholesteatoma. *Clin Otolaryngol* 1991; 16: 48-51.
33. Manasse, P. In *Ohrenheilk. Handbuch der Pathologischen Anatomie des Menschlichen*. 1917; Wiesbaden.
34. Lange, W. *Über bei Entstehung cholesteatome*. *Hals Nas Ohrenheilk* 1925; 11:250.
35. Chole RA, Tinling SP. Basal lamina breaks in the histogenesis of cholesteatoma. *Laryngoscope* 1985; 95(3):270-275.
36. Lim, D.J.; Saunders, W.H.: *Acquired Cholesteatoma*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1972;81:2-11.
37. Weiss P: Cellular dynamics. In: *Biophysical Science - A study program*. 3. J Oncley et al. (Ed.) New York, John Wiley and Sons. Inc., 1959, p 17.
38. Giacometti L: *Cells in motion*. *Primate News* 6: 3-9, 1968.
39. Vennix PP et al. Keratinocyte differentiation in acquired cholesteatoma and perforated tympanic membranes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 112: 825-832.
40. Rosito LPS, 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.
41. 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.
42. 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
43. Rosito LPS, Sperling N, Teixeira AR, Selaimen FA, da Costa SS. The role of tympanic membrane retractions in cholesteatoma pathogenesis. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 21.
44. 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.

45. 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.
46. Dominguez S, Harker LA. Incidence of cholesteatoma with cleft palate. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1988 Nov-Dec;97(6):659-60.
47. Sadé J, Avraham S, Brown M. Atelectasis, retraction pockets and cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 1981;92:501-12.
48. Sadé J. Retraction pockets and attic cholesteatomas. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1980, 34:62-84.
49. 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.
50. 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.
51. Louw L. Acquired cholesteatoma pathogenesis: stepwise explanations. *J Laryngol Otol*. 2010 Jun;124(6):587-93.
52. Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of sinus cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264:1137-43.
53. Juhn SK, Jung MK, Hoffman MD, Drew BR, Preciado DA, Sausen NJ, Jung TT, Kim BH, Park SY, Lin J, Ondrey FG, Mains DR, Huang T. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of otitis media and sequelae. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2008 Sep;1(3):117-38.
54. 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.
55. 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.
56. Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenho de pesquisa. *Acta Cir Bras*. 2005;20(Supl 2):2-9.
57. Da Matta a RA. Modelos animais na pesquisa biomédica [editorial]. *Sci Med*. 2010; 20(3):210-11.
58. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirurgica Brasileira*. Vol 19(1) 2004.

59. Calabrese EJ. Principles of animal extrapolation. Michigan: Ed. Lewis Publishers ;1991.
60. Friedmann I. The comparative pathology of otitis media, experimental and human. II. The histopathology of experimental otitis of the guinea-pig with particular reference to experimental cholesteatoma. *J Laryngol Otol.* 1955 Sep;69(9):588-601.
61. Ruedi L. Cholesteatoma formation in the middle ear in animal experiments. *Acta Otolaryngol.* 1959 May-Aug;50(3-4):233-40.
62. Fernandez C, Lindsay JR. Aural cholesteatoma. Experimental observations. *Laryngoscope.* 1960 Aug;70:1119-41.
63. Abramson M, Asarch RG, Litton WB. Experimental aural cholesteatoma causing bone resorption. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1975 Jul-Aug;84(4 Pt 1):25-32.
64. 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.
65. 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.
66. Chole RA, Henry KR, McGinn MD. Cholesteatoma: Spontaneous occurrence in the mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. *Am J Otol.* 1981;2:204–10.
67. McGinn MD, Chole RA, Henry KR. Cholesteatoma. Experimental induction in the Mongolian Gerbil, *Meriones Unguiculatus*. *Acta Otolaryngol.* 1982, 93:61–67.
68. 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.
69. Wolfman, DE, Chole, RA. Experimental Retraction Pocket Cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1986; 95: 639-44.
70. Kim HJ et al. Experimental models of aural cholesteatomas in Mongolian gerbils. 1998 Feb;107(2) 129-34.
71. 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.
72. Von Unge M, Decraemer WF, Dirckx JJ, Bagger-Sjoberg D. Tympanic membrane displacement patterns in experimental cholesteatoma. *Hear Res.* 1999 Feb; 128(1-2):1-15.



73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. Kim HJ, Tinling SP, Chole RA. Increased proliferation and migration of epithelium in advancing experimental cholesteatomas. *Otol Neurotol* 2002; Nov; 23(6): 840-4
78. Wilmoth JG, Schultz GS, Antonelli PJ. Matrix metalloproteinases in a gerbil cholesteatoma model. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 Oct; 129(4):402-7.
79. Aberg B, Edstrom S, Bagger-Sjoberg D, Kindblom LG. Morphologic development of experimental cholesteatoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993 Mar; 119(3):272-5.
80. Chole RA. Cellular and subcellular events of bone resorption in human and experimental cholesteatoma: the role of osteoclasts. *Laryngoscope.* 1984 Jan;94(1):76-95.
81. Chole R, McGinn M, Tinling S. Pressure induced bone resorption in the middle ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1985;94:165-170.
82. Wolfman DE, Tinling SP. Systemic osteoclast activation by localized pressure. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993 Feb;119(2):165-8.
83. 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.

84. BRASIL. Lei Nº 11.794, de 8 DE Outubro de 2008 (Lei Arouca). Brasília, DF, out 2008. BRASIL. Presidência da República. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Cujo teor encontra-se no sítio <http://www.planalto.gov.br>. Publicada no D.O.U de 09.10.2008.
85. BRASIL, Resolução Normativa CONCEA nº30, de 2 de fevereiro de 2016. Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica – DBCA, cujo teor encontra-se publicado no sítio <http://concea.mct.gov.br>. Publicada no D.O.U de 03.02.2016, Seção I, Pág 3.
86. BRASIL, Resolução Normativa nº13, de 20 de setembro de 2013. Baixa as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. cujo teor encontra-se publicado no sítio <http://concea.mct.gov.br>. Publicada no D.O.U de 26.09.2013, Seção I, Pág 5.