

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

**MODELO EXPERIMENTAL DE RINOSSINUSITE CRÔNICA EM
COELHOS SEM UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS: COMPARAÇÃO DE
TÉCNICAS DE INDUÇÃO**

RAPHAELLA DE OLIVEIRA MIGLIAVACCA

Orientador: Prof. Dr. Sady Selaimen Da Costa
Coorientador: Prof. Dr. Otávio Bejzman Piltcher

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2012

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

**MODELO EXPERIMENTAL DE RINOSSINUSITE CRÔNICA EM
COELHOS SEM UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS: COMPARAÇÃO DE
TÉCNICAS DE INDUÇÃO**

RAPHAELLA DE OLIVEIRA MIGLIAVACCA

Orientador: Prof. Dr. Sady Selaimen Da Costa

Coorientador: Prof. Dr. Otávio Bejzman Piltcher

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Migliavacca, Raphaella de Oliveira
Modelo Experimental de Rinossinusite Crônica em
Coelhos sem Utilização de Bactérias: Comparação de
Técnicas de Indução / Raphaella de Oliveira
Migliavacca. -- 2012.
102 f.

Orientador: Sady Selaimen da Costa.
Coorientador: Otávio Bejzman Piltcher.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Rinossinusite. 2. Rinossinusite crônica. 3.
Modelo experimental. 4. Coelhos. I. da Costa, Sady
Selaimen, orient. II. Piltcher, Otávio Bejzman,
coorient. III. Título.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

*Dedico à minha família, em especial aos meus pais, **Alceu e Maria Regina**, por terem sempre procurado o equilíbrio entre amor e responsabilidade, ternura e retidão, me dando condições para buscar enfrentar de frente as “durezas”, ou melhor, as oportunidades da vida e ao meu marido, **Rodrigo**, pelo incansável estímulo e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Otávio Bejzman Piltcher*, por confiar e estimular em ir em frente em uma linha de pesquisa nova e desafiadora, em que pude aprender muito com seu apoio e ideias essenciais.

Ao *Prof. Dr. Sady Selaimen da Costa*, por me acolher no seu grupo de pós-graduandos, me oportunizando desenvolvimento acadêmico e sendo um exemplo de profissional.

À *Prof. Dra. Lúcia Maria Kliemann*, pela paciência e grande dedicação nos mais diversos momentos de realização desse trabalho, sendo uma amiga e conselheira especialmente na etapa final.

À *Prof. Dra. Marcelle Reesink Cerski*, pelo apoio e disponibilidade na execução do trabalho.

Aos integrantes da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do HCPA, com destaque a veterinária *Fabíola Meyer* e a enfermeira *Marta Justina Giotti Cioato*, que sempre nos trataram com carinho e, em especial, deram as condições para trabalharmos com profissionalismo e ética em animais em ambiente de laboratório.

Aos acadêmicos de graduação de medicina, *Geraldo Machado Filho* e *Paula Oppermann* pelo trabalho indispensável na coleta de dados, sempre com um interesse contagiante.

À colega *Dra. Suzie Hyeona Kang* pelo interesse em ajudar em mais essa etapa e evoluir essa linha de pesquisa, com muita competência e dedicação.

À *Dra. Denise Manica* por ter enfrentado junto o desafio de iniciar um trabalho experimental com todas suas dificuldades. Se não tivéssemos a iniciativa, com a liderança do Prof. Otávio, para o primeiro experimento nessa linha, há quase quatro anos atrás, esse trabalho não seria possível.

Ao *Dr. Marcelo Antunes* pela disponibilidade em compartilhar suas experiências no exterior no estudo desse fascinante tópico, sendo seus comentários importantes no desenvolvimento do presente trabalho.

Ao *Prof. Dr. Mário Wagner* e *Vânia Naomi Hirakata* pelas consultorias nas análises estatísticas e importantes sugestões na interpretação e descrição dos resultados.

À patologista *Dra. Carolina Hartmann* por ajudar nas fotografias das lâminas com muita competência.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciência Cirúrgicas da UFRGS, em especial a *Sra. Estela Maris Araripe*, sempre pronta para ajudar com eficiência e calma.

Aos professores, médicos contratados, fellows, funcionários, residentes e ex-residentes do Serviço de Otorrinolaringologia do HCPA pela amizade e apoio durante a minha formação e mestrado.

A CAPES, pelo apoio financeiro ao desenvolvimento da pesquisa.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre por disponibilizar a base para minha formação acadêmica e profissional e investir em pesquisa, provendo de uma estrutura admirável em qualquer âmbito e incentivando financeiramente através do FIPE.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da Literatura

Figura 1. Possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da rinossinusite crônica	17
Figura 2. Anatomia da parede lateral do nariz em humanos	21
Figura 3. Anatomia do nariz e seios paranasais do coelho, evidenciando os seios maxilares, o septo nasal e as estruturas equivalentes aos cornetos de humanos	23
Quadro 1. Classificação das rinossinusites	13
Quadro 2. Resumos de estudos com indução de rinossinusite aguda experimental em coelhos por 2 semanas, sem inoculação de bactérias, com análise a longo prazo de diferentes desfechos	35

Artigo

Figura 1. Envelope selado contendo o procedimento a ser realizado, aberto após indução anestésica.....	48
Figura 2. Sequência do procedimento realizado em todos os casos.....	50
Figura 3. Visualização do aspecto da luz e da mucosa do seio maxilar e identificação do óstio.....	51
Figura 4. Porção de tecido subcutâneo retirado do próprio animal e biópsia de porção da mucosa.....	51
Figura 5. Acesso via teto de fossa nasal.....	52
Figura 6. Secreção purulenta franca no interior do seio maxilar direito no estudo macroscópico <i>post-mortem</i> de um animal submetido à técnica via transmaxilar.....	57
Figura 7. Representa três exemplos de peças com corte coronal de animais submetidos à técnica via teto de fossa nasal.....	58
Figura 8. Coelho submetido à técnica via transmaxilar, com análise histopatológica evidenciando infiltrado inflamatório, exsudato na luz e colônias bacterianas no seio maxilar direito.....	59
Figura 9. Seio maxilar direito de animal submetido à técnica de oclusão via teto de fossa nasal com evidência de exsudato na luz, infiltrado inflamatório e tecido de granulação.....	59
Figura 10. Infiltrado linfo-plasmocitário, erosão da mucosa do seio maxilar direito de animal submetido à técnica via teto de fossa nasal.....	60
Figura 11. Exemplo de mucosa normal em lado controle.....	60
Figura 12. Exemplo de mucosa atrófica no lado controle.....	61
Quadro 1. Dados Microbiológicos.....	64

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura

Tabela 1. Estudos destacados em modelo de rinosinusite aguda em coelhos.....	28
Tabela 2. Estudos experimentais em rinosinusite com coelhos com seguimento maior de 4 semanas.....	30

Artigo

Tabela 1. Comparação de dados macroscópicos e histopatológicos entre lados ocluídos e lados controle.....	61
Tabela 2. Comparação entre técnicas dos dados histopatológicos no seio maxilar direito (intervenção).....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

IFN- γ Interferon gama

IgE: Imunoglobulina E

IL-1: Interleucina 1

IL-13: Interleucina 13

IL-3: Interleucina 3

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IM: intramuscular

n: Número de sujeitos

RS: Rinossinusite

RSA: Rinossinusite aguda

RSC: Rinossinusite crônica

Th1: Type 1 helper T cells

Th2: Type 2 helper T cells

TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha ou Fator de necrose tumoral alfa

VTFN: Via teto de fossa nasal

VTM: Via transmaxilar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 CONCEITOS EM RINOSSINUSITE.....	12
2.2 PATOGÊNESE DA RINOSSINUSITE CRÔNICA.....	13
2.3 O IMPACTO DA RINOSSINUSITE CRÔNICA.....	17
2.4 ESTUDOS EXPERIMENTAIS EM RINOSSINUSITE.....	19
2.4.1 Anatomia e histologia comparada	20
2.4.2 Os modelos experimentais para estudo das rinosinusites	24
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA	38
4 OBJETIVOS	42
4.1 OBJETIVO GERAL.....	42
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
5 ARTIGO	43
5.1. RESUMO.....	43
5.2. INTRODUÇÃO.....	44
5.3. MÉTODOS.....	46
5.3.1 Preparo pré-operatório	47
5.3.2 Anestesia	48
5.3.3 Procedimento cirúrgico	49
5.3.4 Seguimento	53
5.3.5 Morte dos Animais	53
5.3.6 Estudo Microbiológico	53
5.3.7 Estudo Histopatológico	54
5.3.8 Análise das Variáveis	54
5.3.9 Considerações Estatísticas	55
5.3.10 Aspectos Éticos	56
5.4. RESULTADOS.....	56
5.5. DISCUSSÃO	64
5.6. CONCLUSÕES	69
5.7. AGRADECIMENTOS E FONTES DE FINANCIAMENTO.....	69
5.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
6. ARTIGO EM INGLÊS	71
6.1 ABSTRACT.....	71
6.2 INTRODUCTION.....	72
6.3 METHODS.....	74
6.3.1 Preoperative procedures	75
6.3.2 Anesthesia	75
6.3.3 Surgical procedure	76
6.3.4 Follow-up	78

6.3.5 Animal Killing	78
6.3.6 Histopathological study.....	78
6.3.7 Microbiological study	79
6.3.8 Analysis of histopathological variables	79
6.3.9 Statistical analysis	80
6.3.10 Ethical aspects	81
6.4 RESULTS.....	81
6.5 DISCUSSION	82
6.6 CONCLUSIONS	86
6.7 ACKNOWLEDGMENTS AND FINANCIAL SUPPORT	87
6.8 REFERENCES.....	87
6.9 TABLES AND FIGURES	88
ANEXOS.....	99

1 INTRODUÇÃO

A prevalência de doenças infecto-inflamatórias das vias respiratórias é extremamente alta na população geral. O impacto dessas doenças na qualidade de vida é evidente e relevante, especialmente nos casos ditos crônicos. Especificamente no que diz respeito à rinosinusite crônica (RSC), sua definição, segundo as Diretrizes Brasileiras de Rinosinusites, publicada em 2008, passa por uma classificação temporal de um processo inflamatório que acomete a mucosa que reveste a cavidade nasal e os seios paranasais por um período superior a doze semanas.

Se por um lado sabemos que a RSC possui elevada prevalência, por outro ainda temos muito a compreender sobre a patogênese e a categorização das rinosinusites, a fim de reduzir impropriedades em condutas clínicas e tornar o diagnóstico e tratamento mais acurados.

Dentro deste contexto, os modelos experimentais têm um papel importante. No estudo das rinosinusites, o modelo com coelhos é o mais utilizado. Entretanto, a maioria dos estudos que focam em modelos experimentais de rinosinusite associa técnicas de oclusão do óstio do seio maxilar com a inoculação de bactérias. Além disso, grande parte deles possui um tempo de seguimento curto, de dias, sendo mais apropriado extrapolar seus achados apenas para a doença rinosinusal aguda.

Dessa forma, surge a necessidade de estabelecerem-se modelos experimentais crônicos com métodos para indução de rinosinusite bem detalhados e replicáveis. Em relação ao desfecho final de inflamação crônica, há, na literatura, poucos estudos comparando os métodos para o desenvolvimento do modelo experimental mais adequado para o estudo da RSC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O primeiro estudo sobre rinosinusite utilizando animais de laboratório foi escrito na década de 20 do século passado, utilizando cães (1). Sequencialmente, foram sendo descritos uma série de estudos experimentais sobre o assunto, principalmente a partir da década de 80, com coelhos como modelo. A maioria desses trabalhos possui seguimento curto e associa técnicas de oclusão do óstio do seio maxilar com a inoculação de bactérias, sendo mais adequados para se estudar rinosinusite aguda (RSA). Raras são as descrições com qualidade metodológica de modelos em rinosinusite com seguimento superior a doze semanas e que não focam a patogênese em inoculação de bactérias para um estudo mais adequado da rinosinusite crônica (RSC).

2.1 CONCEITOS EM RINOSSINUSITE

Rinosinusite é definida como o processo inflamatório do nariz e seios paranasais caracterizado por dois ou mais sintomas, sendo um deles obstrução nasal ou secreção nasal (anterior ou posterior) combinado ou não à pressão ou dor facial ou redução/perda de olfato (2). Visualização de achados inflamatórios na mucosa nasossinusal via endoscopia nasal e/ou exames de imagem são recomendados para a confirmação do diagnóstico clínico. Cronicidade da rinosinusite é arbitrariamente definida pela persistência dos sintomas por mais de 12 semanas (3).

RSC não é considerada uma doença distinta, mas um termo genérico que agrupa um espectro de desordens com mecanismos imunopatológicos diferentes (4).

De forma simplificada, costuma-se subclassificar em RSC sem polipose nasal e RSC com polipose nasal (5).

No Quadro 1, a seguir, é possível visualizar uma das classificações das rinosinusites descrita na literatura.

Quadro 1. Classificação clínica das rinosinusites.

Rinossinusite Aguda/ Intermitente	Sintomas com até 12 semanas de duração
Rinossinusite Crônica/ Persistente - RSC sem polipose nasal - RSC com polipose nasal	Sintomas com mais de 12 semanas de duração
Rinossinusite Aguda Recorrente	4 ou mais episódios anuais de RSA

Fonte: Adaptado de Diretrizes Brasileiras de Rinosinusites, 2008.

Do ponto de vista histopatológico, enquanto a RSA caracteriza-se por um processo exsudativo associado com necrose, hemorragia e/ou ulceração, no qual há um predomínio de neutrófilos, a RSC é um processo proliferativo associado à fibrose da lâmina própria, no qual linfócitos, plasmócitos e eosinófilos são as células mais prevalentes (3). Um estudo experimental, publicado em 2002, definiu RSC histopatológica como a presença de hiperplasia da mucosa nasossinusal associada a infiltrado denso de células inflamatórias crônicas (6).

2.2 PATOGÊNESE DA RINOSSINUSITE CRÔNICA

As mudanças evolutivas que levaram o homem a uma postura ereta fizeram com que a ventilação e a drenagem sinusal ocorressem contra a

gravidade e dependessem da patência do complexo ostiomeatal. O complexo ostiomeatal representa a via final comum de drenagem e ventilação dos seios frontal, maxilar e etmoidal anterior. Assim, múltiplos fatores que comprometem essa patência atuam no desenvolvimento da rinosinusite.

Primariamente, sabe-se que a RSC está relacionada à dificuldade de ventilação dos seios paranasais e disfunção da drenagem por bloqueio do complexo ostiomeatal (7). Quando o complexo ostiomeatal se torna cronicamente obstruído, surgem alterações inflamatórias persistentes, progredindo para disfunção mucociliar e estase de secreções, assim como inabilidade de remoção sinusal de patógenos (bactérias e fungos) (6). De forma simplista, acredita-se que a RSC representa uma resposta imunológica e inflamatória do hospedeiro a partir de um insulto inicial que acometa a mucosa nasossinusal e o complexo ostiomeatal. Porém, os conhecimentos exatos a respeito dos gatilhos para o desenvolvimento da RSC, assim como os mecanismos de manutenção da doença levando a alterações crônicas persistentes nos seios paranasais são repletos de lacunas, o que, muitas vezes, levam a impropriedades em condutas clínicas em um problema bastante prevalente na população.

Uma vez que a RSC vem sendo cada vez mais entendida como uma afecção imunológica e inflamatória e menos como uma doença infecciosa propriamente dita, pesquisas a respeito do assunto vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos. Entretanto, a imunopatogênese global da RSC ainda é pobremente compreendida. Em relação à RSC sem polipose nasal, pode-se dizer que incorpora um grupo heterogêneo de desordens que se parecem distintas, mas podem seguidamente se sobrepor em relação à etiologia e a fatores de exacerbação. Estes incluem inflamação alérgica mediada por IgE, alterações nas defesas humorais e de

mucosas do hospedeiro e anormalidades estruturais nasossinusais (5). Dominância na resposta Th1, assim como um perfil de citocinas Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-3, IL-6 e IL-8) foram descritos em alguns trabalhos (8), (9). As causas da resposta imune exacerbada e desregulada e o que a sustenta são desconhecidos nos dias atuais, mas é provável que a resposta imunológica tenha papel na gravidade da doença a partir de relações intercelulares desequilibradas.

A alteração na estrutura tecidual (remodelamento) é também observada na RSC, com espessamento da membrana basal, aumento do número de células calciformes, hiperplasia e hipertrofia glandular no subepitélio, assim como depósito excessivo de matriz extracelular (10). O exato desencadeante que leva ao remodelamento é desconhecido. Acredita-se que defeitos intrínsecos nos mecanismos de reparação tecidual devem estar implicados nessa patogênese. A gravidade da doença acaba correlacionando-se com o fenômeno do remodelamento através do excesso de produção de muco, edema tecidual com obstrução dos óstios de drenagem e prejuízo na função mucociliar.

A RSC com polipose nasal tem, por outro lado, um mecanismo imunológico um pouco melhor estabelecido, com domínio da resposta Th2 e expressão exacerbada de IL-5, IL-4 e IL-13 (8). Eosinofilia da mucosa também possui um papel na polipose nasal. É interessante saber que eosinófilos em excesso podem levar a danos teciduais, porém, por outro lado, são reconhecidamente importantes na reparação tecidual. Desta forma, também existem muitas dúvidas a respeito do processo que leva a RSC com polipose, dificultando seu manejo.

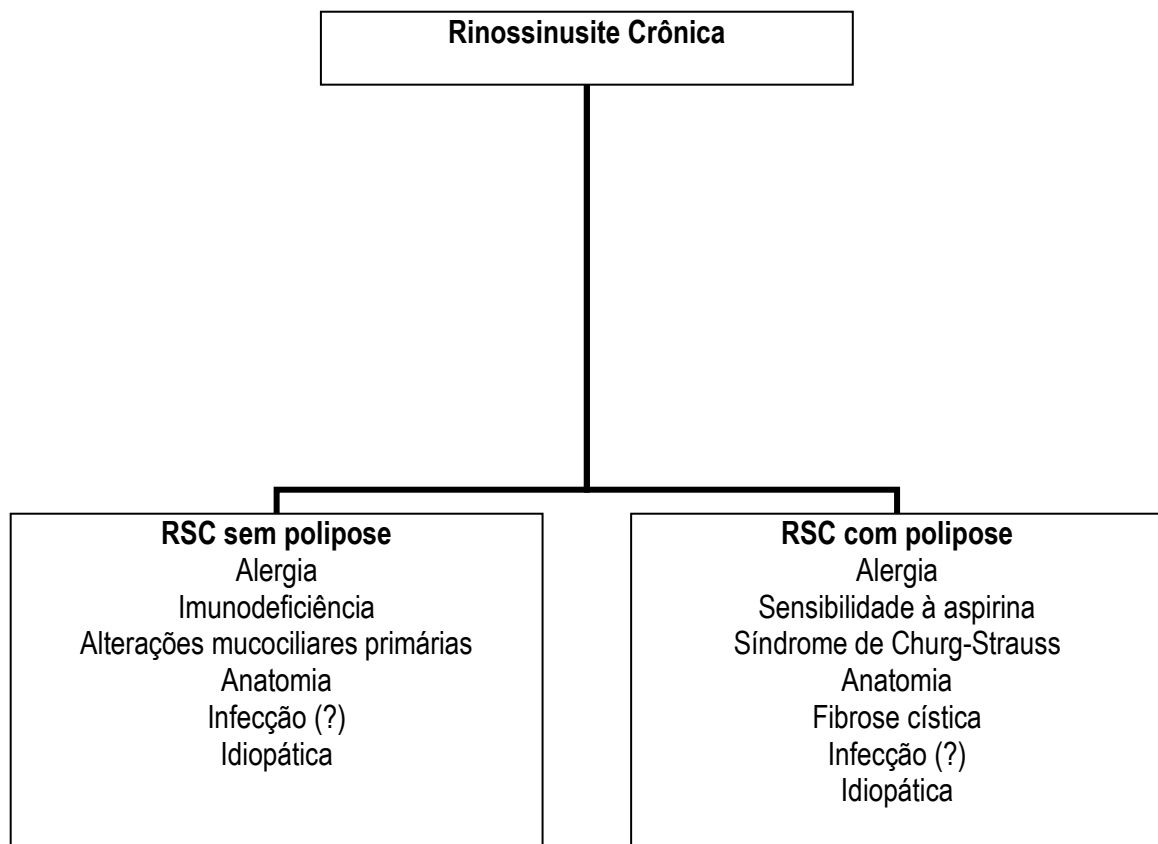
Enquanto na RSA a infecção é a chave de sua fisiopatologia, na RSC debate-se muito sobre o real papel de bactérias na sua patogênese e manutenção. Reconhece-se que inflamação induzida por infecção, resposta imune de

superantígenos bacterianos e osteíte contribuem em formas específicas de RSC ou funcionam como fatores de exacerbação na RSC como desordem multifatorial. Todavia, frequentemente há ausência de culturas positivas para bactérias em cavidades sinusais em estudos de RSC e resposta variável e não sustentada na terapia antimicrobiana de pacientes com esse diagnóstico.

Dentro desse panorama de controvérsias, passou-se a considerar que os biofilmes bacterianos poderiam estar implicados nos mecanismos da RSC. O biofilme consiste em uma comunidade bacteriana organizada, caracterizada pela aderência à superfície mucosa (ou de corpo estranho). No contexto dos biofilmes, os glicocálices (substâncias poliméricas incorporadas nas bactérias) atuam como uma mistura de colônias bacterianas e modulam o microambiente bacteriano, permitindo sinalizações interbacterianas (*quorum sensing*) e desenvolvendo fatores de virulência dos germes. Eles participam na proteção da estrutura da barreira bacteriana e no sistema de defesa do hospedeiro através de fagocitose e do sistema complemento (5). Existem trabalhos experimentais em animais (11) e humanos (12) que demonstram biofilmes em rinosinusite, apesar de apresentem uma metodologia passível de críticas (com o curto seguimento de no máximo 20 dias no trabalho em coelhos). Antibióticos podem penetrar nos biofilmes, mas de fato há uma resistência antimicrobiana aumentada, seja por genes mais resistentes nessas comunidades bacterianas, seja por crescimento bacteriano diminuído (levando a um metabolismo lento), seja por fatores ainda não identificados. Assim, a infecção persistente permitiria interação continuada e estímulo ao sistema imune da mucosa (por exemplo, através de ativação de superantígenos de *S. aureus*, levando à ativação de células T policlonais e produção local de hiper-IgE). A interação dos biofilmes em termos biofísicos e bioquímicos com a mucosa sinusal pode, teoricamente, pelo

menos contribuir na patogênese e na persistência de casos crônicos, com um campo a ser explorado nos próximos anos (13), (14), (5).

Figura 1. Possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da rinosinusite crônica.



Fonte: Adaptado de Kariyawasam *et. al*, 2011.

2.3 O IMPACTO DA RINOSSINUSITE CRÔNICA

Segundo estatísticas norte-americanas, a RSC afeta aproximadamente 30 milhões de indivíduos nos Estados Unidos e gera um custo de 6 bilhões de dólares

anualmente (6). A rinosinusite gera milhões de atestados médicos e prescrições de antibióticos (15), o que justifica seu alto custo, além de um número crescente de consultas e cirurgias relacionadas à desordem (16). Recentemente, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) publicou dados epidemiológicos dos Estados Unidos estimando uma frequência de 29,305 milhões de pessoas agrupadas pelo termo sinusite, o que afetaria mais de 12% dos indivíduos maiores de 18 anos (17). Anteriormente, Collins publicou uma pesquisa colocando a RSC como a segunda condição crônica mais prevalente nos Estados Unidos entre 1990 e 1992, com números chegando a 15,5% da população. O autor definiu RSC como queixa por mais de três meses de “problemas sinusais” (*sinus trouble*) em um período de um ano antes da entrevista (18). No Canadá, a prevalência da RSC foi estimada em 5% dos canadenses adultos, com destaque em mulheres, tabagistas, indivíduos de baixa renda e com doenças respiratórias crônicas. Além disso, rinosinusite foi considerada fator de exacerbação de asma e outras doenças crônicas (19). Em um estudo de rastreamento populacional realizado na Bélgica, a prevalência de corrimento nasal crônico foi reportada em 6% dos indivíduos (20). Um trabalho comparativo entre as populações do norte da Escócia e do sul do Caribe mostrou uma ocorrência similar entre as duas amostras – 9,6% e 9,3%, respectivamente (21).

Entretanto, na interpretação de dados epidemiológicos referentes à RSC, deve-se ter em mente em potenciais vieses de seleção nos diferentes estudos devido à heterogeneidade dessa desordem e a imprecisões no diagnóstico frequentemente utilizadas na literatura, muitas vezes embasando-se apenas em sintomas, o que superestima sua frequência.

No Brasil, apesar de ser reconhecida como uma das afecções mais comuns das vias aéreas superiores, há uma grande carência em estudos epidemiológicos

minimamente bem delineados relacionados às rinosinusites (3).

2.4 ESTUDOS EXPERIMENTAIS EM RINOSSINUSITE

No panorama atual desta desordem prevalente e cheia de controvérsias, denominada rinosinusite, os modelos experimentais têm um papel importante na busca de conhecimento sobre o assunto.

A determinação de um modelo animal apropriado é fundamental para o sucesso do experimento. Vários modelos animais já provaram ser úteis em revelar informações para estudos craniofaciais, otológicos e nasossinusais. Os primatas não humanos (macacos) são os animais filogeneticamente mais próximos dos humanos. Teoricamente isto significa uma melhor extrapolação de seus resultados. Todavia, nem todos os experimentos necessitam obrigatoriamente desses animais, uma vez que são de manejo e porte mais trabalhosos que outros. Na realidade, o tipo de modelo animal poderá variar de acordo com a hipótese a ser testada e com a importância de seus resultados serem extrapolados (validade externa) para os seres humanos.

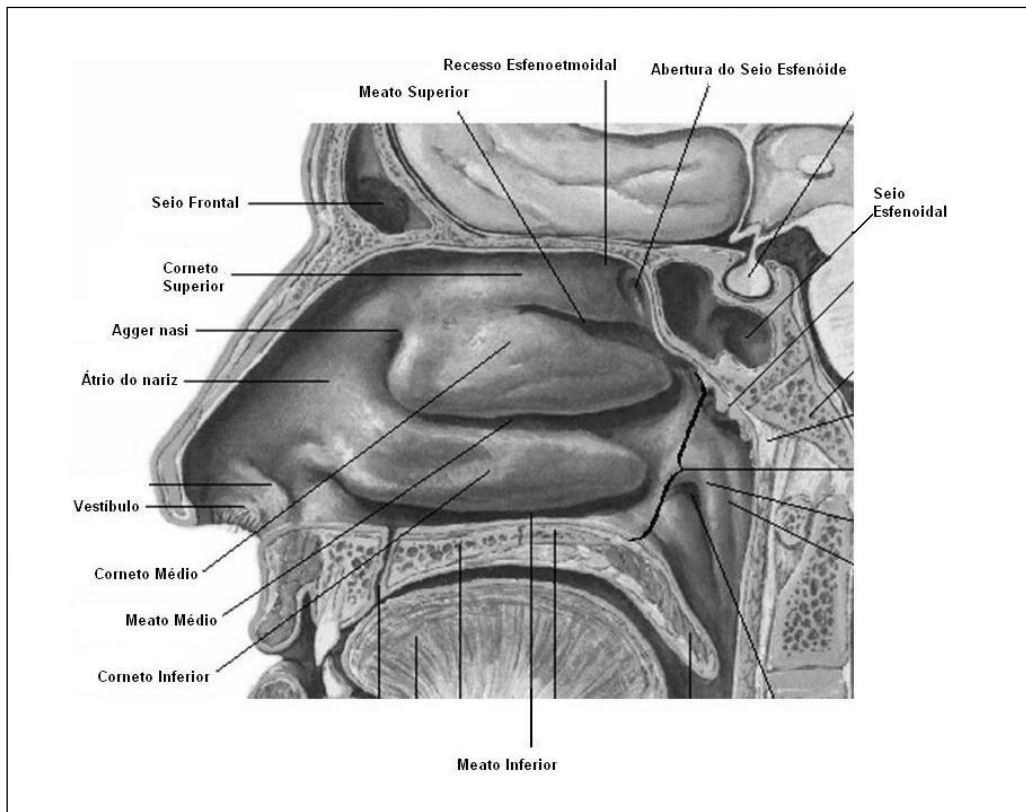
Do ponto de vista da resposta inflamatória, diante de insultos virais, bacterianos e traumáticos, os mamíferos apresentam respostas semelhantes. Para este tipo de avaliação, utiliza-se o termo “modelos animais genéricos” (22). Em relação ao estudo das rinosinusites, o diferencial será a maior proximidade possível com a anatomia e a fisiologia humana, além da disponibilidade de marcadores para estudo de diferentes proteínas.

Entre os modelos genéricos descritos e disponíveis, o coelho é o animal mais utilizado no estudo das rinosinusites.

2.4.1 Anatomia e histologia comparada

Em humanos, os seios paranasais são espaços preenchidos por ar dentro dos ossos cranianos. Existem quatro seios em cada lado: seio maxilar, células etmoidais, seio frontal e seio esfenoidal. O septo divide a cavidade nasal em direita e esquerda. Fazem parte da parede lateral das cavidades nasais os cornetos superior, médio e inferior e, logo abaixo e lateral a cada corneto, está seu meato correspondente (Figura 2). Resumidamente, pode-se dizer que o seio esfenoidal se abre no sentido póstero-superior do corneto superior e as células etmoidais posteriores desembocam no meato superior. Já o meato médio é, sem dúvida, o espaço mais importante e complexo, sendo seu funcionamento a peça fundamental na fisiologia nasossinusal, uma vez que o seio frontal, maxilar e as células etmoidais anteriores e médias desembocam nessa abertura. O ducto nasolacrimal desce medialmente ao seio maxilar, drenando no meato inferior (23), conforme se visualiza na Figura 2, a seguir.

Figura 2. Anatomia da parede lateral do nariz em humanos.

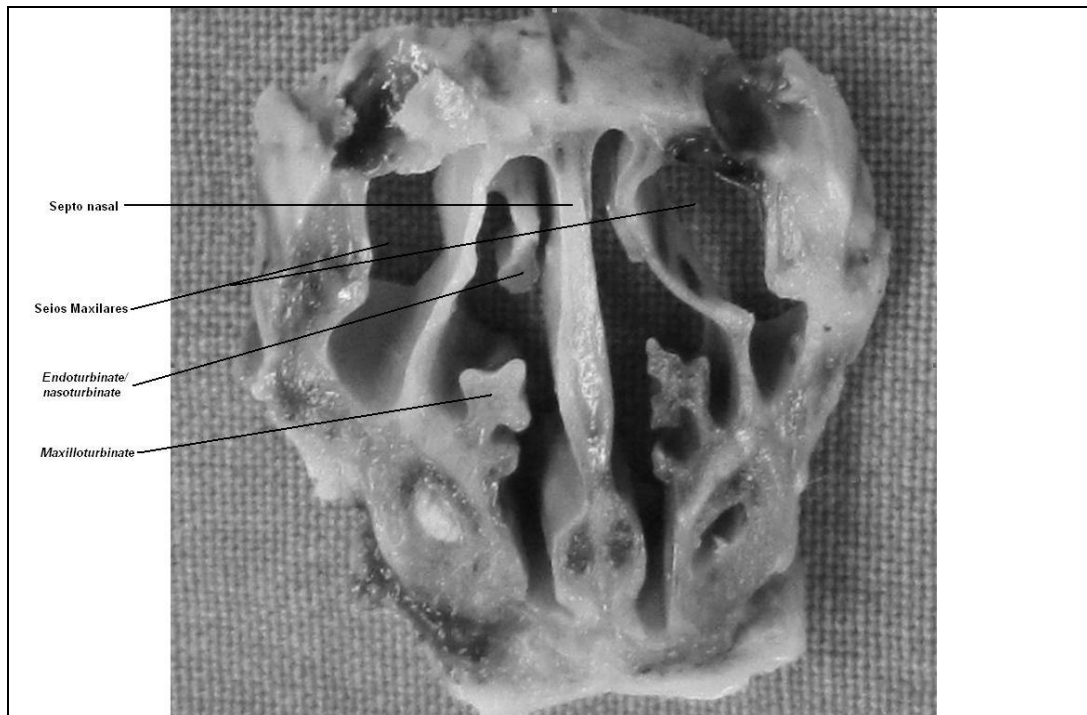


Fonte: Adaptado de *Interactive Atlas of Human Anatomy*, Frank H. Netter, 1998.

O nariz e os seios paranasais de coelhos mostram algumas semelhanças anatômicas com os humanos, de acordo com estudos macro e microscópicos já realizados no século passado (24). Conforme se visualiza na Figura 3, o nariz dos coelhos é também separado sagitalmente pelo septo nasal, com as estruturas da parede lateral comparáveis a de humanos: a estrutura mais anterior é descrita como *maxilloturbinate* (equivalente ao corneto inferior; este, porém, é considerado uma estrutura menos complexa que a de espécies macrosmáticas, como os coelhos, por ser lamelar não ramificado), uma superfície ampla e com reentrâncias que umedece e aquece o ar inalado, e a posterior como *endoturbinate* ou *nasoturbinate* (equivalente ao corneto médio) (23). Espécies macrosmáticas correspondem as que os bulbos olfativos desempenham funções importantes. Nesse grupo de animais, há

uma proeminência no septo ventral (*swell bodies*) ricamente vascularizada abaixo do epitélio que, quando colapsada, permite a passagem do ar livremente em direção à nasofaringe e, quando distendida, faz com que o ar tenha que passar acima do *maxilloturbinate* (25). No modelo animal, alguns autores agrupam as cavidades sinusais conjuntamente como seio maxilar (23), enquanto outros dividem as cavidades paranasais dos coelhos em seio conchal dorsal, seio maxilar e seio esfenoidal (26). De qualquer forma, o seio maxilar ainda parece ser o mais apropriado para trabalhos experimentais, segundo os últimos autores. O óstio do seio maxilar desemboca lateralmente ao *endoturbinate*, sendo essa área considerada comparável ao complexo ostiomeatal de humanos. A ausência dos seios frontal e etmoidal é a principal diferença anatômica sinusal entre coelhos e humanos. Estudos anatômicos em coelhos também relatam um espaço aéreo no *nasoturbinate*, denominado *marsupium* (25). A drenagem do ducto nasolacrimal também está relacionada aos seios paranasais, com alta correlação entre sinusite e epífora nesses animais.

Figura 3: Anatomia do nariz e seios paranasais do coelho, evidenciando os seios maxilares, o septo nasal e as estruturas equivalentes aos cornetos de humanos.



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Especificamente, o seio maxilar dos coelhos é semelhante ao de humanos em relação a vários aspectos: um óstio bem definido, uma cavidade ampla e de fácil acesso, além de um sistema mucociliar com as mesmas características (27), (28). Outro fator que favorece o uso desses animais para pesquisas sobre rinosinusites é que o seio maxilar tem um tamanho que permite a coleta de uma quantidade apropriada de mucosa e secreções.

Em relação à histologia, a mucosa respiratória de humanos é fina, coberta por uma camada única de um epitélio colunar pseudoestratificado sobre uma membrana basal delicada. O epitélio consiste de células ciliadas, células basais e um número variável de células calciformes. A mucosa dos seios paranasais e do nariz não é homogênea. Nos seios maxilares, a mucosa é mais fina e possui menor

número de células caliciformes. Abaixo da membrana basal, pode ser identificada a submucosa, constituída de tecido conectivo frouxo e glândulas seromucinosas, localizadas principalmente em volta do óstio (29). A válvula nasal possui epitélio escamoso até a transição com os cornetos quando o epitélio é secretor ciliado, interposto com células caliciformes e vascularização mais rica que a dos seios paranasais (25).

O coelho possui as cavidades sinusais revestidas por um epitélio pseudoestratificado, ciliado, com células caliciformes, células basais e algumas células intermediárias até o nível da membrana basal. Logo abaixo, têm a lâmina própria repleta de glândulas serosas e vasos (29).

2.4.2 Os modelos experimentais para estudo das rinosinusites

Modelos animais existem desde o início do século e fornecem grande parte do conhecimento disponível sobre rinosinusite. O modelo com coelhos é, sem dúvida, o mais utilizado para pesquisas relacionadas aos processos rinosinusais.

Em 1941, Hilding introduziu o modelo de rinosinusite utilizando coelhos pela primeira vez (30). Após esse trabalho, foi pouco o interesse em modelos animais em rinosinusite, até que Maeyama, em 1981, desenvolveu rinosinusite em coelhos previamente sensibilizados com albumina do ovo branco. Nesse estudo, era injetado repetidamente *Staphylococcus aureus* através de acesso percutâneo em seios paranasais. Os animais foram sacrificados após 14 dias das injeções diárias para estudo histopatológico. Um dos problemas desse modelo foi a ocorrência de hematomas subcutâneos e submucosos nas cavidades rinosinusais. Mesmo assim,

os autores acreditaram que houve alta incidência de inflamação “crônica” na mucosa dos seios paranasais, mesmo com seguimento de apenas 2 semanas (31).

A partir de então, vários trabalhos utilizaram coelhos na indução de rinossinusite, com destaque aos realizados no Karolinska Institute, na Suécia. Em 1985, Kumlien e Schiratzki provocaram rinossinusite em virtualmente 100% dos animais submetidos ao fechamento do óstio do seio maxilar por acesso externo, com inoculação de bactéria patogênica no dia seguinte ao fechamento do óstio. O objetivo era descrever o fluxo sanguíneo na mucosa sinusal em três grupos: o de inoculação de *Streptococcus pneumoniae* e depósito de algodão na cavidade sinusal, o de depósito de algodão na cavidade sinusal e bloqueio do óstio com metacrilato e, finalmente, o de injeções de ovalbumina e bactérias com cateter. Foi o primeiro artigo publicado em modelo experimental de rinossinusite com seguimento longo (5 semanas a 9 meses) (27).

Também proveniente do laboratório citado, em 1988, Johansson *et. al* publicaram um trabalho que desenvolveu um modelo agudo de rinossinusite com o total de 69 coelhos, sendo sua metodologia bem detalhada. Os animais eram divididos em quatro grupos (oclusão do óstio com N-butil cianocrilato com inoculação de bactérias, oclusão do óstio sem inoculação de bactérias, inoculação de bactérias sem oclusão e introdução de N-butil cianocrilato na cavidade sinusal a fim de verificar se a presença do material provocaria uma sinusite química). No grupo do experimento que realizou o procedimento combinado, houve indução de rinossinusite aguda. Já a colocação isolada de N-butil cianocrilato na mucosa sinusal não provocou resultados histopatológicos compatíveis com sinusite química. Segundo os autores, a oclusão do óstio sem inoculação de bactérias também não foi suficiente para indução de rinossinusite em coelhos (32). Outros estudos foram

publicados sequencialmente, testando inoculação de diferentes bactérias nos seios paranasais de coelhos e diversos tempos de seguimento da indução da rinosinusite até o sacrifício dos animais (33), (34), (35).

Kennedy and Shaalan reavaliaram alguns tipos de cirurgia maxilar através da realização de diferentes tipos de procedimentos em coelhos. Além do acesso ao seio maxilar pela abertura de sua face anterior com uso de broca, também descreveram uma técnica osteoplástica. Nesse acesso, faziam uma abertura que iniciava em um lado do nariz e se estendia até o lado contralateral, com remoção desta parede óssea em único bloco. Tiveram elevados percentuais de infecção nos coelhos, que foi correlacionada com a presença de *Pasteurella* nos animais (28).

Benninger *et. al*, em 1993, compararam osteotomia natural em relação à antrostomia inferior no manejo das rinosinusites. Também acessaram o seio por meio de uma abertura feita com broca na parede anterior (36).

Mikula *et. al* (1996), por sua vez, fez uma janela em cada seio maxilar para estudar a dinâmica gasosa dos mesmos, violando a mucosa minimamente (37).

Esses trabalhos citados foram importantes para o estudo das técnicas com acesso via parede anterior do seio maxilar em modelos experimentais em coelhos.

Em 1992, Hinni *et. al* descreveram o primeiro experimento para indução de rinosinusite com acesso através das fossas nasais. Seu modelo objetivava estudar o movimento ciliar na rinosinusite aguda com um interessante acesso pela parede superior da fossa nasal para obstrução do óstio sinusal com cianocrilato, sem violação da cavidade do seio maxilar, seguido de inoculação direta com agulha (calibre 25) de bactérias ou solução salina através do mucoperiósteo do seio (38).

Em 1996, Marks criticou os modelos desenvolvidos até então por basearem-se em um modelo sinugênico, quando, segundo o autor, o processo é rinogênico.

Dessa forma, desenvolveu rinosinusite aguda através da inoculação de um corpo estranho (Merocel, Medtronic-Xomed, Jacksonville, FL) na cavidade nasal juntamente com um agente patogênico. Este autor considerou o modelo proposto viável para o estudo das rinosinusites, apesar de alguns achados inconsistentes em seus resultados, como um índice de perda de mais de 45% dos animais estudados (39). Kara *et. al*, em 2002, também descreveram resultados favoráveis ao desenvolvimento de rinosinusite com obstrução do óstio com esponja embebida em solução com *Staphylococcus*, inclusive até o 30º dia de observação. No grupo em que o óstio foi obstruído com esponja estéril, não houve desenvolvimento de rinosinusite até a vigésima semana de observação (40).

Gannon *et. al* (1997) descreveram, tal qual o trabalho de Hinni, um acesso através do teto da fossa nasal. Antes de realizar este procedimento, outra abertura da face anterior do seio maxilar deveria ser feita sem abrir-se a mucosa, para que o fechamento completo do óstio do seio fosse comprovado pela ausência de movimento da mesma. Uma abertura de 4 a 8 mm do teto nasal era feita com broca e, através dessa, o equivalente ao corneto médio era levemente deslocado em direção ao septo, o suficiente para o meato médio poder ser bloqueado. As bactérias eram inoculadas com uma seringa através da abertura feita até a mucosa no seio maxilar (41).

Costa *et. al*, em 2007, realizaram quatro diferentes intervenções: preenchimento da cavidade nasal com esponja, obliteração do óstio através da instilação de cianocrilato em infundíbulo, instilação percutânea de sangue venoso em seio maxilar e instilação percutânea de toxoide estafilocócico e estreptocócico em seio maxilar. Os autores mostraram desenvolvimento de RSA em todos os casos, exceto na instilação de sangue periférico (42). Nas tabelas 1 e 2, a seguir, é

possível visualizar alguns dos estudos realizados em modelos experimentais com coelhos.

Tabela 1. Estudos destacados em modelo de rinosinusite aguda em coelhos.

Autor Ano	Tempo de seguimento	Procedimento	Resultados e/ou Conclusões dos autores
Hilding 1941	-----	Acesso externo (escarificação através/adjacente ao óstio natural vs. longe do óstio)	Sinusite supurativa 5/6 (escarificação através ou adjacente ao óstio). Sinusite supurativa 1/6 (escarificação longe do óstio).
Maeyama 1981	14 dias	Injeção percutânea de albumina do ovo branco no seio maxilar + <i>Staphiloccocus aureus</i>	Alta incidência de inflamação “crônica” no estudo histopatológico da mucosa dos seios paranasais.
Johansson <i>et al</i> 1988	5 dias	I) Oclusão do óstio com N-butil cianocrilato+ inoculação de bactérias (n=32) II) Oclusão do óstio sem inoculação de bactérias (n=25) III) Inoculação de bactérias sem oclusão (n=12) IV) Introdução de N- butil cianocrilato na cavidade sinusal, testar se sinusite química (n=3)	Indução de achados histopatológicos compatíveis com RSA no grupo I. Obstrução isolada não foi suficiente para indução de RSA no grupo II. Ausência de RSA apenas com inoculação de bactéria (grupo III). Ausência de achados histopatológicos compatíveis com sinusite química no grupo IV.
Hinni <i>et al</i> 1992	5 dias	Acesso pela parede superior da fossa nasal para obstrução do óstio sinusal com cianocrilato +inoculação direta com agulha de: <i>S. pneumoniae</i> (n=5),	Indução de RSA quando inoculação associada de bactérias. Obstrução isolada não alterou função mucociliar em estágios precoces da RSA.

		<i>H. influenzae</i> (n=5), <i>Pseudomonas</i> (n=5) ou solução salina (n=5) através do mucoperiósteo do seio	
Costa <i>et al</i> 2007	15 dias	I) Preenchimento da cavidade nasal com esponja (n=5) II) Instilação de cianocrilato em infundíbulo (n=5) III) Instilação percutânea de sangue venoso em seio maxilar (n=5) IV) Instilação percutânea de toxóide estafilocócico e estreptocócico em seio maxilar (n=5)	Desenvolvimento de RSA em todos os casos, exceto na instilação de sangue periférico

n: número de animais no estudo; RSA: rinosinusite aguda.

Fontes: Adaptado de Hilding (1941), Maeyama (1981), Johansson *et. al* (1988), Hinni *et al* (1992) e Costa *et. al* (2007).

Tabela 2. Estudos experimentais em rinossinusite com coelhos com seguimento maior a 4 semanas.

Autor Ano	Tempo de seguimento	Procedimento	Resultados e/ou Conclusões dos autores
Kumlien e Schiratzki 1985	5 a 40 semanas	I) Injeção de <i>S. pneumoniae</i> via cateter (n=3) II) Algodão com <i>S. pneumoniae</i> no seio maxilar (n=5) III) Bloqueio do óstio com metacrilato (n=9) <i>Objetivo era medir fluxo sanguíneo da mucosa sinusal.</i>	Sem sucesso na técnica I (abscesso subcutâneo). Indução de RSC no exame histopatológico nas técnicas II e III. Sem diferenças em relação a fluxo sanguíneo da mucosa com sinusite ao comparar com fluxo sanguíneo de trabalhos prévios em coelhos normais.
Fukami <i>et al</i> 1993	5 dias a 12 semanas	Oclusão do óstio do maxilar com Histoacryl e inoculação de <i>S. pneumoniae</i> (n=22), <i>B. fragilis</i> (n=13) e <i>S. aureus</i> (n=19).	Alterações histopatológicas foram mais pronunciadas quando exposição a <i>S. aureus</i> e <i>B. fragilis</i> .
Marks 1997	1 a 10 semanas	Colocação de corpo estranho (MeroCel) com <i>S. pneumoniae</i> na cavidade nasal direita e análise histológica em diferentes grupos de acordo com o tempo de seguimento (n total=48 com perda de 22; n final= 26)	Modelo viável, com produção de sinusite supurativa no lado com corpo estranho, porém, com achados histopatológicos bem variáveis entre os animais, além de morte ou sacrifício prematuro (sinais de doença sistêmica) de mais de 22 animais, com perda de 45%.

n: número de animais no estudo; RSC: rinossinusite crônica.

Fontes: Adaptado de Kumlien e Schiratzki (1985), Fukami *et. al* (1993) e Marks (1997).

Segundo a literatura, um dos principais criticismos aos modelos sinogênicos é o fato de a mucosa do seio maxilar ser traumatizada antes mesmo das bactérias serem inoculadas, com interrupção do fluxo sanguíneo e início de um processo inflamatório independente da presença de bactérias. Além disso, a presença de um corpo estranho dentro do seio, bloqueando o óstio do mesmo, poderia resultar em dois outros problemas: uma resposta inflamatória desencadeada pela presença do material e, segundo, a oclusão completa do seio ocasionaria o desenvolvimento de mucocelos ou mucopioceles.

Alguns autores propuseram modelos murinos para o estudo da rinossinusite, seja pela disponibilidade de ratos geneticamente alterados, seja por uma gama de marcadores de mediadores inflamatórios já estudados em ratos (43), (44), (45). As limitações desse modelo são as ainda maiores diferenças anatômicas e imunológicas entre estes animais e os humanos, além de uma cavidade sinusal muito pequena (46).

Lindsay *et. al* desenvolveram um modelo murino de rinossinusite crônica eosinofílica através de sensibilização com *Aspergillus fumigatus*, porém, os próprios autores declararam que o modelo com coelhos se prestava melhor para a exploração do papel da obstrução do complexo ostiomeatal (47).

Coelhos possuem uma significativa incidência de infecção natural dos seios paranasais. Dessa forma, os animais selecionados, para servirem de modelo experimental, devem ser investigados sobre a presença desse problema antes de qualquer intervenção, para evitarem-se erros na interpretação dos resultados. A pasteurelose é uma doença endêmica dos coelhos e a *Pasteurella multocida*, um cocobacilo gram-negativo, é o patógeno mais comum de coelhos de laboratório, estimando-se uma prevalência de 50% a 70%. Enquanto a colonização nasal latente

provavelmente não tem efeito em estudos experimentais, a pasteurelose clínica pode invalidar muitos estudos, principalmente envolvendo o trato respiratório. A apresentação clínica inclui doenças do trato respiratório superior, pneumonia, bacteremia, abscessos de tecido subcutâneo e órgãos internos, podendo, contudo, ser subclínica. Um estudo de sensibilidade envolvendo surto ocorrido em um biotério no Rio Grande do Sul mostrou que oxitetraciclina e enrofloxacinina exibem um bom espectro contra esse patógeno (48).

Acredita-se que a RSA é uma desordem infecciosa por natureza, enquanto a RSC é multifatorial. Dessa forma, enquanto a maioria dos estudos prévios utilizam bactérias para induzir rinosinusite, inclusive em modelos que se propõem a serem crônicos, alguns autores acreditam que a inoculação de patógenos humanos pode ser dispensável para indução de uma rinosinusite experimental (49). Liang *et. al* (2008) basearam essa afirmação em um estudo em coelhos no qual se comparou a colocação de Merocel (Medtronic-Xomed, Jacksonville, FL) em uma cavidade nasal em um grupo de animais com a injeção de *12-myristate 13-acetate* (PMA) bilateralmente na cavidade nasal e a colocação de Merocel em um dos lados da cavidade nasal no outro grupo, com retirada do corpo estranho em duas semanas, em ambos grupos. O objetivo do trabalho era induzir achados clínicos, tomográficos, endoscópicos e microbiológicos compatíveis com RSC em 12 semanas de acompanhamento e, se presente, comparar por meio de dados clínicos, tomográficos, endoscópicos e microbiológicos, na 16ª semana, animais tratados com antibiótico (ceftriaxona 50 mg/kg/d) com animais não tratados. Não havia inoculação proposital de bactérias nos coelhos. Os exames culturais basais dessa amostra revelaram colonização de patógenos comuns em animais assintomáticos e, por outro lado, maior crescimento de bactérias patogênicas nos animais com achados

compatíveis com rinosinusite, corroborando a afirmação citada. Além disso, os autores afirmaram que o modelo proposto foi capaz de induzir RSC rinogênica (49).

Outros estudos em modelos animais mostraram que a gravidade da inflamação e o do dano à mucosa pode variar com o tipo e virulência do microrganismo presente. Por exemplo, *Bacteroides fragilis* desencadeou uma resposta inflamatória mais acentuada em relação ao *Streptococcus pneumoniae* no estudo de Westrin, em 1992 (33), e alterações histopatológicas foram mais pronunciadas na exposição a *S. aureus* e a *B. fragilis* em comparação ao *Streptococcus pneumoniae* no estudo de Fukami, em 1993 (34). Bolger *et. al*, visando ao estudo das rinosinusites recalcitrantes, publicaram suas análises bacteriológicas e histopatológicas na mucosa sinusal de coelhos submetidos a indução de RS através do fechamento do óstio do maxilar com 2-cianocrilato e, após 24 horas, inoculação de *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores observaram dano transmucoso importante e concluíram que ele parecia ainda mais intenso que o de investigações prévias em sinusite experimental utilizando outras bactérias. Um dos achados interessantes desse estudo foi a alta frequência de formação polipoide nas lâminas, o que fez os autores levantarem uma possível correlação clínica entre *Pseudomonas* e polipose nasal, uma vez que pacientes com fibrose cística frequentemente possuem polipose nasossinusal e *Pseudomonas* é comumente isolada em seus seios paranasais, alertando para a necessidade de mais estudos (35).

Em 2005, os biofilmes começaram a ser estudados também em experimentos em coelhos, especialmente por pesquisadores norte-americanos da *University of Pennsylvania* (11), (50), (51). O primeiro estudo experimental foi publicado em 2005, com instilação de *Pseudomonas aeruginosa* no seio maxilar

obstruído (11). Os autores citaram no seu objetivo que, utilizando seu modelo de RSC, eles poderiam estabelecer o papel de biofilmes bacterianos nesse processo. Todavia, o acompanhamento dos animais entre o procedimento cirúrgico e o sacrifício foi de 1 a 20 dias, tempo bem inferior ao estabelecido na literatura para a definição de um quadro rinossinusal crônico.

Na fisiopatologia da rinossinusite, a disfunção ciliar tem um papel inegável e estabelecido, com necessidade de ainda muitos estudos nesse campo. Assim, alguns pesquisadores têm testado atividade mucociliar em diferentes estudos clínicos (52), (53) e experimentais, incluindo modelos com coelhos, na tentativa de obtenção de conhecimentos sobre esse fenômeno (28), (54), (55), (56). Min *et. al*, por exemplo, estudaram a atividade mucociliar sinusal após remoção da mucosa do seio maxilar unilateral de coelhos para comparação com um lado controle e sugeriram uma redução do *clearance* mucociliar no lado submetido à intervenção (57). Já Kim *et. al* analisaram a recuperação da mucosa sinusal em 2 grupos (com e sem remoção de parte da mucosa) após indução de RSA com esponja no óstio do seio maxilar direito por 2 semanas, medindo frequência de batimento ciliar, desordem da onda ciliar (grau de variação no batimento ciliar de um cílio individualmente) e realizando estudos histopatológicos com microscopia eletrônica após 12 semanas da indução da doença. Não houve diferença entre os lados submetidos à oclusão do óstio (com e sem remoção de parte da mucosa) e o lado controle, em relação à frequência de batimento ciliar. Porém, foi evidenciada presença de alteração funcional (desordem da onda ciliar) nos lados intervindos em ambos os grupos, quando comparados com o lado controle, além de perda de cílios e irregularidades na disposição ciliar à microscopia eletrônica no lado submetido à rinossinusite, somada à remoção parcial da mucosa maxilar. Os autores concluíram

que, embora 12 semanas tenha sido suficiente para a recuperação da morfologia do epitélio ciliar após indução de sinusite maxilar experimental, esse tempo não foi longo o bastante para reparação funcional completa da mucosa, conforme Quadro 2, abaixo (58).

Quadro 2. Resumos de estudos com indução de rinosinusite aguda experimental em coelhos por 2 semanas, sem inoculação de bactérias, com análise a longo prazo de diferentes desfechos.

Liang et. al, 2008

Objetivos: desenvolver um modelo rinogênico de RSC e observar achados clínicos, tomográficos, endoscópicos e microbiológicos na fase de recuperação da doença e após tratamento com antibióticos.

Metodologia: Indução de RS através de 2 métodos: (I) Colocação de Merocel em uma cavidade nasal (n=12) com retirada do mesmo em 2 semanas ou (II) Injeção de 12-myristate 13-acetate (PMA) bilateralmente na cavidade nasal e colocação de Merocel em um dos lados da cavidade nasal (n=10), com retirada em 2 semanas.

Seguimento por 12 semanas: se clínica, tomografia e endoscopia compatível com RS (n=13), animais eram randomizados para serem tratados com antibiótico (ceftriaxona 50 mg/kg/d) por 28 dias (n=6) ou não (n=7).

Reavaliação clínica, tomográfica, endoscópica e microbiológica na 16ª semana.

Resultados: Indução de RSC em 13 dos 22 animais e tomografia compatível (semana 16) com RS em todos os animais não tratados, com diferença estatística entre os tratados e não tratados.

Colonização de patógenos comuns em animais assintomáticos no início do experimento e crescimento de bactérias patogênicas nos animais com RS.

Conclusões: O modelo proposto foi capaz de induzir RSC rinogênica, com possibilidade de reversão do quadro com tratamento antibiótico.

Kim et. al, 2008

Objetivo: Analisar a recuperação da mucosa sinusal medida por frequência de batimento ciliar, desordem da onda ciliar (grau de variação no batimento ciliar de um cílio individualmente) e microscopia eletrônica.

Metodologia: Indução de RS com esponja em óstio colocada por abertura da parede anterior do seio maxilar direito por 2 semanas, após divisão em 2 grupos:

I) Mucosa recuperada (n=5): animal anestesiado para retirar corpo estranho do óstio do seio maxilar direito e aspiração de secreção, ampicilina IM por 2 semanas e sacrifício em 12 semanas.

II) Mucosa regenerada (n=5): igual ao grupo I + remoção da mucosa sinusal lateral.

Resultados: Não descrevem frequência de achados compatíveis com rinosinusite durante abertura do maxilar após 2 semanas da indução.

Sem diferença entre os grupos (I, II e lado controle) em relação à frequência de batimento ciliar. Presença de alteração funcional (desordem da onda ciliar) nos lados intervistos em ambos os grupos, quando comparados ao lado controle.

Evidência de perda de cílios e irregularidades na disposição ciliar à microscopia eletrônica no grupo II.

Conclusões: Embora 12 semanas tenha sido suficiente para recuperação da morfologia do epitélio ciliar após indução de sinusite maxilar experimental, esse tempo não foi longo o bastante para reparação funcional completa da mucosa

n: número de animais no estudo; RS: rinosinusite; RSC: rinosinusite crônica, IM: intramuscular.

Fontes: Adaptado de Liang *et. al* (2008) e Kim *et. al* (2008).

Baseado nos estudos controversos da literatura, com, por exemplo, Johansson e Kara não mostrando desenvolvimento de rinosinusite com a obstrução do óstio sinusal sem inoculação de bactérias e Costa e Liang demonstrando o contrário, começamos a estudar um modelo de rinosinusite sem inoculação de agentes patogênicos, para o aprofundamento a respeito das alterações da mucosa sinusal em longo prazo.

Previamente, em 2008 (59), nosso grupo de pesquisa realizou um projeto inicial com nove coelhos tratados previamente para pasteurelose. Todos eles foram submetidos a procedimento cirúrgico no mesmo período, sob anestesia geral e ventilação mecânica com intubação orotraqueal. Foi realizada abertura bilateral dos seios maxilares de acordo com técnica previamente descrita por outros autores (50), com oclusão dos óstios identificados sob visão microscópica com “guta percha” (substância inerte) amolecida por calor e moldada na região. Os coelhos receberam 1 ml de ácido acético a 0,008%, duas vezes ao dia a partir do primeiro pós-operatório através da osteotomia padronizada à direita, utilizando agulha de insulina até a data da eutanásia. No seio contralateral, não houve instilação de qualquer substância, tampouco penetração com qualquer agulha. Entretanto, nosso método

de oclusão do óstio não foi suficientemente homogêneo entre os animais, pois muitos deles não apresentavam o material adequadamente encaixado no óstio no estudo *post-mortem*. A análise histopatológica da mucosa dos seios maxilares revelou achados compatíveis ao processo inflamatório tanto no “lado intervenção” com ácido acético como no lado sem intervenção medicamentosa. Como no estudo realizado o método de oclusão do seio maxilar não foi eficaz em muitos dos animais, o grupo de pesquisa viu a necessidade de desenvolverem-se métodos de oclusão do óstio maxilar mais homogêneos para o desenvolvimento de estudos e obtenção de conhecimentos em rinosinusite crônica.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Knowlton CD, McGregor GW. How and when the mucous membrane of the maxillary sinus regenerates: an experimental study in the dog. *Arch Otolaryngol.* 1928; 8(6):647–56.
2. Fokkens W, Lund V, Mullol J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinol Suppl.* 2007; (20):1–136.
3. Diretrizes Brasileiras de Rinossinusites. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2008; 74(2):6–59.
4. Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, Lanza DC, Marple BF, Nicklas RA, et al. Rhinosinusitis: establishing definitions for clinical research and patient care. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114(6 Suppl):155–212.
5. Kariyawasam HH, Scadding GK. Chronic rhinosinusitis: therapeutic efficacy of anti-inflammatory and antibiotic approaches. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011; 3(4):226–35.
6. Khalid, A. N, Hunt, J., Perloff, J. R., Kennedy, D. W. The Role of Bone in Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2002; 112(11):1951–7.
7. Brook I, Frazier EH. Bacteriology of chronic maxillary sinusitis associated with nasal polyposis. *J Med Microbiol.* 2005; 54(Pt 6):595–7.
8. Van Bruaene N, Pérez-Novo CA, Basinski TM, Van Zele T, Holtappels G, De Ruyck N, et al. T-cell regulation in chronic paranasal sinus disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121(6):1435–1441, 1441.e1–3.
9. Van Zele T, Claeys S, Gevaert P, Van Maele G, Holtappels G, Van Cauwenberge P, et al. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy.* 2006; 61(11):1280–9.
10. Van Bruaene N, Derycke L, Perez-Novo CA, Gevaert P, Holtappels G, De Ruyck N, et al. TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 124(2):253–259, 259.e1–2.
11. Perloff JR, Palmer JN. Evidence of Bacterial Biofilms in a Rabbit Model of Sinusitis. *Am J Rhinol.* 2005; 19(1):1–6.
12. Cryer J, Schipor I, Perloff JR, Palmer JN. Evidence of Bacterial Biofilms in Human Chronic Sinusitis. *ORL.* 2004; 66(3):155–8.
13. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001; 358(9276):135–8.
14. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):167–93.
15. McCaig LF, Hughes JM. Trends in antimicrobial drug prescribing among office-based physicians in the United States. *JAMA.* 1995; 273(3):214–9.

16. Kaliner MA, Osguthorpe JD, Fireman P, Anon J, Georgitis J, Davis ML, et al. Sinusitis: bench to bedside. Current findings, future directions. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997; 116(6 Pt 2):S1–20.
17. Pleis JR, Ward BW, Lucas JW. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2009. *Vital Health Stat* 10. 2010; (249):1–207.
18. Collins JG. Prevalence of selected chronic conditions: United States, 1990-1992. *Vital Health Stat* 10. 1997; (194):1–89.
19. Chen Y, Dales R, Lin M. The epidemiology of chronic rhinosinusitis in Canadians. *Laryngoscope.* 2003; 113(7):1199–205.
20. Gordts F, Clement PA, Buisseret T. Prevalence of sinusitis signs in a non-ENT population. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1996; 58(6):315–9.
21. Ahsan SF, Jumans S, Nunez DA. Chronic rhinosinusitis: a comparative study of disease occurrence in North of Scotland and Southern Caribbean otolaryngology outpatient clinics over a two month period. *Scott Med J.* 2004; 49(4):130–3.
22. Siegel MI, Mooney MP. Appropriate animal models for craniofacial biology. *Cleft Palate J.* 1990; 27(1):18–25.
23. Kara CO. Animal models of sinusitis: relevance to human disease. *Current Allergy and Asthma Reports.* 2004; 4(6):496–9.
24. Kelemen G. The nasal and paranasal cavities of the rabbit in experimental work. *AMA Arch Otolaryngol.* 1955; 61(5):497–512.
25. Reznik GK. Comparative anatomy, physiology, and function of the upper respiratory tract. *Environ. Health Perspect.* 1990; 85:171–6.
26. Casteleyn C, Cornillie P, Hermens A, Van Loo D, Van Hoorebeke L, van den Broeck W, et al. Topography of the rabbit paranasal sinuses as a prerequisite to model human sinusitis. *Rhinology.* 2010; 48(3):300–4.
27. Kumlien J, Schiratzki H. Blood flow in the rabbit sinus mucosa during experimentally induced chronic sinusitis. Measurement with a diffusible and with a non-diffusible tracer. *Acta Otolaryngol.* 1985; 99(5-6):630–6.
28. Kennedy DW, Shaalan H. Reevaluation of maxillary sinus surgery: experimental study in rabbits. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1989; 98(11):901–6.
29. Forsgren K, Stierna P, Kumlien J, Carlsöö B. Regeneration of maxillary sinus mucosa following surgical removal. Experimental study in rabbits. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1993; 102(6):459–66.
30. Hilding A. Experimental sinus surgery: effects of operative windows on normal sinuses. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1941; 50:379–92.
31. Maeyama T. A study of experimental sinusitis in rabbits. *Auris Nasus Larynx.* 1981; 8(2):87–97.

32. Johansson P, Kumlien J, Söderlund K, Hultman E. Experimental acute sinusitis in rabbits. Energy metabolism in sinus mucosa and secretion. *Acta Otolaryngol.* 1988; 106(5-6):460–7.
33. Westrin KM, Norlander T, Stierna P, Carlsöö B, Nord CE. Experimental maxillary sinusitis induced by *Bacteroides fragilis*. A bacteriological and histological study in rabbits. *Acta Otolaryngol.* 1992; 112(1):107–14.
34. Fukami M, Norlander T, Stierna P, Westrin KM, Carlsöö B, Nord CE. Mucosal Pathology of the Nose and Sinuses: A Study in Experimental Maxillary Sinusitis in Rabbits Induced by *Streptococcus Pneumoniae*, *Bacteroides Fragilis*, and *Staphylococcus Aureus*. *Am J Rhinol.* 1993; 7(3):125–32.
35. Bolger WE, Leonard D, Dick EJ Jr, Stierna P. Gram negative sinusitis: a bacteriologic and histologic study in rabbits. *Am J Rhinol.* 1997; 11(1):15–25.
36. Benninger MS, Kaczor J, Stone C. Natural ostiotomy vs. inferior antrostomy in the management of sinusitis: an animal model. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993; 109(6):1034–42.
37. Mikula SK, Gannon PJ, Shapiro J, Lawson W. Gaseous dynamics of the rabbit maxillary sinus. *Laryngoscope.* 1996; 106(2 Pt 1):152–5.
38. Hinni ML, McCaffrey TV, Kasperbauer JL. Early mucosal changes in experimental sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992; 107(4):537–48.
39. Marks SC. Acute sinusitis in the rabbit: a new rhinogenic model. *Laryngoscope.* 1997; 107(12 Pt 1):1579–85.
40. Kara CO, Cetin CB, Colakoğlu N, Sengül M, Pakdemirli E. Experimentally induced rhinosinusitis in rabbits. *J Otolaryngol.* 2002; 31(5):294–8.
41. Gannon PJ, Doyle WJ, Ganjian E, Marquez S, Gnoy A, Gabrielle HS, et al. Maxillary sinus mucosal blood flow during nasal vs tracheal respiration. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1997; 123(12):1336–40.
42. Costa HO, Ruschi e Luchi GE, Augusto AG, Castro M, de Souza FC. Comparative study of several sinusitis experimental modelling techniques in rabbits. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007; 73(5):627–31.
43. Bomer K, Brichta A, Baroody F, Boonlayangoor S, Li X, Naclerio RM. A mouse model of acute bacterial rhinosinusitis. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1998; 124(11):1227–32.
44. Khalid AN, Woodworth BA, Prince A, Quraishi SA, Antunes MB, Long FHA, et al. Physiologic alterations in the murine model after nasal fungal antigenic exposure. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 139(5):695–701.
45. Jin M, Gu Z, Bian Z, Yang J, Cao Z, Yu X, et al. Developing a mouse model of acute bacterial rhinosinusitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011; 268(6):857–61.
46. Ferguson B. Commentary to development of a murine model of chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 134(5):731–2.

47. Lindsay R, Slaughter T, Britton-Webb J, Mog SR, Conran R, Tadros M, et al. Development of a murine model of chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 134(5):724–730; discussion 731–2.
48. Spilki F. R. Um surto de Pasteurelose em coelhos mantidos em biotério. *Acta Scientiae Veterinariae.* 2002; 30:131–4.
49. Liang K-L, Jiang R-S, Wang J, Shiao J-Y, Su M-C, Hsin C-H, et al. Developing a rabbit model of rhinogenic chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2008; 118(6):1076–81.
50. Chiu AG, Antunes MB, Palmer JN, Cohen NA. Evaluation of the in vivo efficacy of topical tobramycin against *Pseudomonas* sinonasal biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(6):1130–4.
51. Chennupati SK, Chiu AG, Tamashiro E, Banks CA, Cohen MB, Bleier BS, et al. Effects of an LL-37-derived antimicrobial peptide in an animal model of biofilm *Pseudomonas* sinusitis. *Am J Rhinol Allergy.* 2009; 23(1):46–51.
52. Rautiainen M, Collan Y, Nuutinen J. A method for measuring the orientation (“beat direction”) of respiratory cilia. *Arch Otorhinolaryngol.* 1986; 243(4):265–8.
53. Lee CH, Lee SS, Mo J-H, Kim I-S, Quan S-H, Wang SY, et al. Comparison of ciliary wave disorders measured by image analysis and electron microscopy. *Acta Otolaryngol.* 2005; 125(5):571–6.
54. Benninger MS, Schmidt JL, Crissman JD, Gottlieb C. Mucociliary function following sinus mucosal regeneration. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991; 105(5):641–8.
55. Benninger MS, Sebek BA, Levine HL. Mucosal regeneration of the maxillary sinus after surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989; 101(1):33–7.
56. Czaja JM, McCaffrey TV. The correlation between ciliary ultrastructure and ciliary beat frequency in experimental chronic sinusitis. *Am J Rhinol.* 1998; 12(5):317–23.
57. Min YG, Kim IT, Park SH. Mucociliary activity and ultrastructural abnormalities of regenerated sinus mucosa in rabbits. *Laryngoscope.* 1994 dez;104(12):1482–6.
58. Kim YM, Lee CH, Won T-B, Kim SW, Kim J-W, Rhee C-S, et al. Functional recovery of rabbit maxillary sinus mucosa in two different experimental injury models. *Laryngoscope.* 2008; 118(3):541–5.
59. Piltcher O, Migliavacca R, Manica D, Kang S, Kliemann L. Experimental Model in CRS to Study a Topical Solution. *Otolaryngology - head and neck surgery.* 2010; 143(2):P282.

4 OBJETIVOS

Neste capítulo, serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos que guiaram a elaboração do trabalho, conforme subcapítulos seguintes.

4.1 OBJETIVO GERAL

Como objetivo geral, o presente estudo procurou comprovar que sem bactérias é possível induzir alterações histológicas crônicas nos seios maxilares de coelhos através da obstrução do óstio de drenagem dos mesmos, produzindo um modelo experimental para rinosinusite crônica.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos, procurou-se comparar a técnica de oclusão do óstio do seio maxilar com N-butil cianocrilato via transmaxilar, com a técnica de oclusão do óstio do seio maxilar com visualização através do teto da fossa nasal e inserção de N-butil cianocrilato na região do meato médio, em relação aos achados macroscópicos e histopatológicos compatíveis com rinosinusite em seios maxilares.

5 ARTIGO

Modelo Experimental de Rinossinusite Crônica em Coelhos sem Utilização de Bactérias: Comparação de Técnicas de Indução

Raphaella de Oliveira Migliavacca¹, Otávio Bejzman Piltcher², Lúcia Maria Kliemann, Marcelle³ Reesink Cerski³, Fabíola Meyer⁴, Sady Selaimen da Costa¹⁻²

5.1 RESUMO

Os modelos experimentais têm um papel importante no conhecimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da rinossinusite crônica (RSC). **Objetivos:** comprovar que sem inoculação de bactérias seria possível induzir alterações histológicas crônicas nos seios maxilares de coelhos através da obstrução do óstio de drenagem dos mesmos, produzindo um modelo experimental consistente e reproduzível para RSC. Secundariamente, comparar achados inflamatórios entre duas técnicas de oclusão do óstio do seio maxilar com N-butil cianocrilato: via transmaxilar (VTM) e via teto de fossa nasal (VTFN). **Métodos:** estudo experimental randomizado cego em animais de laboratório realizado na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no qual foram sorteados dezesseis coelhos Nova Zelândia entre oclusão do seio maxilar direito VTM ou VTFN. Após 12 semanas de seguimento, os animais

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

² Serviço de Otorrinolaringologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴ Unidade de Experimentação Animal, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

foram anestesiados e sacrificados para análise histopatológica cegada da mucosa do seio maxilar. **Resultados:** apresentavam alterações histopatológicas compatíveis com RSC os oito (100%) seios maxilares intervindos através da técnica VTM e três (37,5%) através da técnica VTFN, com p 0,008 e 0,250, respectivamente, quando comparados lado direito com o lado controle. Comparando-se as duas técnicas de oclusão, a técnica VTM mostrou-se mais consistente em provocar alterações crônicas nas mucosas dos seios maxilares ocluídos (p 0,026). **Conclusões:** O modelo do presente trabalho obteve sucesso em provocar alterações histológicas compatíveis com RSC nos animais submetidos à técnica de oclusão VTM com seguimento de 12 semanas, podendo ser facilmente replicável para futuros estudos celulares na mucosa sinusal.

Palavras-chave: rinosinusite, rinosinusite crônica, modelo experimental, coelhos.

5.2 INTRODUÇÃO

A prevalência de doenças infecto-inflamatórias das vias respiratórias é extremamente alta na população geral. O impacto dessas doenças na qualidade de vida é evidente e relevante, especialmente nos casos ditos crônicos. Segundo estatísticas norte-americanas, a rinosinusite crônica (RSC) afeta aproximadamente 30 milhões de indivíduos americanos e gera um custo de 6 bilhões de dólares anualmente (1). No Brasil, apesar de ser reconhecida como uma das afecções mais comuns das vias aéreas superiores, há uma carência em estudos epidemiológicos bem delineados relacionados às rinosinusites.

A RSC é definida como um processo inflamatório que acomete a mucosa que reveste a cavidade nasal e os seios paranasais por um período superior a doze

semanas (2).

As mudanças evolutivas que levaram o homem a uma postura ereta fizeram com que a ventilação e a drenagem sinusal ocorressem contra a gravidade e dependessem da patência do complexo ostiomeatal. Assim, fatores que comprometem essa patência atuam como predisponentes para o desenvolvimento da rinosinusite (3). Entretanto, os fatores primários na patogênese da RSC são múltiplos e algumas vezes obscuros. Quando o complexo ostiomeatal se torna obstruído e com alterações inflamatórias persistentes, acredita-se que ocorra disfunção mucociliar e estase de secreções, exacerbando o processo, assim como inabilidade de remoção sinusal de patógenos (bactérias e fungos) (1).

Nesse sentido, se por um lado sabemos que a RSC possui elevada prevalência, por outro ainda temos muito a compreender sobre a patogênese e a categorização das rinosinusites, a fim de reduzir impropriedades em condutas clínicas e tornar o diagnóstico e o tratamento mais acurados.

Dentro desse contexto, os modelos experimentais têm um papel importante no estudo desses processos. Vários modelos animais já provaram ser úteis ao revelar informações para estudos craniofaciais, otológicos e rinosinusais. Especificamente em relação ao estudo das rinosinusites, o modelo com coelhos é o mais utilizado. O seio maxilar dos coelhos assemelha-se ao de humanos sob vários aspectos: um óstio bem definido, uma cavidade ampla e acessível e um sistema mucociliar com características comparáveis (4). A maioria dos estudos que focam modelos experimentais de rinosinusite associa técnicas de oclusão do óstio do seio maxilar com a inoculação de bactérias. Além disso, grande parte deles possui um tempo de seguimento curto, de dias, sendo apropriado extrapolar seus achados apenas para a doença rinosinusal aguda.

Dessa forma, surge a necessidade de estabelecerem-se modelos experimentais crônicos com métodos para indução de rinosinusite bem detalhados e replicáveis. Em relação ao desfecho final de inflamação crônica, não há, na literatura, estudos sem inoculação de bactérias comparando os métodos para o desenvolvimento do modelo experimental mais adequado para o estudo da RSC. O objetivo do presente estudo, portanto, foi comprovar que sem inoculação de bactérias seria possível induzir alterações histológicas crônicas nos seios maxilares de coelhos através da obstrução do óstio de drenagem dos mesmos, produzindo um modelo experimental consistente e reproduzível para RSC. Secundariamente, o estudo comparou achados inflamatórios entre duas técnicas de oclusão do óstio do seio maxilar com N-butil cianocrilato (via transmaxilar e via teto de fossa nasal).

5.3 MÉTODOS

Este estudo foi conduzido na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Seu delineamento foi de um estudo experimental randomizado e cegado em animais de laboratório.

O cálculo do tamanho amostral foi determinado através de revisão da literatura e de estudos pilotos, a partir dos quais foi estimada uma taxa de sucesso de oclusão e indução de rinosinusite de 80% em cada grupo. Considerando-se poder estatístico de 80%, o n calculado foi de sete coelhos por grupo (poder de 80%). Utilizou-se um coelho a mais em cada grupo devido ao risco de perda de algum animal durante o estudo.

Dezesseis coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) Nova Zelândia, machos, com idade em torno de 120 dias de vida, com peso entre 2700 a 3500 gramas foram alocados para o estudo.

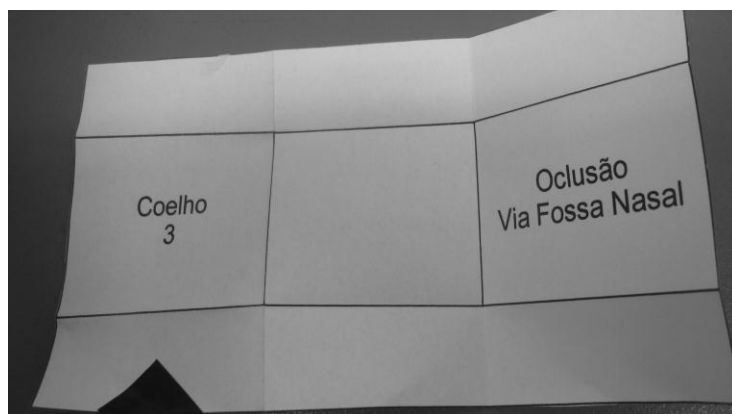
Os critérios de exclusão foram os seguintes: (I) presença de secreção purulenta em seio maxilar no transoperatório, visualizada ao abrir-se sua mucosa; (II) presença de hiperplasia de mucosa sinusal com infiltrado de células inflamatórias na análise histopatológica de biópsia realizada no transoperatório dos animais, definindo um quadro de rinossinusite; e (III) morte do animal no decorrer do estudo.

5.3.1 Preparo pré-operatório

Os coelhos chegaram à Unidade de Experimentação Animal no mínimo três dias antes do procedimento cirúrgico para um período de adaptação, quando receberam a primeira aplicação intramuscular de oxitetraciclina 20 mg/kg. Em um intervalo de três dias, foi aplicada a segunda dose de antibioticoterapia profilática. Essa medicação foi dada devido à alta prevalência de *Pasteurella multocida* e à possível apresentação subclínica da infecção. A escolha e a dosagem da medicação utilizada foram baseadas em um estudo previamente conduzido no Rio Grande do Sul, Brasil (5).

Foram confeccionados 16 envelopes selados por um auxiliar da pesquisa cegado a fim de selecionar-se a ordem dos procedimentos realizados. Os coelhos eram sorteados entre os grupos que seriam submetidos à técnica de oclusão do óstio do seio maxilar com N-butil cianocrilato via transmaxilar (grupo VTM) ou via teto da fossa nasal (grupo VTFN). O esquema de randomização foi gerado usando-se o *website* randomization.com (<http://www.randomization.com>) (Figura 1).

Figura 1. Envelope selado contendo o procedimento a ser realizado, aberto após indução anestésica.



5.3.2 Anestesia

Como medicação pré-anestésica, foi administrado petidina 5mg/kg, midazolam 1mg/kg e cetamina 15 mg/kg, na mesma seringa, por via intramuscular. Essa sedação visava facilitar o manejo dos animais e a indução anestésica. Após 10 minutos, era realizada a tricotomia do dorso nasal e o animal era levado até o bloco cirúrgico. Antes da indução anestésica era fornecido oxigênio 100% e monitorada a frequência cardíaca e a saturação. Com o animal estável, iniciava-se o fornecimento de isoflurano 5V% até a perda do reflexo de retirada da pata anterior, quando era procedida a intubação com tubo endotraqueal número 3.0. Os animais foram mantidos em sistema Baraka com ventilação espontânea e fornecimento de isoflurano 2 - 3V% .

Após o posicionamento do animal no campo cirúrgico e assepsia com iodo tópico, ainda realizava-se a infiltração com os anestésicos locais bupivacaína 1,5 mg/kg e lidocaína 2 mg/kg.

Como analgésico no pós-operatório, foi usado tramadol 2 mg/kg de 12/12 horas por 2 dias. Não foram utilizados antibióticos no pós-operatório.

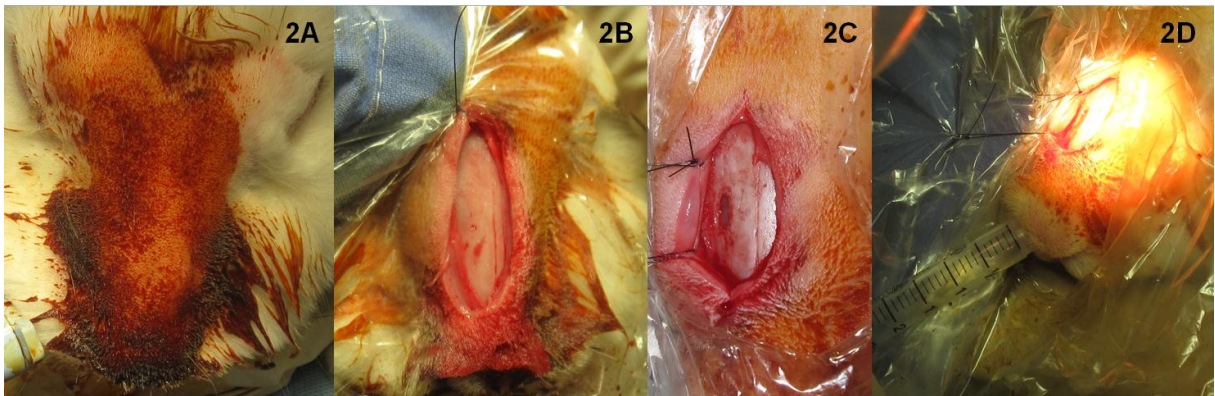
5.3.3 Procedimento cirúrgico

O material empregado incluiu broqueador elétrico com brocas cortantes, microscópio cirúrgico (Vasconcelos, D.F. Vasconcelos, São Paulo, SP, Brasil) e material cirúrgico estéril. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo cirurgião (primeira autora do estudo). Após a intubação do animal, o envelope selado era aberto para verificação do procedimento a ser realizado. Os coelhos eram sorteados entre os grupos abaixo descritos.

Grupo Via Transmaxilar (VTM): oclusão do óstio do seio maxilar direito sob visualização direta através do seio maxilar. Após antissepsia (figura 2A), o acesso ao seio maxilar era realizado através de uma incisão cutânea vertical de aproximadamente 4 centímetros com lâmina 15 na linha média do dorso nasal, sem atingir o perióstio. Em seguida, um retalho de perióstio com base lateral para o lado direito era elevado e fixado com fio *mononylon* 3.0 para exposição do osso maxilar (figura 2B). Com a broca, realizava-se uma fenestra de 4-5 mm na topografia superior do seio maxilar sem romper a mucosa subjacente (figura 2C). Antes da abertura da mucosa do seio maxilar, era realizado um teste com inserção de ar com seringa de 3 ml na fossa nasal direita para verificar movimentação da mucosa e consequente patência do óstio (figura 2D). Após, a mucosa era incisada com estilete e abria-se o seio maxilar direito, propiciando a visualização do aspecto de sua mucosa e possíveis secreções e identificação do óstio (figura 3). Era, então, realizada a oclusão do óstio com tecido subcutâneo retirado do próprio animal

(porção de 5 por 3mm) e duas gotas N-butil cianocrilato (Vetbond®, 3M, St Paul, MN, EUA), e biopsiada uma porção da mucosa (figura 4). O retalho de periósteo era então reposicionado e o teste para verificação de patência do óstio com inserção de ar através de seringa de 3 ml era repetido. Qualquer movimentação do retalho nesse momento indicaria necessidade de reposicionamento efetivo do material de oclusão. Finalmente, era efetuado fechamento por planos com *vicryl* 4-0 e *mononylon* 3-0.

Figura 2. Sequência do procedimento realizado em todos os casos.



Antissepsia (figura 2A); acesso e exposição do osso maxilar, com visualização por transparência de septo, fossas nasais e seio maxilar (figura 2B); fenestra de 4-5 mm na topografia superior do seio maxilar sem rompimento da mucosa subjacente (figura 2C); teste da patência do óstio (figura 2D).

Figura 3. Visualização do aspecto da luz e da mucosa do seio maxilar e identificação do óstio (seta).

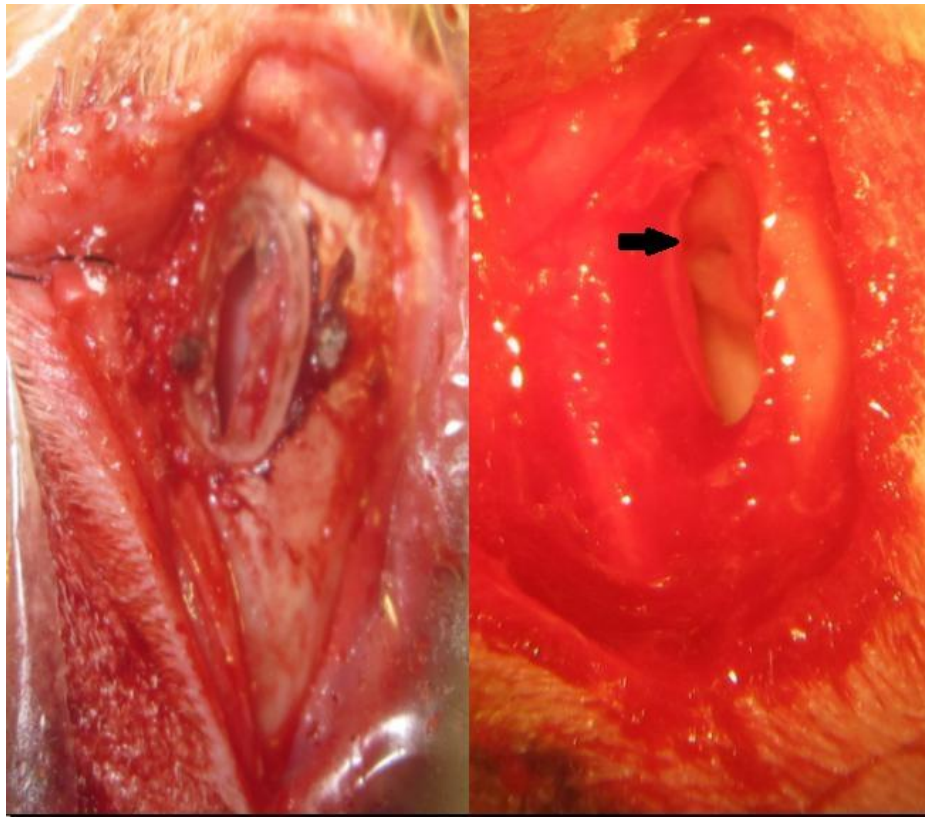
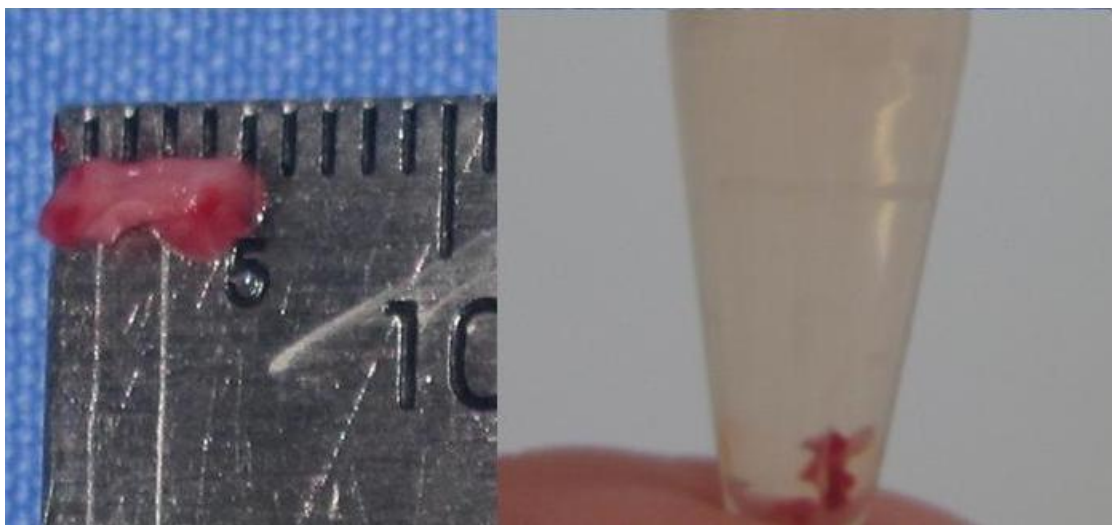
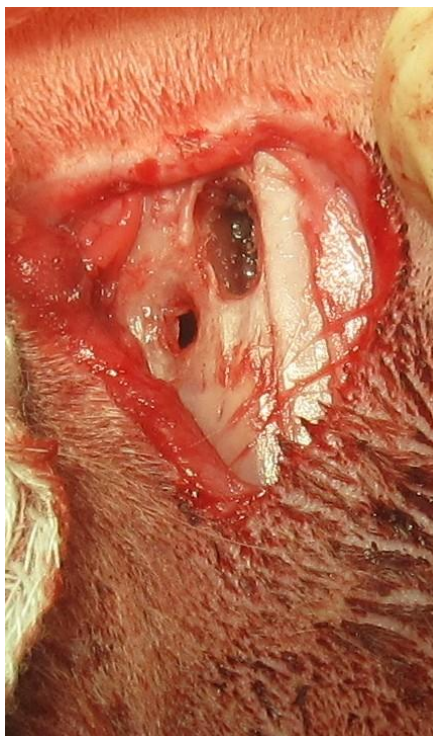


Figura 4. Porção de tecido subcutâneo retirado do próprio animal e biópsia de porção da mucosa.



Grupo Via Teto de Fossa Nasal (VTFN): oclusão da região do meato médio direito com visualização através do teto da fossa nasal. Iniciava-se o acesso e a confecção de retalho, fenestra em topografia de seio maxilar, sem romper a mucosa e teste da patência do óstio similarmente ao Grupo VTM (figura 2). Na sequência, era visualizado por transparência o septo nasal e a fossa nasal, sendo broqueado este espaço. Como ponto de referência superior, utilizava-se o canto interno e inferior do olho homolateral (3 cm mediais) (figura 5). Após o uso da broca, visualizava-se e posicionava-se medialmente a estrutura equivalente ao corneto médio, denominada *endoturbinata*. Assim, era palpado o óstio do seio maxilar com palpador delicado e o mesmo era ocluído com tecido subcutâneo retirado do próprio animal (porção de 5 por 3 mm) e duas gotas de N-butil cianocrilato. Testava-se, com inserção de ar e recolocação do retalho sobre o teto nasal, a ausência de movimentação da mucosa do seio maxilar direito. Após, era realizada abertura do seio com estilete para biópsia de sua mucosa e fechamento por planos, assim como descrito no Grupo VTM.

Figura 5. Acesso via teto de fossa nasal.



Nenhum procedimento foi realizado no lado esquerdo em ambos os grupos nesse momento da pesquisa. Todos os achados transoperatórios foram devidamente registrados, assim como as especificações dos materiais utilizados (Anexos 1 e 4, respectivamente).

5.3.4 Seguimento

Os animais permaneceram na Unidade de Experimentação Animal sob supervisão veterinária por 12 semanas. Durante todo o período, ficaram em ambiente com temperatura controlada ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), livre de barulho e estresse e em gaiolas numeradas, com ração e água *ad libitum*. Semanalmente, era preenchida uma ficha de acompanhamento pós-operatório, com parâmetros sobre estado geral dos animais, recusa alimentar e aspecto de ferida operatória.

5.3.5 Morte dos Animais

A morte dos animais ocorreu 12 semanas após o procedimento para indução de rinosinusite. Foi realizada sedação de midazolam 1 mg/kg e cetamina 15 mg/kg, seguida da administração de overdose de propofol 15 mg/kg. Por fim, foi administrado 5 ml de cloreto de potássio 10% para parada cardíaca.

5.3.6 Estudo Microbiológico

Logo após a eutanásia de cada animal, foi coletado material diretamente de cada seio maxilar através de osteotomia e colocação da secreção diluída em soro de meio líquido específico para hemocultura (BacT/ALERT®, Biomérieux, Durham, NC, EUA).

5.3.7 Estudo Histopatológico

As peças foram preparadas com remoção da pele, seguida de secção coronal com serra da borda inferior do globo ocular até 1,5 cm do limite anterior da maxila e lavagem em água corrente. Elas eram colocadas em formalina a 10% por 72 horas e, após, em ácido nítrico a 10% por 24 horas, para descalcificação, para descalcificação, com repetição do processo por mais 24 horas se necessário. No seguimento, as peças sofriam cortes com espessura média de 5 mm para serem examinadas, na qual selecionavam-se os cortes representativos de cada seio maxilar (direito e esquerdo) e seu óstio para fotografia e análise. O material, nesse momento separado em direito e esquerdo e devidamente identificado, era novamente lavado em água corrente e colocado em álcool a 70%. O processamento histológico seguiu-se com desidratação em seis álcoois, diafinização em dois xilóis e embebição e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em

micrótomo automático Leica RM 2155 em cortes de 5 micrômetros e corados pela técnica da hematoxilina-eosina.

As análises das lâminas foram realizadas em microscópio óptico Olympus BX41 por duas patologistas cegadas para a intervenção a qual o animal foi submetido. Para isso, as lâminas foram numeradas de forma aleatória por randomização.

5.3.8 Análise das Variáveis

A presença de material ocluindo o óstio do seio maxilar e de secreção no seio foram as variáveis utilizadas para o estudo macroscópico *post-mortem* dos animais. Essas variáveis foram analisadas e fotografadas após a descalcificação das peças e eram categorizadas em sim ou não, sem o conhecimento sobre intervenção que o coelho em questão havia sido submetido.

Para a análise histopatológica cegada foram utilizadas as variáveis categóricas dicotômicas (sim e não): (I) infiltrado linfo-plasmocitário; (II) infiltrado neutrocitário; (III) hiperplasia de mucosa; (IV) hiperplasia de células caliciformes; (V) destacamento de epitélio; (VI) ulceração focal da mucosa; (VII) exsudato inflamatório/pus; (VIII) formação polipoide; (IX) edema submucoso; (X) congestão vascular de vasos submucosos; (XI) aumento de osteoblastos (>4 por trabécula óssea); (XII) rinosinusite crônica (hiperplasia de mucosa sinusal com infiltrado denso de células inflamatórias crônicas) (1); (XIII) atrofia; (XIV) metaplasia; (XV) tecido de granulação; (XVI) fibrose; e (XVII) hemorragia. Baseando-se em estudos previamente publicados em rinosinusite crônica em coelhos (6), foram utilizados adicionalmente os escores de 0 (ausente) a 4 (muito grave) para as variáveis (I), (II),

(IV) e (VI), além da presença ou não de perda de cílios na mucosa do seio maxilar e seu grau (0 a 4) (Anexo 3).

Foram descritos os germes isolados em cada seio maxilar.

5.3.9 Considerações Estatísticas

Para a análise estatística, foi utilizado o programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 17.0 (Somers, NY). As variáveis categóricas foram descritas por proporções ou mediana e intervalo interquartis (variáveis ordinais). O teste de significância utilizado para a diferença entre as proporções foi o teste de McNemar por método exato, exceto em variáveis com mais de dois níveis, quando utilizou-se o teste de Wilcoxon. O teste exato de Fisher foi empregado para compararem-se as diferenças entre as técnicas cirúrgicas em variáveis categóricas dicotômicas, e o teste de Mann-Whitney em variáveis ordinais. A fim de verificar-se a concordância entre os observadores das variáveis histopatológicas, utilizou-se o Índice de Kappa e percentagem de concordância.

5.3.10 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos adotados neste trabalho obedeceram aos critérios, normas técnicas e direitos internacionais de pesquisa em animais, preconizadas por normativas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. O protocolo de pesquisa foi aprovado sob o número 110292 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) vinculado ao Grupo de Pesquisa de Pós-Graduação que, por sua vez, é ligado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

5.4. RESULTADOS

Nenhum animal apresentou critérios para ser excluído do estudo. Assim, 8 coelhos foram submetidos à técnica VTM de obstrução de óstio à direita e 8 à técnica VTFN.

Após 12 semanas de seguimento pós-cirúrgico e morte dos animais, houve o preparo das peças mediante abertura coronal dos seios paranasais. Nesse momento, verificou-se a presença macroscópica de material ocluindo o óstio do seio maxilar direito nos 8 coelhos submetidos à técnica VTM, com presença de secreção purulenta franca dentro dos seios maxilares direitos em 6 dos 8 coelhos (figura 6).

Nos animais submetidos à técnica VTFN, a presença de material ocluindo o óstio direito era evidente em 5 deles, acompanhada de secreção na luz do seio maxilar (figura 7A), enquanto a oclusão parcial ou duvidosa era presente em 2 (figura 7B). Apenas um não apresentava qualquer vestígio de material no óstio do seio maxilar (figura 7C).

Figura 6. Secreção purulenta franca no interior do seio maxilar direito no estudo macroscópico *post-mortem* de um animal submetido à técnica via transmaxilar.

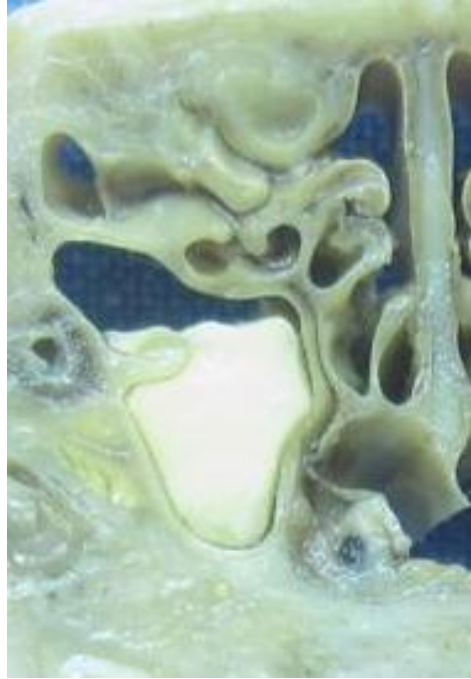
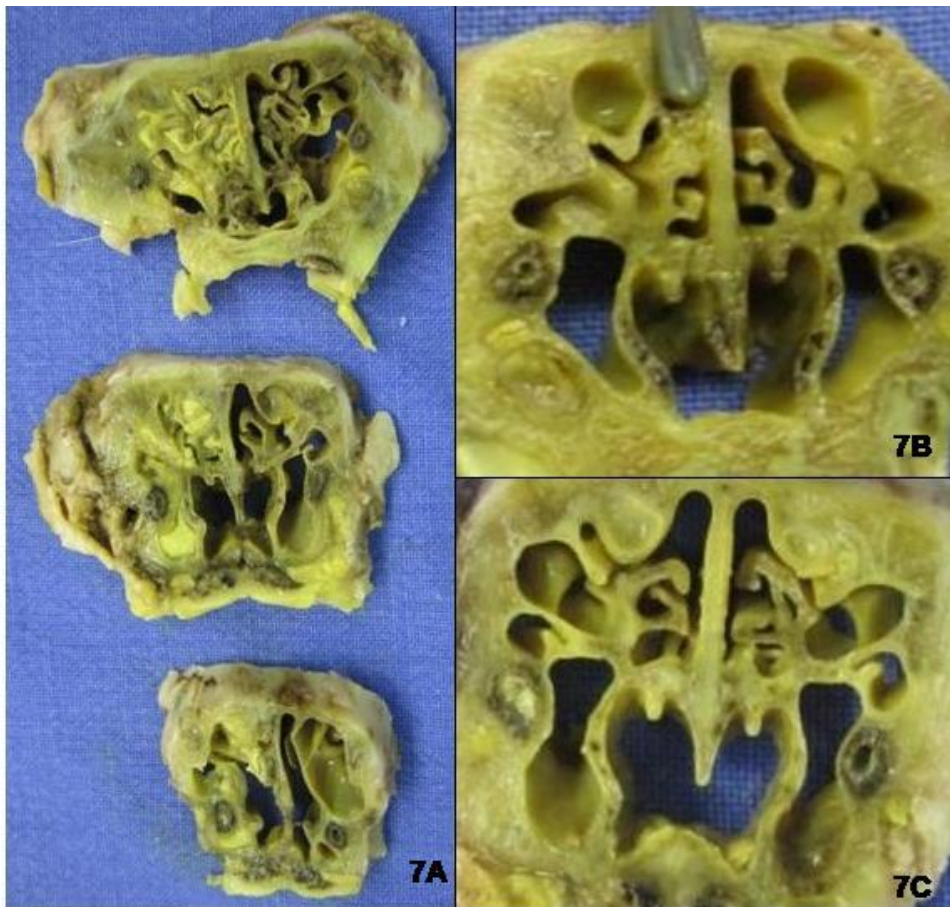


Figura 7. Representa três exemplos de peças com corte coronal de animais submetidos à técnica via teto de fossa nasal.

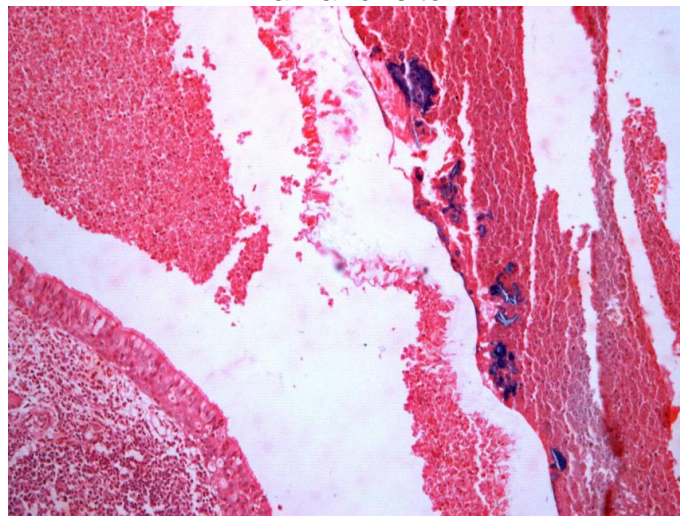


Presença de material ocluindo o óstio direito e secreção purulenta na luz do maxilar e labirinto etmoidal (figura 7A); oclusão parcial do óstio (figura 7B) e ausência de qualquer material no óstio do seio maxilar (figura 7C).

Alterações histológicas compatíveis com RSC (hiperplasia de mucosa sinusal com infiltrado denso de células inflamatórias crônicas) foram encontradas na mucosa dos seios maxilares direitos dos 8 coelhos (100%) submetidos à técnica de oclusão VTM (figura 8), com significância estatística quando comparado com o lado controle ($p < 0,008$). Três seios maxilares direitos (37,5%) submetidos à técnica de oclusão VTFN apresentavam aspecto de rinossinusite crônica (figuras 9 e 10). As lâminas que representavam o lado oposto ao da oclusão (controle) evidenciaram mucosa normal (figura 11) ou atrófica (figura 12), sem haver achados compatíveis com RSC. A tabela 1 mostra os achados histopatológicos dos dois grupos.

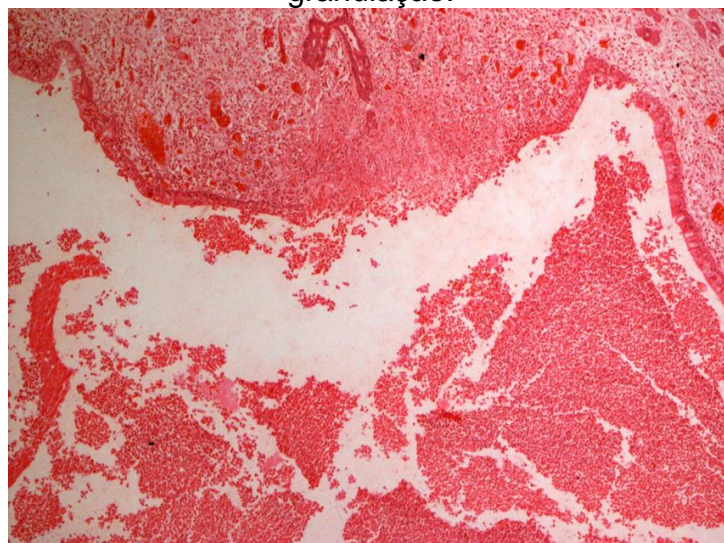
Comparando-se as duas técnicas de oclusão (Tabela 2), a técnica VTM mostrou-se mais consistente em provocar alterações crônicas nas mucosas dos seios maxilares ocluídos (p 0,026). A mediana do índice Kappa entre as patologistas foi de 0,67 no lado oclusão e 0,74 no lado controle. O percentual de concordância entre as patologistas apresentou mediana de 88%.

Figura 8. Coelho submetido à técnica via transmaxilar, com análise histopatológica evidenciando infiltrado inflamatório, exsudato na luz e colônias bacterianas no seio maxilar direito.



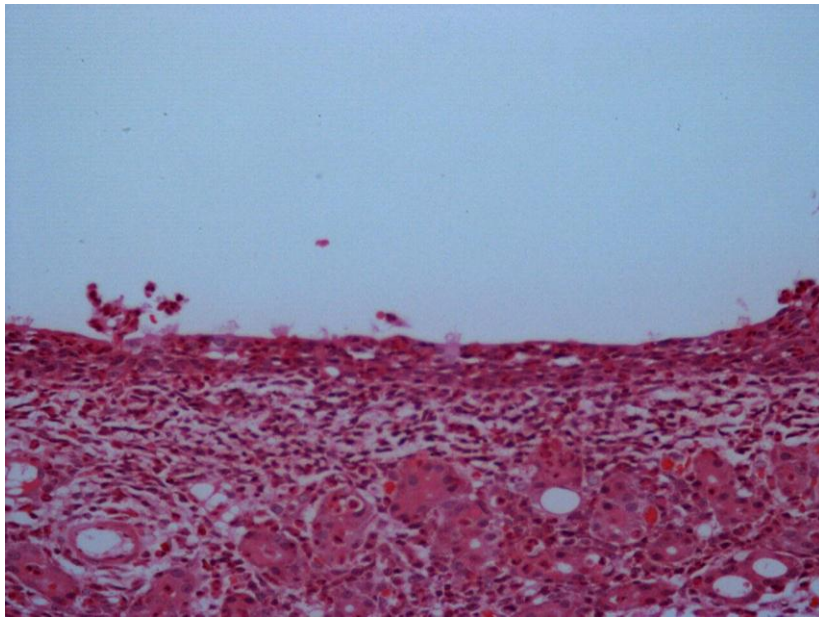
Aumento de 200x.

Figura 9. Seio maxilar direito de animal submetido à técnica de oclusão via teto de fossa nasal com evidência de exsudato na luz, infiltrado inflamatório e tecido de granulação.



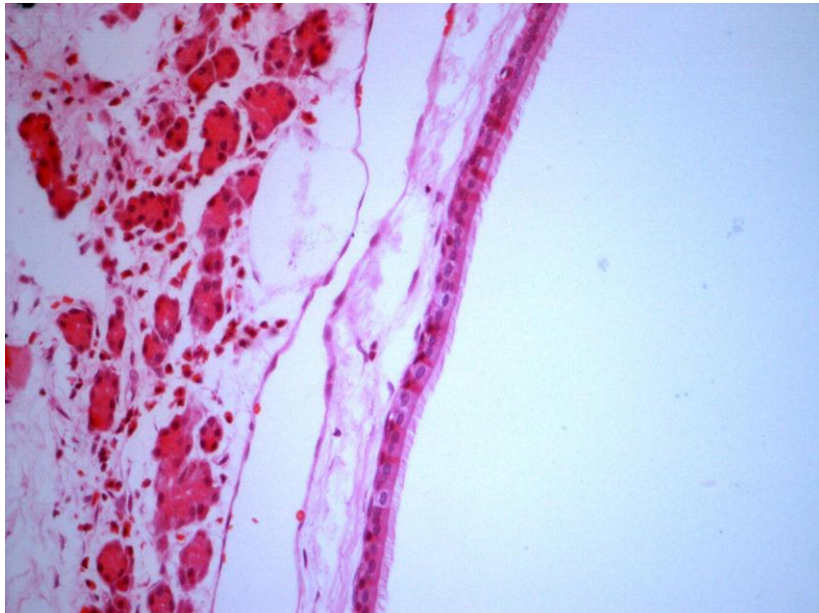
Aumento: 100x.

Figura 10. Infiltrado linfo-plasmocitário, erosão da mucosa do seio maxilar direito de animal submetido à técnica via teto de fossa nasal.

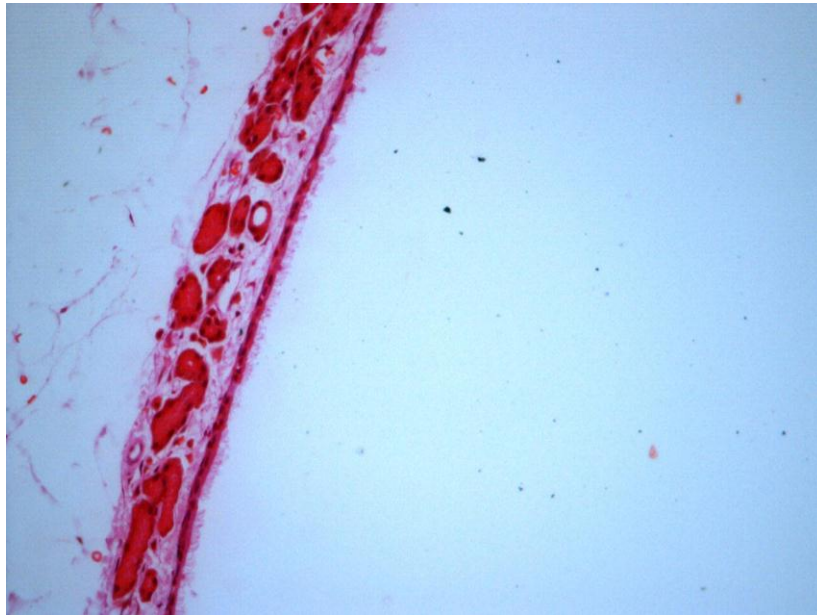


Aumento: 400x.

Figura 11. Exemplo de mucosa normal em lado controle.



Aumento de 400x.

Figura 12. Exemplo de mucosa atrófica no lado controle.

Aumento de 400x.

Tabela 1. Comparação de dados macroscópicos e histopatológicos entre lados ocluídos e lados controle (teste de McNemar por método exato, exceto *).

	Técnica Via Transmaxilar			Técnica Via Teto de Fossa Nasal		
	Lado Oclusão	Lado Controle	P	Lado Oclusão	Lado Controle	P
Oclusão Macroscópica	8/8	0/8	0,008	5/8 (total) 2/8 (semi)	0/8	0,45**
Secreção Macroscópica	6/8	2/8	0,125	5/8	0/8	0,63
Atrofia da Mucosa	1/8	2/8	1,0	1/8	1/8	1,0
Metaplasia	0/8	0/8	1,0	0/8	0/8	1,0
Hiperplasia de Mucosa	7/8	1/8	0,031	2/8	2/8	1,0
Hiperplasia de Células Caliciformes	7/8	1/8	0,031	3/8	4/8	1,0
Grau de Células Caliciformes	1 (1,0-1,75)*	0 (0-0)*	0,094**	0 (0-1,0)*	0,5 (0-1,0)	1,0**
Destacamento Epitelial	4/8	6/8	0,625	3/8	3/8	1,0
Ulceração Focal da Mucosa	4/8	1/8	0,25	1/8	0/8	1,0
Grau de Ulceração	0,50	0,0	0,25**	0,0	0,0	1,0**

Focal da Mucosa	(0,0-1,75)*	(0,0-0,0)*		(0,0-0,0)*	(0,0-0,0)*	
Perda de Cílios	6/8	5/8	1,0	4/8	4/8	1,0
Grau de Perda de Cílios	1 (0,25-1)*	1 (0-1)*	0,75**	0,5 (0-1,75)*	0,5 (0-1)*	0,5**
Infiltrado Neutrocitário	3/8	0/8	0,25	2/8	0/8	0,500
Grau de Infiltrado Neutrocitário	0 (0-1)*	0 (0-0)*	0,25**	0 (0-0,75)*	0 (0-0)*	0,5**
Infiltrado Linfo-Plasmocitário	8/8	3/8	0,063	7/8	4/8	0,250
Grau de Infiltrado Linfo-Plasmocitário	2 (2-3)*	0 (0-1)*	0,023**	1 (1-1,75)*	0,5 (0-1)*	0,25**
Tecido de Granulação	0/8	0/8	1,0	1/8	0/8	1,0
Fibrose	2/8	0/8	0,500	1/8	0/8	1,0
Exsudato	7/8	0/8	0,016	2/8	0/8	0,500
Formação Polipóide	0/8	0/8	1,0	0/8	0/8	1,0
Edema Submucoso	7/8	4/8	0,250	5/8	4/8	1,0
Congestão Submucosa	7/8	6/8	1,0	7/8	5/8	0,500
Hemorragia	2/8	1/8	1,0	3/8	1/8	0,500
Aumento de Osteoblastos	8/8	4/8	0,125	8/8	5/8	0,250
Rinossinusite Crônica	8/8	0/8	0,008	3/8	0/8	0,250

* Variáveis com mais de dois níveis estão descritas em mediana e percentil 25 e 75 (entre parênteses).

** Para comparação de variáveis com mais de dois níveis foi utilizado o teste de Wilcoxon.

Tabela 2. Comparação entre técnicas dos dados histopatológicos no seio maxilar direito (intervenção) (teste exato de Fisher).

	Técnica Via Seio Maxilar	Técnica Via Teto de Fossa Nasal	P
Oclusão Macroscópica	8/8	5/8 2/8 (semi)	0,2
Secreção Macroscópica	6/8	5/8	1,0
Tempo Cirúrgico (média em minutos)	41	51	0,2
Atrofia da Mucosa	1/8	1/8	1,0
Metaplasia	0/8	0/8	1,0

Hiperplasia de Mucosa	7/8	2/8	0,041
Hiperplasia de Células Caliciformes	7/8	3/8	0,119
Grau de Células Caliciformes	1,0*	0,0*	0,105**
Destacamento Epitelial	4/8	3/8	1,0
Ulceração Focal da Mucosa	4/8	1/8	0,282
Grau de Ulceração Focal da Mucosa	0,50*	0,0*	0,195**
Perda de Cílios	6/8	4/8	0,608
Grau de Perda de Cílios	1,0*	0,5*	0,645**
Infiltrado Neutrocitário	3/8	2/8	1,0
Grau de Infiltrado Neutrocitário	0*	0*	0,798**
Infiltrado Linfo-Plasmocitário	8/8	7/8	1,0
Grau de Infiltrado Linfo-Plasmocitário	2,0*	1,0*	0,038**
Tecido de Granulação	0/8	1/8	1,0
Fibrose	2/8	1/8	1,0
Exsudato	7/8	2/8	0,041
Formação Polipoide	0/8	0/8	1,0
Edema Submucoso	7/8	5/8	0,569
Congestão Submucosa	7/8	7/8	1,0
Hemorragia	2/8	3/8	1,0
Aumento de Osteoblastos	8/8	8/8	1,0
Rinossinusite Crônica	8/8	3/8	0,026

* As variáveis com mais de dois níveis estão apresentadas em mediana.

** Para comparação de variáveis ordinais utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

Os dados microbiológicos da secreção coletada dos seios maxilares na 12^a semana pós-operatória estão expostos no Quadro 1, a seguir.

Quadro 1. Dados Microbiológicos.

Coelho	Técnica	Lado Oclusão	Lado Controle
01	Oclusão VTM	escherichia coli	bacilo gram negativo não fermentador
02	Oclusão VTM	bacilo gram negativo não fermentador	bacilo gram negativo não fermentador
03	Oclusão VTFN	bacilo gram negativo não fermentador	bacilo gram negativo não fermentador
04	Oclusão VTFN	bacilo gram negativo não fermentador	negativo
05	Oclusão VTM	Negativo	negativo
06	Oclusão VTFN	Negativo	negativo
07	Oclusão VTFN	- staphylococcus sp. coagulase negativo - bacilo gram negativo não fermentador	bacilo gram negativo não fermentador
08	Oclusão VTM	bacilo gram negativo não fermentador	bacilo gram negativo não fermentador
09	Oclusão VTFN	enterobacter sp.	negativo
10	Oclusão VTM	bacilo gram negativo não fermentador	bacilo gram negativo não fermentador
11	Oclusão VTFN	bacilo gram negativo não fermentador	bacilo gram negativo não fermentador
12	Oclusão VTFN	bacilo gram negativo não fermentador	negativo
13	Oclusão VTM	Negativo	bacilo gram negativo não fermentador
14	Oclusão VTM	bacilo gram negativo não fermentador	bacilo gram negativo não fermentador
15	Oclusão VTM	bacilo gram negativo não fermentador	bacilo gram negativo não fermentador
16	Oclusão VTFN	bacilo gram negativo não fermentador	negativo

5.5 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo era criar um modelo experimental consistente e reproduzível de RSC. Os resultados apresentados mostraram claramente que isso foi possível nos animais submetidos à técnica de oclusão direta do óstio via transmaxilar. Essa técnica levou à presença macroscópica de material (N-butil cianocrilato) no óstio, secreção evidente em 6 dos 8 seios manipulados, e hiperplasia da mucosa sinusal com infiltrado denso de células inflamatórias crônicas em todos os seios maxilares estudados. No grupo submetido ao acesso pelo teto da fossa nasal não houve a mesma consistência nos achados, com grande heterogeneidade tanto em relação às observações macroscópicas de secreção e material ocluindo o óstio quanto histopatológicas. Porém, a patogênese do modelo de RSC do presente trabalho difere da patogênese vista em humanos, uma vez que,

no primeiro, o processo iniciou-se diretamente no seio maxilar e pôde não se espalhar para a cavidade nasal devido à oclusão do óstio, enquanto, no segundo, a infecção geralmente se origina na cavidade nasal e se espalha para cavidades sinusais. Essa diferença inerente não afeta as conclusões específicas do presente estudo, mas deve ser lembrada para seus resultados não serem extrapolados descriteriosamente para a prática clínica, pois não se aplicam aos objetivos do trabalho.

Modelos animais existem desde o início do século passado e forneceram parte do conhecimento sobre rinosinusite disponível nos dias atuais. Os primeiros estudos foram feitos por Knowlton & McGregor, em 1928, utilizando cães (7). Em 1941, Hilding foi pioneiro na utilização de coelhos em cirurgias experimentais nos seios da face (8). A partir da década de 80, vários trabalhos utilizaram coelhos na indução de rinosinusite, com destaque aos realizados no Karolinska Institute, na Suécia. Com diversos artigos publicados na linha de pesquisa de modelos experimentais rinosinusais em coelhos, os pesquisadores suecos muito acrescentaram em avanços no entendimento sobre fisiopatologia da rinosinusite e, mais recentemente, da polipose (9), (10). Neste laboratório, Kumliem & Schiratzki (4) desenvolveram o primeiro estudo com seguimento mais longo, com o objetivo de descrever o fluxo sanguíneo na mucosa sinusal em três grupos: o de inoculação de *Streptococcus pneumoniae* e depósito de algodão na cavidade sinusal, o de depósito de algodão na cavidade sinusal e bloqueio do óstio com metacrilato e, finalmente, o de injeções de ovalbumina e bactérias com cateter. Houve, porém, uma grande heterogeneidade na medida temporal (5 semanas a 9 meses) ao definir RSC, sendo considerada somente quando sinais clínicos de rinosinusite eram observados e excluiu-se seis dos quinze animais do estudo (devido a dificuldades na

técnica para medir fluxo sanguíneo), diminuindo o entusiasmo na replicação desse modelo crônico. Em 1988, Johansson *et. al* (11) desenvolveram um modelo agudo mais detalhado de rinosinusite com o total de 69 coelhos, divididos em quatro grupos (oclusão do óstio com N-butil cianocrilato com inoculação de bactérias, oclusão do óstio sem inoculação de bactérias, inoculação de bactérias sem oclusão e introdução de N-butil cianocrilato na cavidade sinusal a fim de verificar se a presença do material provocaria uma sinusite química). No grupo do experimento que realizou o procedimento combinado, houve indução de rinosinusite aguda. Já a colocação isolada de N-butil cianocrilato na mucosa sinusal não provocou resultados histopatológicos compatíveis com sinusite química. Segundo os autores, a oclusão do óstio sem inoculação de bactérias também não foi suficiente para indução de rinosinusite em coelhos. Entretanto, um trabalho brasileiro (12), que visava comparar o desenvolvimento de rinosinusite aguda em quatro diferentes intervenções (preenchimento da cavidade nasal com esponja, obliteração do óstio através da instilação de cianocrilato em infundíbulo, instilação percutânea de sangue venoso em seio maxilar e instilação percutânea de toxóide estafilocócico e estreptocócico em seio maxilar), descreveu o desenvolvimento de rinosinusite em todos os casos, exceto na instilação de sangue periférico. Os achados discrepantes entre esses dois estudos foi uma das justificativas do presente estudo, para então se analisar os efeitos sobre a mucosa sinusal da obliteração do óstio do seio maxilar sem inoculação de bactérias, em um seguimento mais longo. No trabalho atual, verificou-se que essa técnica provocou achados histopatológicos compatíveis com RSC em todos os seios maxilares intervindos, corroborando o estudo brasileiro citado, apesar de o último visar a um modelo de doença inflamatória aguda.

A partir da década de 90, foram descritos experimentos para indução de rinosinusite com acesso através das fossas nasais, a fim de gerarem-se modelos rinogênicos. Hinni *et. al* (13) descreveram um modelo para estudar o movimento ciliar na rinosinusite aguda com um interessante acesso pela parede superior da fossa nasal para obstrução do óstio sinusal com cianocrilato, sem violação da cavidade do seio maxilar, seguido de inoculação direta com agulha (calibre 25) de bactérias ou solução salina através do mucoperiósteo do seio. Em 1997, Marks (14) foi enfático ao criticar os modelos com obstrução direta do óstio, argumentando que estes se baseavam em um modelo sinugênico da rinosinusite, quando o processo fisiopatológico parecia ser rinogênico. Dessa forma, desenvolveu rinosinusite através da inoculação de um corpo estranho na cavidade nasal juntamente com um agente patogênico (*S. pneumoniae*). Este autor considerou o modelo proposto viável para o estudo das sinusites, apesar de perda de quase 46%. Para testar um modelo crônico de rinosinusite, Kara *et. al* (2002) (15) obstruíram o óstio com esponja embebida em solução com *Staphylococcus*. No grupo em que o óstio foi obstruído com esponja estéril, não houve desenvolvimento de rinosinusite até a vigésima semana de observação. Na tentativa de criar um modelo com acesso via fossa nasal sem inoculação de bactérias, o presente estudo também não foi efetivo em criar uma homogeneidade nos achados compatíveis com RSC, não podendo ser considerado como um modelo fidedigno, baseando-se nos achados apresentados.

Vale ressaltar que nenhum animal, considerando os dois grupos, necessitou ser excluído do estudo, o que valoriza a possibilidade do modelo ser viável e replicável a futuras pesquisas.

O presente trabalho foi delineado primariamente para induzir alterações inflamatórias na mucosa sinusal na observação histopatológica, não sendo a

intenção dos autores estudarem a bacteriologia da RSC. Enquanto a rinosinusite aguda é infecciosa por natureza (2), acredita-se que a crônica é uma doença inflamatória multifatorial, na qual as bactérias têm seu papel bastante questionado.

Coelhos possuem uma significativa incidência de infecção natural dos seios paranasais, sendo a *Pasteurella multocida* o patógeno mais comum de coelhos de laboratório. A alta prevalência de crescimento bacteriano no fim do experimento, mesmo com tratamento para a pausterelose no seu início, pode se dever a contaminações cruzadas, uma vez que os animais ficaram em biotério próximo a outros coelhos durante os 3 meses de seguimento. Além disso, é interessante observar que o simples fato de ter havido crescimento bacteriano no lado controle na maioria dos casos não foi o suficiente para provocar alterações histopatológicas crônicas nesses seios. Já os casos com cultura negativa e histopatologia compatível com RSC não excluem uma possível participação das bactérias nessa fisiopatogenia, através de, por exemplo, biofilmes, não estudados nesse modelo. Um aspecto passível de crítica seria a ausência do estudo de biofilmes neste trabalho, visto que se está diante de um modelo crônico e, talvez, os biofilmes, mais que o crescimento de bactérias no exame cultural, estejam implicados na fisiopatologia. Entretanto, futuros trabalhos envolvendo biofilmes podem ser desenvolvidos nessa linha de pesquisa, utilizando-se o modelo que obteve sucesso na indução de RSC.

Além disso, o presente modelo pode não ser o ideal pela incapacidade de reverter o quadro crônico gerado. Todavia, viabiliza com consistência a geração de material celular tipicamente crônico, através do qual aprofundamentos no conhecimento das relações intercelulares e intracelulares poderão trazer reais avanços no diagnóstico e manejo dessa doença.

5.6 CONCLUSÕES

Neste estudo experimental foi possível demonstrar que coelhos submetidos à oclusão do óstio do seio maxilar via transmaxilar com N-butil cianocrilato sem inoculação de bactérias desenvolveram achados histopatológicos compatíveis com rinosinusite crônica. Já a técnica de oclusão do meato médio via teto de fossa nasal com N-butil cianocrilato sem inoculação de bactérias não obteve resultados consistentes em produzir RSC neste trabalho. A técnica que obteve sucesso pode ser uma ótima opção como ponto de partida para o estudo celular mais detalhado da mucosa sinusal na RSC, a ser aplicado no futuro. Sem dúvida, diversos estudos, nas mais diferentes linhas de pesquisa, incluindo imunopatogênese e biologia celular, são necessários para o aprofundamento nos conhecimentos a respeito da fisiopatologia e do tratamento da RSC.

5.7 AGRADECIMENTOS E FONTES DE FINANCIAMENTO

Os autores agradecem a toda equipe da Unidade de Experimentação Animal e aos alunos da Faculdade de Medicina que colaboraram para a execução do estudo. Esse projeto foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA.

5.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khalid, A. N, Hunt, J., Perloff, J. R., Kennedy, D. W. The Role of Bone in Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2002; 112(11):1951–7.
2. Diretrizes Brasileiras de Rinosinusites. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2008; 74(2):6–59.

3. Kariyawasam HH, Scadding GK. Chronic rhinosinusitis: therapeutic efficacy of anti-inflammatory and antibiotic approaches. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011; 3(4):226–35.
4. Kumlien J, Schiratzki H. Blood flow in the rabbit sinus mucosa during experimentally induced chronic sinusitis. Measurement with a diffusible and with a non-diffusible tracer. *Acta Otolaryngol.* 1985; 99(5-6):630–6.
5. Spilki F. R. Um surto de Pasteurelose em coelhos mantidos em biotério. *Acta Scientiae Veterinariae.* 2002; 30:131–4.
6. Schlosser RJ, Spotnitz WD, Peters EJ, Fang K, Gaston B, Gross CW. Elevated nitric oxide metabolite levels in chronic sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000; 123(4):357–62.
7. Knowlton CD, McGregor GW. How and when the mucous membrane of the maxillary sinus regenerates: an experimental study in the dog. *Arch Otolaryngol.* 1928; 8(6):647–56.
8. Hilding A. Experimental sinus surgery: effects of operative windows on normal sinuses. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1941; 50:379–92.
9. Norlander T, Fukami M, Westrin KM, Stierna P, Carlsöö B. Formation of mucosal polyps in the nasal and maxillary sinus cavities by infection. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993; 109(3 Pt 1):522–9.
10. Norlander T, Westrin KM, Fukami M, Stierna P, Carlsöö B. Experimentally induced polyps in the sinus mucosa: a structural analysis of the initial stages. *Laryngoscope.* 1996; 106(2 Pt 1):196–203.
11. Johansson P, Kumlien J, Söderlund K, Hultman E. Experimental acute sinusitis in rabbits. Energy metabolism in sinus mucosa and secretion. *Acta Otolaryngol.* 1988; 106(5-6):460–7.
12. Costa HO, Ruschi e Luchi GE, Augusto AG, Castro M, de Souza FC. Comparative study of several sinusitis experimental modelling techniques in rabbits. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007; 73(5):627–31.
13. Hinni ML, McCaffrey TV, Kasperbauer JL. Early mucosal changes in experimental sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992; 107(4):537–48.
14. Marks SC. Acute sinusitis in the rabbit: a new rhinogenic model. *Laryngoscope.* 1997; 107(12 Pt 1):1579–85.
15. Kara CO, Cetin CB, Colakoğlu N, Sengül M, Pakdemirli E. Experimentally induced rhinosinusitis in rabbits. *J Otolaryngol.* 2002; 31(5):294–8.

6 ARTIGO EM INGLÊS

Experimental Model of Chronic Rhinosinusitis in Rabbits without Bacterial Inoculation: Comparison of Induction Techniques

Raphaella de Oliveira Migliavacca¹, Otávio Bejzman Piltcher², Lúcia Maria Kliemann³, Marcelle Reesink Cerski³, Fabíola Meyer⁴, Sady Selaimen da Costa¹⁻²

6.1 ABSTRACT

Experimental models have an important role in understanding the mechanisms involved in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis (CRS). **Objectives:** To demonstrate that, without the inoculation of pathogenic bacteria, it is possible to induce chronic histological changes in the maxillary sinuses of rabbits secondary to sinus ostium obstruction, producing a consistent and reproducible experimental model for CRS. Secondly, to compare inflammatory findings between two techniques of experimental occlusion of the maxillary sinus ostium with N-butyl cyanoacrylate: transmaxillary and through the roof of the nasal cavity. **Methods:** In a randomized, blinded, experimental study, 16 New Zealand rabbits were assigned for occlusion of

¹ Graduate Program in Surgery, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

² Department of Otolaryngology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Department of Patology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴ Experimental Animal Unit in the Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

the right maxillary sinus through a transmaxillary approach or through the roof of the nasal cavity. The contralateral sinus was left undisturbed to serve as a control. After 12 weeks of follow-up, the animals were anesthetized and sacrificed for blinded histopathological analysis of the maxillary sinus mucosa. **Results:** Histopathological changes consistent with CRS were found in eight (100%) of the maxillary sinuses approached transmaxillary and three of those approached through the roof of the nasal cavity (37.5%), p 0.008 and 0.250, respectively, comparing the right to the left control sinus. Comparing the occlusion techniques, the transmaxillary approach was more consistent in causing chronic mucosal changes (p 0.026). **Conclusions:** The proposed model was successful in causing histological changes compatible with CRS in animals subjected to sinus occlusion with a transmaxillary approach followed-up for 12 weeks. This experimental model can be easily replicated for future cellular studies of the sinus mucosa.

Key words: rhinosinusitis, chronic rhinosinusitis, experimental model, rabbits.

6.2 INTRODUCTION

The prevalence of infectious and inflammatory airway diseases is extremely high in the general population. The impact of these diseases on the quality of life is evident and relevant, especially in chronic cases. According to U.S. statistics, chronic rhinosinusitis (CRS) affects approximately 30 million American individuals and generates a cost of \$ 6 billion annually (1). In Brazil, despite being recognized as one of the most common disorders of the upper airways, there is a lack of well-designed epidemiological studies on sinusitis.

CRS is defined as an inflammatory process that affects the mucous membrane that lines the nasal cavity and paranasal sinuses for a period exceeding twelve weeks (2).

The evolutionary changes that led man to an upright posture caused sinus ventilation and drainage to occur against gravity and to depend on the patency of the ostiomeatal complex. Thus, processes that compromise patency act as predisposing factors to the development of rhinosinusitis (3). However, the primary factors in the pathogenesis of CRS are multiple and sometimes obscure. Apparently, the process is exacerbated when the ostiomeatal complex becomes obstructed causing persistent inflammatory changes, with mucociliary dysfunction and stasis of secretions, as well as inability to clear pathogens (bacteria and fungi) (1), (4).

Thus, while we know that CRS has a high prevalence, there is still much to understand about the pathogenesis of rhinosinusitis and its categorization, in order to reduce inappropriate practices and to establish a more accurate diagnosis and treatment.

In this context, experimental models have an important role. Many animal models have proven useful in revealing information to study craniofacial, otologic and sinus diseases. Specifically in relation to the study of rhinosinusitis, the rabbit model is the most widely used. The maxillary sinus of rabbits resembles that of humans in many ways: a well-defined ostium, a wide and accessible cavity, and a mucociliary system with comparable features (5). Most studies that focus on experimental models of rhinosinusitis associate maxillary sinus ostium occlusion with the inoculation of bacteria. Moreover, most studies have a short follow-up period, usually days, so that their findings can only be extrapolated for acute rhinosinusitis.

Thus there is a need to establish experimental models of induced chronic rhinosinusitis, applying well-detailed and replicable methods. Additionally, in regard to

the final outcome of chronic inflammation, there are few studies in the literature without bacterial inoculation comparing experimental models to study CRS. The aim of the present study was to demonstrate the ability to induce chronic histological changes, without bacterial inoculation, in the maxillary sinuses of rabbits by means of the obstruction of drainage through the ostium, producing a consistent and reproducible experimental model of CRS. Secondly, we compared the inflammatory findings resulting from the two techniques of maxillary sinus ostium occlusion with N-butyl cyanoacrylate: transmaxillary and through the roof of the nasal cavity.

6.3 METHODS

We performed a randomized, blinded, experimental study, with laboratory animals, at the Experimental Animal Unit in the Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Sample size was determined through literature review and pilot studies, in which a success rate of sinus occlusion and induction of rhinosinusitis was estimated as 80% in each group. Considering a statistical power of 80%, a sample size of seven rabbits in each arm was calculated. We added one rabbit to each group due to the potential risk of losing an animal throughout the study.

Sixteen male New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), aged around 120 days and weighing 2700-3500 g, were allocated to the study.

Exclusion criteria were the following: (1) identification of pus in the maxillary sinus during surgery, after opening the mucosa; (2) presence of sinus mucosal hyperplasia with an infiltrate of inflammatory cells in the histopathological analysis of

the biopsy performed during maxillary sinus ostium occlusion, defining a rhinosinusitis; (3) death of the animal during the study.

6.3.1 Preoperative procedures

The rabbits arrived at the Unit of Animal Experimentation at least three days before surgery for a period of adaptation, when the first intramuscular injection of oxytetracycline (20 mg/kg) was applied; in an interval of three days, a second dose of antibiotic prophylaxis was administered. This drug was given due to the high prevalence of *Pasteurella multocida* and the possibility of subclinical infection. The choice of antibiotic and dosage was based on a previous study conducted in Rio Grande do Sul, Brazil (6).

Sixteen sealed envelopes were prepared by a blinded research assistant to select the order of procedures. Rabbits were randomly assigned to two groups, based on the technique of occlusion of the maxillary sinus ostium with N-butyl cyanoacrylate: transmaxillary (TM group) or through the roof of the nasal cavity (RNC group). The randomization scheme was generated using the website randomization.com (<http://www.randomization.com>) (Figure 1).

6.3.2. Anesthesia

Pethidine 5mg/kg, midazolam 1mg/kg, and ketamine 15 mg/kg were administered in the same syringe intramuscularly as premedication, in order to facilitate the handling of animals and the induction of anesthesia. After 10 minutes, the nasal dorsum was shaved and the animal was taken to the operating room. Prior

to anesthetic induction, animals received 100% oxygen and had their heart rate and oxygen consumption monitored. Once the animal stabilized, we initiated the continuous supply of 5V% isoflurane until suppression of the paw withdrawal reflex. Rabbits were then intubated with an endotracheal tube number 3.0, and left breathing spontaneously with a T-piece system and supply of isoflurane 2 - 3V%.

Animals were sterilized with iodine and placed in the surgical field, where they also received infiltration of local anesthetics (bupivacaine 1.5 mg/kg and lidocaine 2 mg/kg).

Postoperative analgesia was standardized with tramadol 2mg/kg, at every 12 hours, for 2 days. No antibiotics were used postoperatively.

6.3.3 Surgical procedure

Surgical materials included an electric drill with cutting edges, an operating microscope (Vasconcelos, DF Vasconcelos, São Paulo, SP, Brazil), and sterile surgical supplies. All procedures were performed by the same surgeon (first author). After intubation, a sealed envelope was opened to verify the procedure to be performed. Rabbits were randomly assigned to the following groups:

Transmaxillary group (TM group): occlusion of the right maxillary sinus ostium, approached through the maxillary sinus, under direct visualization. Following aseptic procedures (Figure 2A), the maxillary sinus was approached through a vertical incision of approximately 4 cm in the midline of the nasal dorsum, using a No. 15 blade, without reaching the periosteum. Then, a periosteal flap was elevated and fixed with 3.0 mononylon for exposure of the maxillary bone (Figure 2B).

A small opening of 4-5mm was drilled on the upper maxillary sinus, preserving the underlying mucosa. Before opening the maxillary sinus mucosa, a 3-mL syringe filled with air was used to test for movement of the mucosa and hence ostial permeability (Figure 2D). Then, the mucosal layer was incised with a scalpel, opening the right maxillary sinus and allowing the visualization of the mucosal surface, checking for the presence of possible secretions and the identification of the ostium (Figure 3). Next, the ostium was occluded using subcutaneous tissue from the same animal (5 x 3 mm) and two drops of N-butyl cyanoacrylate (Vetbond®, 3M, St. Paul, MN, USA). The sinus mucosa was then biopsied (Figure 4). The periosteal flap was repositioned and the air syringe test was repeated to observe for any movement, which would indicate the need to reposition the material for effective occlusion. Finally, the wound was closed in layers with vicryl 4-0 and 3-0 monofilament nylon.

Roof of the nasal cavity group (RNC group): occlusion of the right middle meatus and visualization through the roof of the nasal cavity. The initial surgical approach, flap design, drilling (without disruption of the mucosa), and test of ostium permeability were performed similarly as described for the TM Group (Figure 2). Then, the nasal septum and the nasal cavity were seen by transparency, and this space was drilled. The lower and inner corner of the ipsilateral eye was established as the upper reference point (3 medial cm) (Figure 5). After drilling, the endoturbinate (similar to middle turbinates in humans) was exposed and placed medially. The ostium of the maxillary sinus was identified and occluded with subcutaneous tissue removed from the same animal (5x3mm) and two drops of N-butyl cyanoacrylate. The air syringe test was performed to check for any movement of the right maxillary sinus mucosa. Then the sinus was opened with a scalpel for biopsy, followed by closure in layers, as described for the TM group.

No procedure was performed on the left side in both groups at the time.

6.3.4 Follow-up

The animals remained in the Unit of Animal Experimentation under veterinary care for 12 weeks. Throughout this period they were kept in separate, numbered cages, in controlled room temperature ($21^{\circ}\text{C} + / - 1^{\circ}\text{C}$), in a relatively noise and stress free environment, with food and water *ad libitum*. Weekly data sheets were used to register the postoperative follow-up period, recording the overall status of animals, food refusal, and wound appearance.

6.3.5 Animal killing

Animals were sedated with midazolam (1 mg/kg) and ketamine (15 mg/kg), followed by the administration of an overdose of propofol (15 mg/kg). Finally, an injection of 5 ml of potassium chloride 10% was used to cause cardiac arrest 12 weeks after the occlusion procedure.

6.3.6 Histopathological study

After skin removal, a coronal section was made from the lower edge of the eyeball up to 1.5 cm of the anterior maxilla. Samples were washed in running water and placed in 10% formalin for 72 hours and, then, in 10% nitric acid for 24 hours for decalcification. Samples were cut in 5 mm-thick slices for examination; slices representing each maxillary sinus (right and left) and its respective ostium were

selected for photography and analysis. At this point, samples were properly identified as right or left, and again washed in running water and placed in 70% alcohol. Subsequent steps in the tissue processing protocol included alcohol dehydration (in six alcohols), clearing in xylol (2 immersions), and mounting in paraffin. Paraffin blocks were cut in 5 μm sections with a microtome (Leica RM 2155) and stained with hematoxylin-eosin.

Stained slides were observed under an optic microscope (Olympus, BX41) by two pathologists blinded to the intervention. For this purpose, the slides were randomly numbered by randomization.

6.3.7 Microbiological study

Immediately after the death of each animal, material was collected directly from each maxillary sinus through the osteotomy and cultured in liquid culture media (BacT / ALERT $\text{\textcircled{R}}$, Biomerieux, Durham, NC, USA).

6.3.8 Analysis of histopathological variables

Two variables were assessed in the macroscopic post-mortem examination of animals: the presence of material occluding the ostium of the maxillary sinus and of retained secretion in the sinus. These variables were analyzed and photographed after decalcification and were categorized as yes or no by investigators blinded to group assignment.

The following variables were dichotomically categorized (yes or no) for the histopathological analysis: (I) lymphoplasmacytic infiltrate, (II) neutrophilic infiltrate,

(III) mucosal hyperplasia, (IV) goblet cell hyperplasia, (V) epithelial detachment, (VI) focal ulceration of the mucosa, (VII) inflammatory exudate / pus, (VIII) polypoid formation, (IX) submucosal edema, (X) vascular congestion of submucosal vessels, (XI) osteoblast increase (> 4 by bone trabecula), (XII) chronic sinusitis (hyperplasia of sinus mucosa with dense infiltrate of chronic inflammatory cells) (1), (XIII) atrophy, (XIV) metaplasia, (XV) granulation tissue (XVI), fibrosis (XVII), and hemorrhage. Based on previously published work on CRS in rabbits (7), scores from 0 (absent) to 4 (most severe) were additionally applied to variables (I), (II), (III), (IV); we also assessed the presence or absence of ciliary loss in the maxillary sinus mucosa and its level (0-4) (See Annex 3).

We also described the bacterial isolates found in each maxillary sinus.

6.3.9 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 17.0 (Somers, NY). Categorical variables were expressed as proportions or median and interquartile ranges (ordinal variables). McNemar's exact test was used to test the difference between proportions, except for variables with more than two levels, when the Wilcoxon test was used. Fisher's exact test was used to compare differences between surgical techniques in dichotomous categorical variables and the Mann-Whitney test for ordinal variables. Both Kappa index and percentage of agreement were used to verify interobserver agreement for histopathological variables.

6.3.10 Ethical aspects

All procedures in this study met the criteria, technical standards and ethical principles established by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science. The study protocol was approved under the number 110292 by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA / HCPA), the Institutional Review Board, and the National Commission on Research Ethics (CONEP).

6.4 RESULTS

None of the animals presented criteria to be excluded from the study; thus, eight rabbits underwent right ostial obstruction with the transmaxillary approach and eight with the RNC technique.

Twelve weeks after surgery and death of animals, a coronal cut was made through the paranasal sinuses to check for the presence of macroscopic material occluding the right maxillary sinus ostium. This was found in 8 rabbits in the TM group, with visualization of frank purulent drainage in the right maxillary sinuses of 6 of 8 rabbits (Figure 6). In the RCN group, presence of occluding material, accompanied by purulent drainage, was evident in the right maxillary sinus ostium of 5 rabbits (Figure 7A); partial or questionable occlusion was present in 2 (Figure 7B) and one animal had no signs of secretion in the maxillary sinus ostium (Figure 7C).

Histological changes compatible with CRS (hyperplasia of sinus mucosa with dense infiltrate of chronic inflammatory cells) were found in the mucosa of the right maxillary sinus of eight rabbits (100%) that underwent occlusion through the transmaxillary approach (Figure 8), with statistical significance when compared to the

control side (p 0.008), as seen in table 1. Three right maxillary sinuses (37.5%) of rabbits submitted to occlusion with the RNC approach showed signs of CRS (Figures 9 and 10). Control plates, representing the opposite side of the occlusion, showed normal (Figure 11) or atrophic mucosa (Figure 12), and absence of any findings consistent with CRS. Table 1 shows the histopathological findings for the two groups. Comparing the occlusion techniques (Table 2), the TM approach proved to be more consistent in causing chronic changes in the mucosa of the occluded maxillary sinuses (p 0.026). The median Kappa agreement among pathologists was 0.67 for the occluded side and 0.74 for the control side. The median percentage of agreement among pathologists was 88%.

Microbiological data of the maxillary sinus secretions collected at 12 postoperative weeks are shown in Chart 1.

6.5 DISCUSSION

The main goal of this study was to create a consistent and reproducible experimental model of CRS. The results showed clearly that this was possible in animals submitted to direct ostium obstruction through a transmaxillary approach. This technique led to the identification of macroscopic material (N-butyl cyanoacrylate) in the ostium, evident drainage in six of eight manipulated sinuses and mucosal hyperplasia with a dense infiltrate of chronic inflammatory cells in all studied maxillary sinuses. Comparatively, the group submitted to an approach through the roof of the nasal cavity did not show the same consistency in findings, with considerable heterogeneity in the macroscopic observations and histopathological features. However, the rabbit model of chronic sinusitis of the

present study differs from the presumed pathogenesis of chronic rhinosinusitis seen in human: the infection usually originates in the nasal passages and spreads to the paranasal sinuses. This is an inherent difference that may not affect the conclusions drawn from the study, but it must be kept in mind in order to not extrapolate without strict criteria.

Since the beginning of the last century, experimental animal models have contributed to our current knowledge of rhinosinusitis. The first studies were performed by McGregor & Knowlton, in 1928, using dogs (8). In 1941, Hilding pioneered the use of rabbits in experimental sinus surgery (9). From the 1980's, several experimental rabbit models of rhinosinusitis were developed, especially at the Karolinska Institute in Sweden. With several articles published on the subject, the Swedish researchers have added much to advances in understanding the pathophysiology of rhinosinusitis and, more recently, of polyposis (10), (11). In this lab, Kumliem & Schiratzki (5) developed the first study with a longer follow-up to describe blood flow in the sinus mucosa in three different groups: inoculation of *Streptococcus pneumoniae* and use of a cotton pledget placed in the sinus cavities; cotton pledged in the sinus cavity and obstruction of the ostium with methacrylate; and injection of ovalbumin and bacteria with a catheter. However, there was much heterogeneity in the time to define CRS (5 weeks to 9 months), which was considered only when clinical signs of sinusitis were observed. Additionally, six of the 15 animals were excluded from the original study (due to technical difficulties in measuring blood flow), reducing the enthusiasm for the replication of this chronic model. In 1988, Johansson et al (12) developed a more detailed model of acute sinusitis with a total of 69 rabbits divided into four groups (ostial obstruction with N-butyl cyanoacrylate and inoculation of bacteria; ostial obstruction without inoculation

of bacteria; inoculation of bacteria without obstruction; and injection of N-butyl cyanoacrylate to investigate whether it could provoke chemical sinusitis). The experimental group assigned to the combined procedure developed acute rhinosinusitis. Administration of N-butyl cyanoacrylate did not induce histopathological findings suggestive of chemical sinusitis. According to the authors, ostial obstruction without bacterial inoculation was not sufficient to induce sinusitis in rabbits. However, a Brazilian study (13) which aimed to compare the development of acute rhinosinusitis with four different interventions (surgical sponge filling the nasal cavity; ostial obstruction with the instillation of cyanoacrylate into the infundibulum; percutaneous instillation of venous blood into the maxillary sinus; and percutaneous instillation of streptococcal and staphylococcal toxoid in the maxillary sinus) described the development of sinusitis in all groups, except with the instillation of peripheral blood. Discrepant findings between these two studies was one of the justifications for analyzing, in the current study, the effects of obliteration without bacterial inoculation in a longer follow-up period. In the present work, we found that this technique, when used a transmaxillary approach, resulted histopathological findings compatible with CRS in all maxillary sinuses, in agreement with the Brazilian report discussed above, although the latter focused on a model of acute inflammatory disease.

Since the 1990's, techniques to experimentally induce sinusitis with access through the nasal fossa have been described. Hinni et al (14) described a model for studying ciliary movement in acute rhinosinusitis with an interesting access through the upper wall of the nasal cavity and obstruction of the sinus ostium with cyanoacrylate, without violation of the maxillary sinus cavity. This was followed by direct bacterial or saline inoculation (25-gauge needle) through the mucoperiosteal

layer. In 1997, Marks (15) was emphatic in criticizing the models of direct ostial obstruction, arguing that they were based on a sinusogenic model of rhinosinusitis, when the pathophysiological process was related to the nasal component. This author then developed a model of rhinosinusitis by inoculating a foreign body in the nasal cavity along with a pathogen (*S. pneumoniae*). He considered this model feasible for the study of sinusitis, despite a loss of almost 46% of the original sample. To test a model of chronic rhinosinusitis, Kara et al (2002) (16) packed the nose with a sponge soaked in a solution containing *Staphylococcus*. In the group in which the ostium was occluded with sterile sponge, no evidence of sinusitis was seen until the twentieth week of observation. In an attempt to create an experimental model with access through the nasal cavity without bacterial inoculation, the present study was also not effective in generating homogeneous findings consistent with CRS. Thus, based on the findings presented, this technique cannot be considered a reliable model.

It is noteworthy that no animal had to be excluded from the study, considering the two groups, suggesting that this is a feasible and reproducible model for future studies.

The present study was designed primarily to induce inflammatory changes in the sinus mucosa for histopathological observation; clearly, it was not the intention of the authors to study the bacteriology of CRS. While the nature of acute sinusitis is infectious (2), the disease is thought to result from a multifactorial inflammatory process, in which bacteria have an undefined role. Rabbits have a significant incidence of natural infection of paranasal sinuses, and *Pasteurella multocida* is the most common pathogen in laboratory rabbits. The high prevalence of bacterial growth by the end of the experiment, despite initial treatment for pausterelose, can be

due to cross contamination, since animals were housed near other rabbits during the 3 months of follow-up. Moreover, it is interesting to note that the bacterial growth observed on the control side in most cases was not enough to cause chronic histological changes in these sinuses. On the other hand, in animals with negative cultures and histopathological findings compatible with CRS, it is not possible to exclude the role of bacteria in this pathogenesis (as biofilms, for example, which were not investigated in this model). This is a potential limitation of our study: since we are dealing with a chronic model, perhaps biofilms, rather than bacterial growth, are implicated in the pathophysiology of CRS. Nevertheless, further studies investigating the role of biofilms can be based on the current model, which has proven successful in inducing CRS.

Furthermore, this model was also limited by the impossibility of reverting the chronic condition produced. However, it represents a consistent model for the generation of typically chronic cellular material, through which our knowledge of the intracellular and intercellular relationships can be advanced, bringing real progresses in the diagnosis and management of this disease.

6.6 CONCLUSIONS

In this experimental study we found that rabbits submitted to a transmaxillary occlusion of the maxillary sinus ostium with N-butyl cyanoacrylate without bacterial inoculation developed histopathological findings compatible with chronic rhinosinusitis. On the other hand, the approach through the roof of the nasal cavity to occlude the middle meatus with N-butyl cyanoacrylate without bacterial inoculation did not produce consistent results. The successful technique represents an excellent

starting point for more detailed future cellular studies of the sinus mucosa in CRS. Undoubtedly, several studies in different research areas, including immunopathogenesis and cell biology, are needed to deepen our knowledge about the pathophysiology and treatment of CRS.

6.7 ACKNOWLEDGMENTS AND FINANCIAL SUPPORT

The authors thank all the staff at the Unit of Animal Experimentation and the medical students who contributed to the implementation of the study. This project received financial support from the Hospital Research and Events Incentive Fund (FIPE/HCPA).

6.8 REFERENCES

1. Khalid, A. N, Hunt, J., Perloff, J. R., Kennedy, D. W. The Role of Bone in Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2002; 112(11):1951–7.
2. Diretrizes Brasileiras de Rinossinusites. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2008; 74(2):6–59.
3. Kariyawasam HH, Scadding GK. Chronic rhinosinusitis: therapeutic efficacy of anti-inflammatory and antibiotic approaches. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2011; 3(4):226–35.
4. Kumlien J, Schiratzki H. Blood flow in the rabbit sinus mucosa during experimentally induced chronic sinusitis. Measurement with a diffusible and with a non-diffusible tracer. *Acta Otolaryngol*. 1985; 99(5-6):630–6.
5. Spilki F. R. Um surto de Pasteurelose em coelhos mantidos em biotério. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2002; 30:131–4.
6. Schlosser RJ, Spotnitz WD, Peters EJ, Fang K, Gaston B, Gross CW. Elevated nitric oxide metabolite levels in chronic sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000; 123(4):357–62.
7. Knowlton CD, McGregor GW. How and when the mucous membrane of the maxillary sinus regenerates: an experimental study in the dog. *Arch Otolaryngol*. 1928; 8(6):647–56.

8. Hilding A. Experimental sinus surgery: effects of operative windows on normal sinuses. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1941; 50:379–92.
9. Norlander T, Fukami M, Westrin KM, Stierna P, Carlsöö B. Formation of mucosal polyps in the nasal and maxillary sinus cavities by infection. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993; 109(3 Pt 1):522–9.
10. Norlander T, Westrin KM, Fukami M, Stierna P, Carlsöö B. Experimentally induced polyps in the sinus mucosa: a structural analysis of the initial stages. *Laryngoscope*. 1996; 106(2 Pt 1):196–203.
11. Johansson P, Kumlien J, Söderlund K, Hultman E. Experimental acute sinusitis in rabbits. Energy metabolism in sinus mucosa and secretion. *Acta Otolaryngol*. 1988; 106(5-6):460–7.
12. Costa HO, Ruschi e Luchi GE, Augusto AG, Castro M, de Souza FC. Comparative study of several sinusitis experimental modelling techniques in rabbits. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2007; 73(5):627–31.
13. Hinni ML, McCaffrey TV, Kasperbauer JL. Early mucosal changes in experimental sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992; 107(4):537–48.
14. Marks SC. Acute sinusitis in the rabbit: a new rhinogenic model. *Laryngoscope*. 1997; 107(12 Pt 1):1579–85.
15. Kara CO, Cetin CB, Colakoğlu N, Sengül M, Pakdemirli E. Experimentally induced rhinosinusitis in rabbits. *J Otolaryngol*. 2002; 31(5):294–8.

6.9 TABLES AND FIGURES

Table 1. Macroscopic and histopathologic data comparison between occluded side and control side (McNemar test for exact method except *).

	Transmaxillary approach			Roof of the nasal cavity approach		
	Occlusion side	Control side	P	Occlusion side	Control side	P
Macroscopic occlusion	8/8	0/8	0,008	5/8 (total) 2/8 (semi)	0/8	0,45**
Macroscopic discharge	6/8	2/8	0,125	5/8	0/8	0,63

Atrophy	1/8	2/8	1,0	1/8	1/8	1,0
Metaplasia	0/8	0/8	1,0	0/8	0/8	1,0
Mucosal hyperplasia	7/8	1/8	0,031	2/8	2/8	1,0
Goblet cell hyperplasia	7/8	1/8	0,031	3/8	4/8	1,0
Goblet cell hyperplasia level	1 (1,0-1,75)*	0 (0-0)*	0,094**	0 (0-1,0)*	0,5 (0-1,0)	1,0**
Epithelial detachment	4/8	6/8	0,625	3/8	3/8	1,0
Focal ulceration of the mucosa	4/8	1/8	0,25	1/8	0/8	1,0
Focal ulceration of the mucosa level	0,50 (0,0-1,75)*	0,0 (0,0-0,0)*	0,25**	0,0 (0,0-0,0)*	0,0 (0,0-0,0)*	1,0**
Ciliary loss	6/8	5/8	1,0	4/8	4/8	1,0
Ciliary loss level	1 (0,25-1)*	1 (0-1)*	0,75**	0,5 (0-1,75)*	0,5 (0-1)*	0,5**
Neutrophilic infiltrate	3/8	0/8	0,25	2/8	0/8	0,500
Neutrophilic infiltrate level	0 (0-1)*	0 (0-0)*	0,25**	0 (0-0,75)*	0 (0-0)*	0,5**
Lymphoplasmacytic infiltrate	8/8	3/8	0,063	7/8	4/8	0,250
Lymphoplasmacytic infiltrate level	2 (2-3)*	0 (0-1)*	0,023**	1 (1-1,75)*	0,5 (0-1)*	0,25**
granulation tissue	0/8	0/8	1,0	1/8	0/8	1,0
Fibrosis	2/8	0/8	0,500	1/8	0/8	1,0
Inflammatory exudate / pus	7/8	0/8	0,016	2/8	0/8	0,500
Polypoid formation	0/8	0/8	1,0	0/8	0/8	1,0
Submucosal edema	7/8	4/8	0,250	5/8	4/8	1,0
Vascular congestion of submucosal vessels,	7/8	6/8	1,0	7/8	5/8	0,500
Hemorrhage	2/8	1/8	1,0	3/8	1/8	0,500
Osteoblast increase	8/8	4/8	0,125	8/8	5/8	0,250
Chronic sinusitis	8/8	0/8	0,008	3/8	0/8	0,250

* Variables with more than two levels are described as median and percentile 25 and 75 (in parentheses)

** For comparison of variables with more than two levels was used the Wilcoxon test

Table 2. Data comparison between techniques in the right maxillary sinus (intervention) (Fisher's exact test).

	Transmaxillary approach	Roof of the nasal cavity approach	P
Macroscopic occlusion	8/8	5/8 2/8 (semi)	0,2
Macroscopic discharge	6/8	5/8	1,0
Mean minutes per surgery	41	51	0,2
Atrophy	1/8	1/8	1,0
Metaplasia	0/8	0/8	1,0
Mucosal hyperplasia	7/8	2/8	0,041
Goblet cell hyperplasia	7/8	3/8	0,119
Goblet cell hyperplasia level	1,0*	0,0*	0,105**
Epithelial detachment	4/8	3/8	1,0
Focal ulceration of the mucosa	4/8	1/8	0,282
Focal ulceration of the mucosa level	0,50*	0,0*	0,195**
Ciliary loss	6/8	4/8	0,608
Ciliary loss level	1,0*	0,5*	0,645**
Neutrophilic infiltrate	3/8	2/8	1,0
Neutrophilic infiltrate level	0*	0*	0,798**
Lymphoplasmacytic infiltrate	8/8	7/8	1,0
Lymphoplasmacytic infiltrate level	2,0*	1,0*	0,038**
Granulation tissue	0/8	1/8	1,0
Fibrosis	2/8	1/8	1,0
Inflammatory exudate / pus	7/8	2/8	0,041
Polypoid formation	0/8	0/8	1,0
Submucosal edema	7/8	5/8	0,569
Vascular congestion of submucosal vessels,	7/8	7/8	1,0
Hemorrhage	2/8	3/8	1,0
Osteoblast increase	8/8	8/8	1,0
Chronic sinusitis	8/8	3/8	0,026

* The variables with more than two levels are presented as median

** For comparison of ordinal variables it was used the Mann-Whitney test

Chart 1. Microbiological data.

Rabbit	Approach	Occlusion side	Control side
01	TM group	escherichia coli	gram negative bacillus
02	TM group	gram negative bacillus	gram negative bacillus
03	RNC group	gram negative	gram negative bacillus
04	RNC group	gram negative bacillus	negative
05	TM group	negative	negative
06	RNC group	negative	negative
07	RNC group	- staphylococcus sp. coagulase negative - gram negative bacillus	gram negative bacillus
08	TM group	gram negative bacillus	gram negative bacillus
09	RNC group	enterobacter sp.	negative
10	TM group	gram negative bacillus	gram negative bacillus
11	RNC group	gram negative bacillus	gram negative bacillus
12	RNC group	gram negative bacillus	negative
13	TM group	negative	gram negative bacillus
14	TM group	gram negative bacillus	gram negative bacillus
15	TM group	gram negative bacillus	gram negative bacillus
16	RNC group	gram negative bacillus	negative

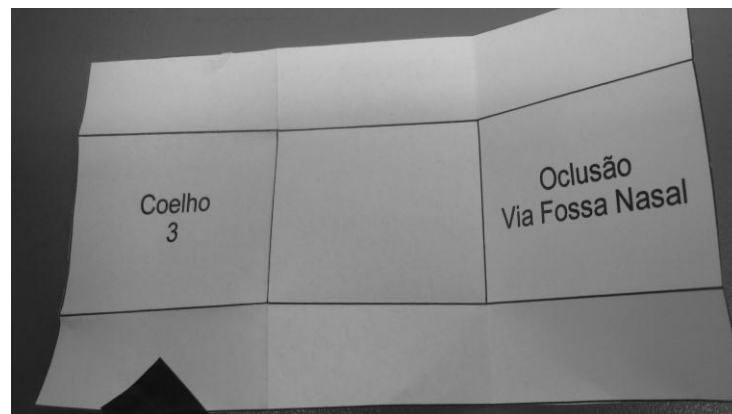
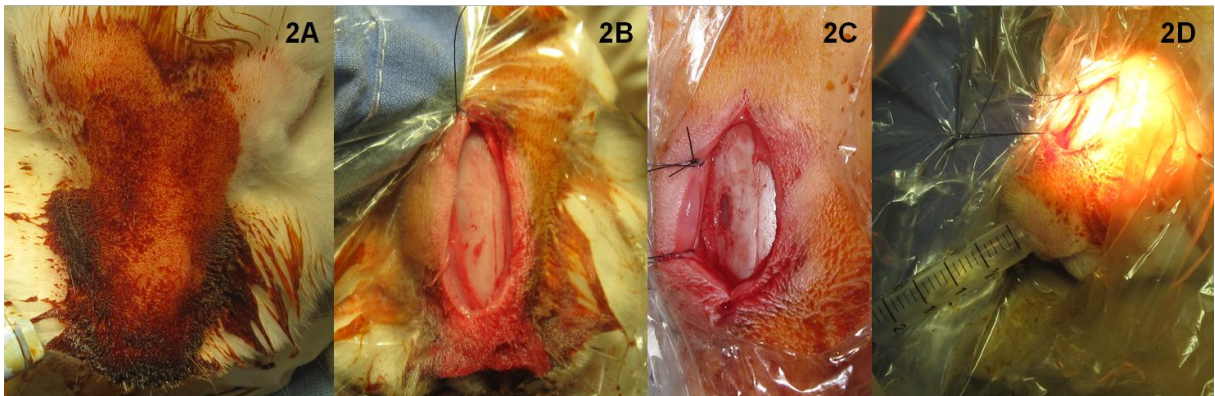
Figure 1. Sealed envelope containing the procedure to be performed, opened after anesthetic induction.

Figure 2. Sequence of procedure performed in all cases.



Antisepsis (figure 2A); access and exposure of the maxillary bone, with visualization of septum, nasal cavities and maxillary sinus by transparency (figure 2B); fenestration of 4-5 mm in the upper half of maxillary sinus without disruption of the underlying mucosa (figure 2C); the test of ostium patency (Figure 2D).

Figure 3. The aspect of the lumen and mucosa of the maxillary sinus and identification of the ostium (arrow).

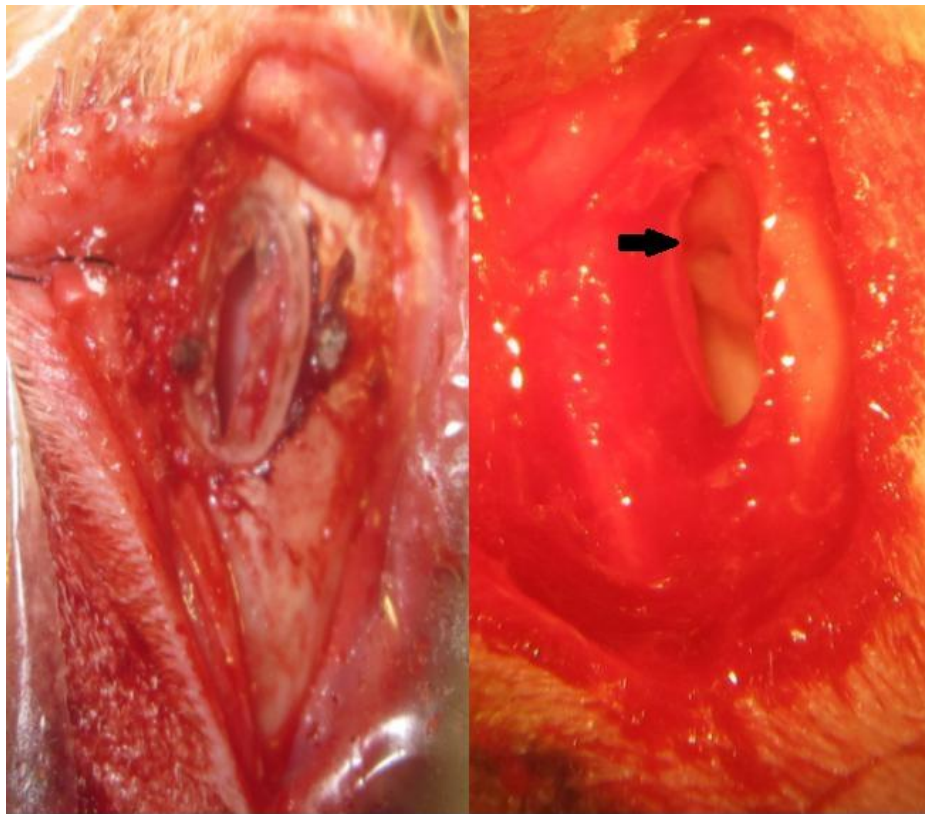


Figure 4. Subcutaneous tissue removed from the animal itself and sinus biopsy.

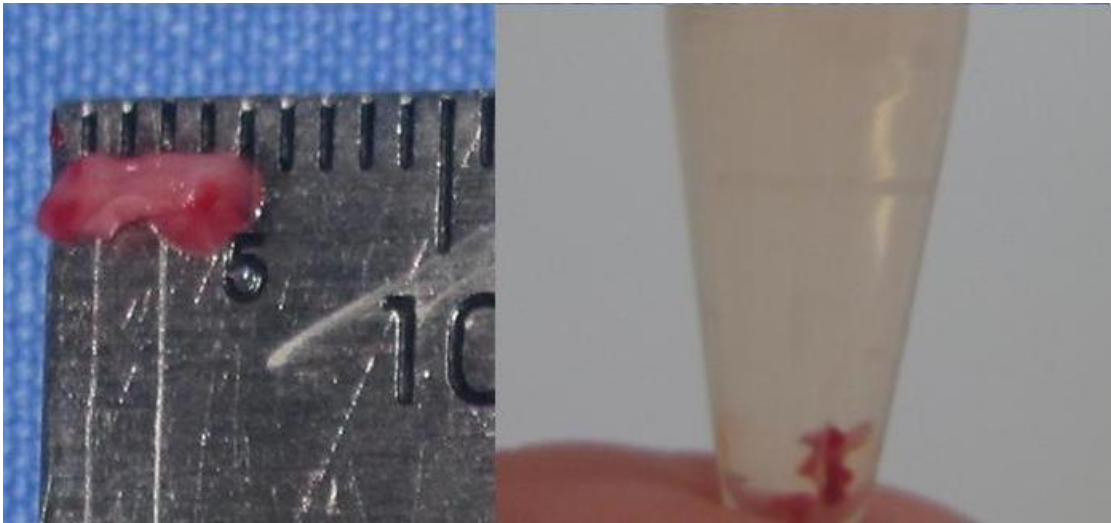


Figure 5. Approach through roof of the nasal cavity.

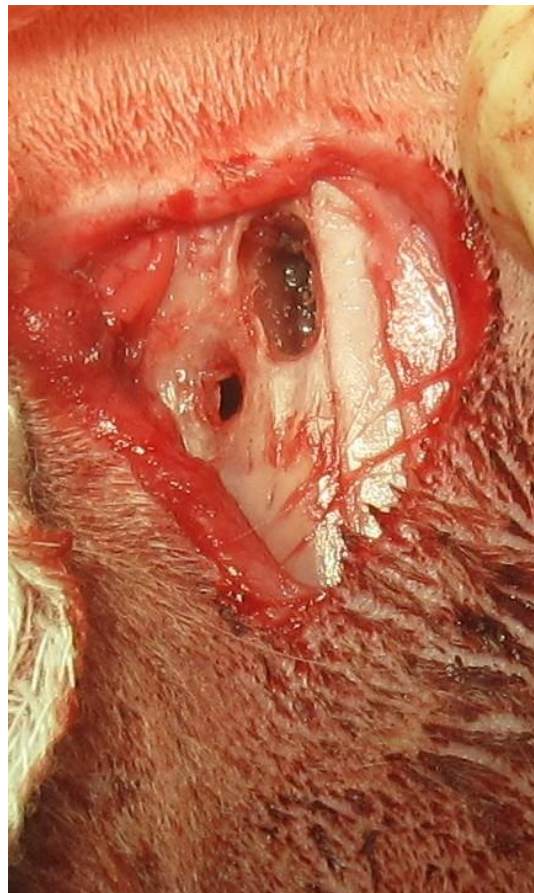


Figure 6. Intense purulent discharge inside the right maxillary sinus in post-mortem macroscopic study of an animal of TM group.

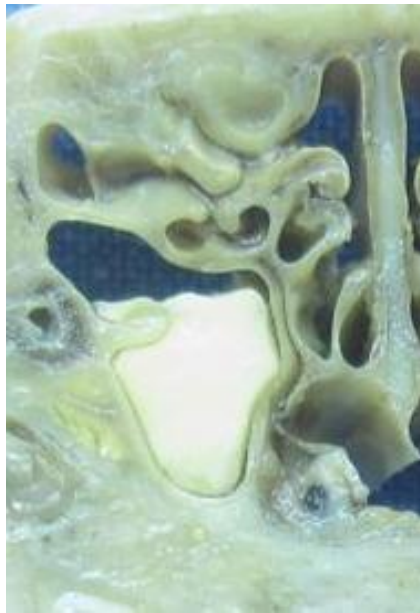
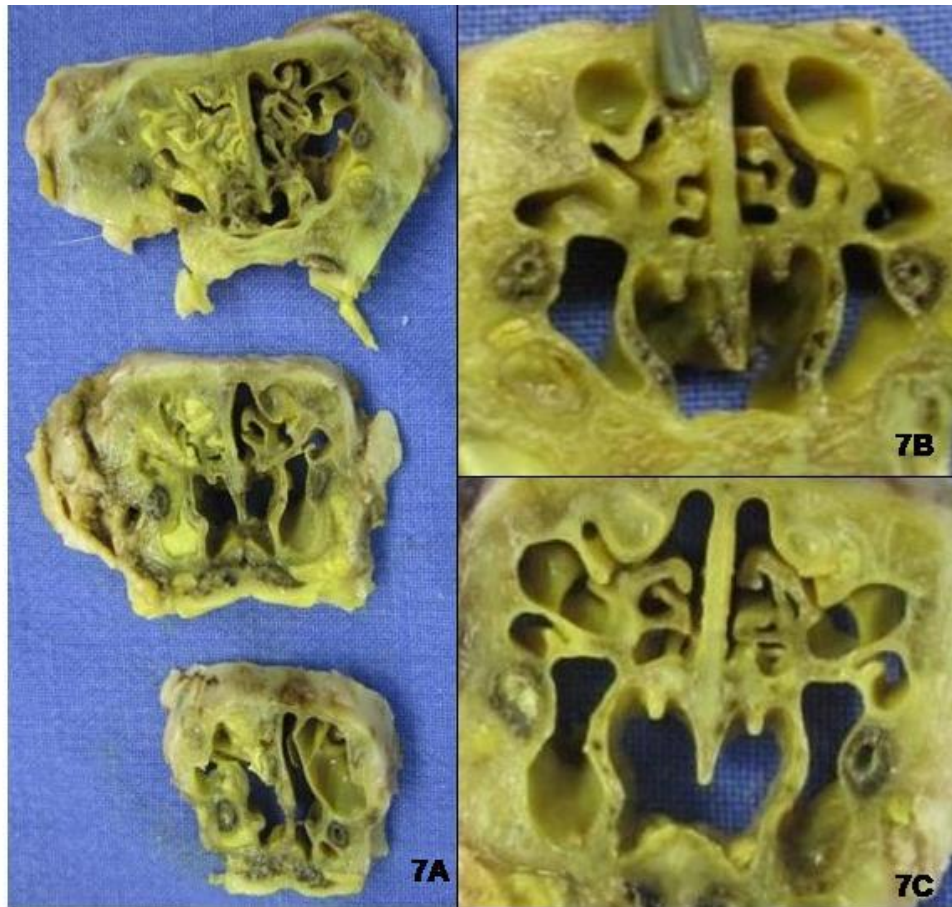


Figure 7. Three examples of macroscopic pieces of animals on RNC group.



Presence of material occluding the right ostium and pus in the lumen of the sinuses (figure 7A), partial occlusion of the ostium (figure 7B) and the absence of any material on the maxillary sinus ostium (figure 7C).

Figure 8. Histopathologic analysis showing inflammatory infiltrate, exudate in the lumen and bacterial colonies in the right maxillary sinus of a TM case. 200x magnification.

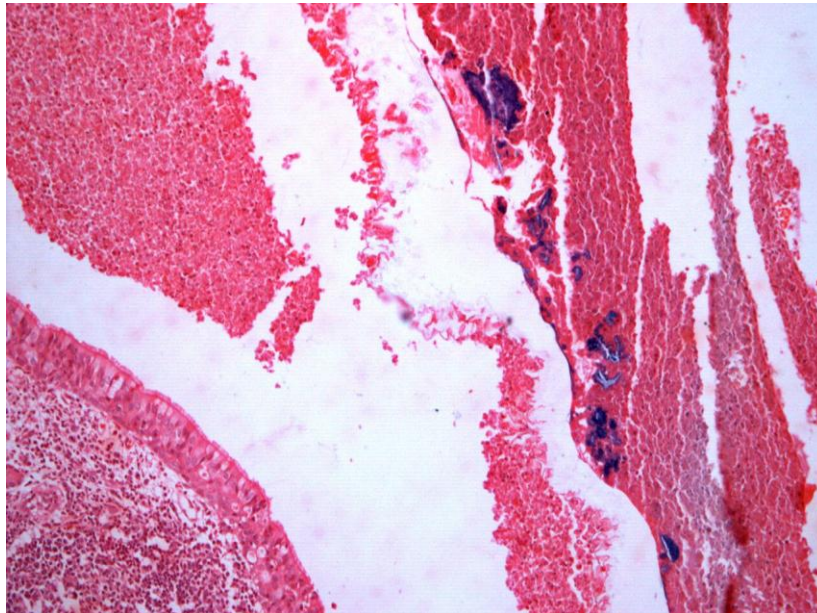


Figure 9. Right maxillary sinus of an animal subjected to occlusion through the roof of the nasal cavity showing exudate in the lumen, inflammatory infiltrate and granulation tissue. 200x magnification.

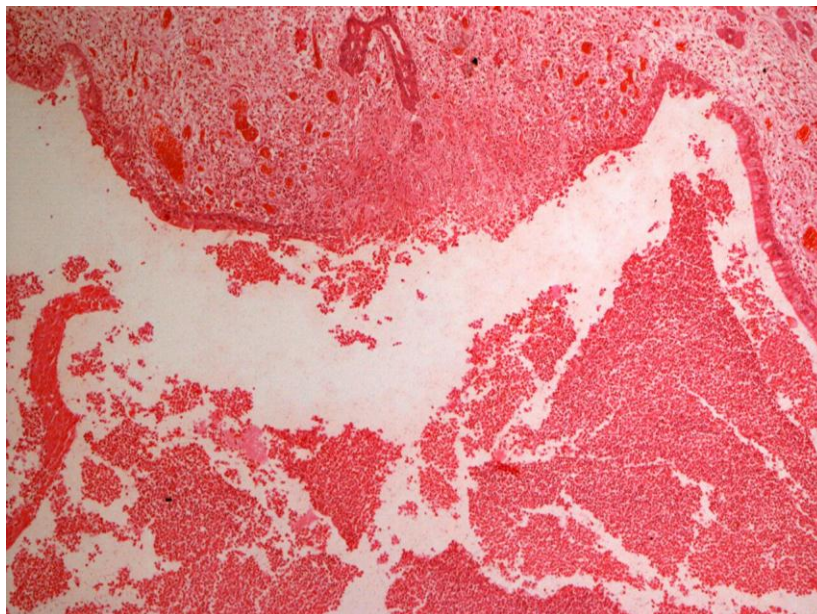


Figure 10. Lymphoplasmacytic infiltrate and erosion of the right maxillary sinus mucosa of rabbit subjected to RNC approach. 400x magnification.

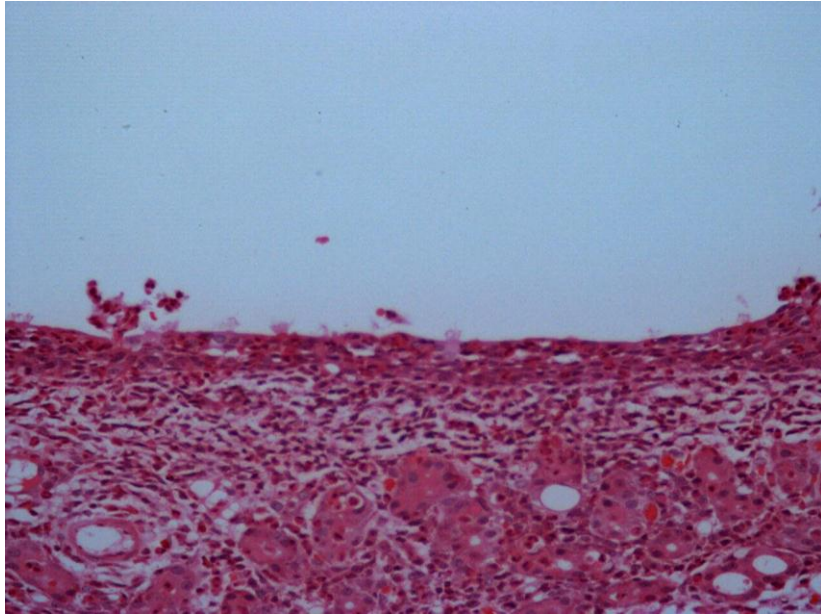


Figure 11. Example of normal mucosa in control side. 400x magnification.

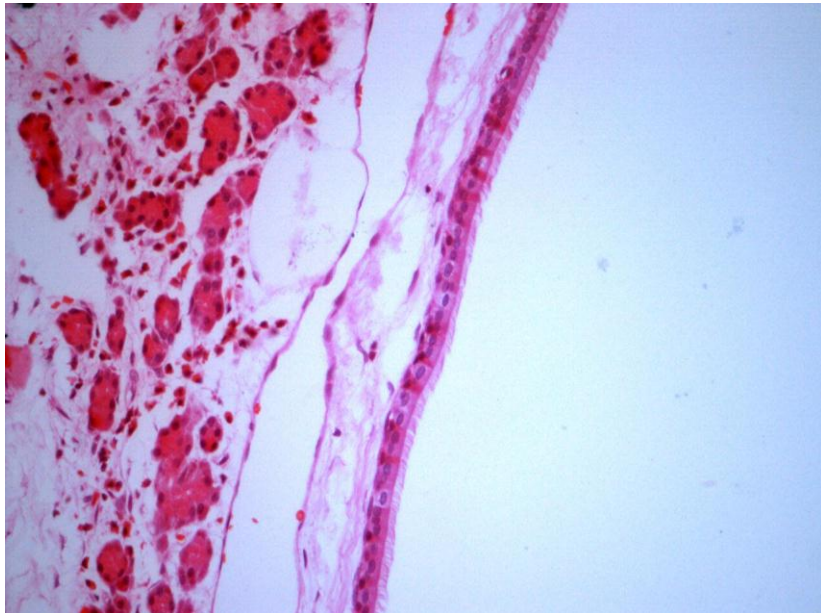
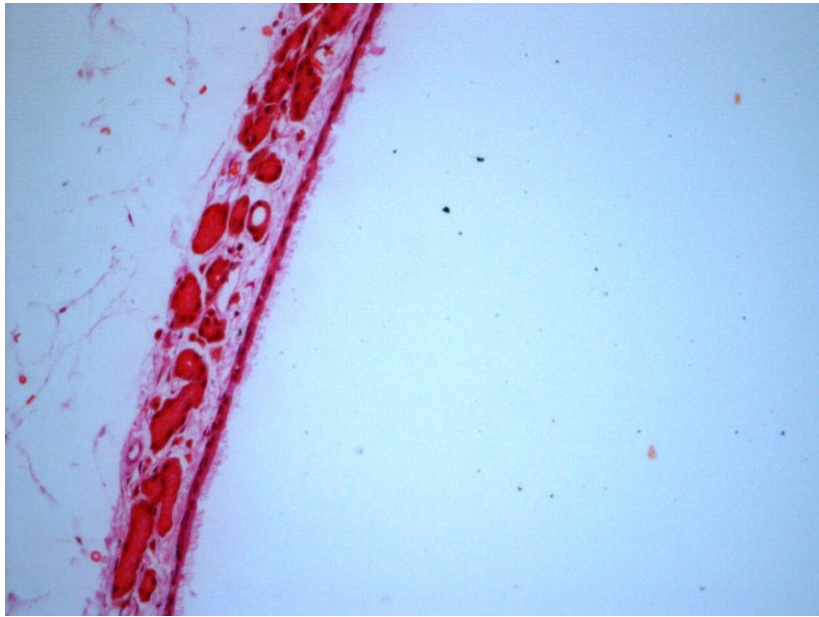


Figure 12. Example of atrophic mucosa in control side. 400x magnification.



Anexo 3

	S/ N	0 - 4+
Adaptativos		
Atrofia		
Metaplasia		
Hiperplasia da Mucosa 1		
Hiperplasia de células caliciformes 1; 2		
Degenerativos/Regeneração		
Degeneração hidrópica		
Destacamento Epitélio 1		
Ulceração Focal da Mucosa 1,2		
Perda de Cílios 2		
Inflamação		
Infiltrado Neutrófilos 1, 2		
Infiltrado Linfo-Plasmocitário 1,2		
Tecido de granulação		
Fibrose		
Exsudato Inflamatório/pus 1		
Formação Polipóide 1		
Alteração vasculares		
Edema Submucoso 1		
Congestão Vascular de Vasos Submucosos 1		
Hemorragia		
Osso:		
aumento de osteoblastos (>4 por trabécula óssea) 1		
aumento de osteoclastos (>1 por trabécula óssea) 1		
Sinusite? (sim/não)		
RSC (hiperplasia de mucosa sinusal com infiltrado denso de células inflamatórias crônicas)		

RSA (infiltrado de células inflamatórias agudas)

Normal (mucosa fina com ausência de células inflamatórias significativas)

Anexo 4: Lista de medicação e materiais utilizados.

Oxitetraciclina: Terramicina®/LA, Pfizer, Guarulhos, SP, Brasil.
Petidina: Cloridrato de Petidina 50mg/ml, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil.
Midazolam: Dormium 15mg/3ml, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil.
Cetamina 15 mg/kg: Cetamin 10%, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., Cotia, SP, Brasil.
Isoflurano: Isoflurano 1ml/1ml, Instituto Biochimico Indústria Farmacêutica Ltda., Itatiaia, RJ, Brasil.
Tubo endotraqueal número 3.0: Portex, SIMS Portex Ltda, Reino Unido.
Iodo PVPI tópico: Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil.
Bupivacaína: Neocaína 5mg/ml, Cristália, Itapira, SP, Brasil.
Lidocaína: Xylestesin 10mg/ml, Cristália, Itapira, SP, Brasil.
Tramadol: Cloridrato de Tramadol 100mg/2ml, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil.
Microscópio cirúrgico: Vasconcelos, D.F. Vasconcelos, São Paulo, SP, Brasil.
Fio mononylon 3.0: Nylon, Laboratórios B. Braun S/A, Arsenal, RJ, Brasil.
N-butil cianocrilato: Vetbond®, 3M, St Paul, MN, EUA.
Vicryl 4-0: Vicryl Poliglactina 910, Ethicon Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil.
Propofol 15 mg/kg: Propovan 10mg/ml, Cristália, Itapira, SP, Brasil.
Cloreto de potássio 10%: Cloreto de Potássio 10%, Isofarma, Fortaleza, CE, Brasil.
Meio líquido específico para hemocultura: BacT/ALERT®, Biomérieux, Durham, NC, EUA.