

Brazilian Journal of
OTORHINOLARYNGOLOGYwww.bjorl.org

ARTIGO ORIGINAL

Alterações morfológicas e patológicas da mucosa da tuba auditiva em um modelo animal de otite média eosinofílica[☆]

Jinsong Yang , Chunli Zhao , Peiwei Chen e Shouqin Zhao *

Capital Medical University, Key Laboratory of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Beijing Tong Ren Hospital, Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Pequim, China

Recebido em 2 de dezembro de 2019; aceito em 10 de setembro de 2020

PALAVRAS-CHAVE

Otite média
eosinofílica;
Trompa de Eustáquio;
Mucosa;
Cílios;
Alergia

Resumo

Introdução: A otite média eosinofílica é uma doença relativamente comum de orelha média; entretanto, sua patogênese é ainda obscura, assim como o tratamento.

Objetivo: Observar as alterações histopatológicas e ultraestruturais do epitélio da mucosa da tuba auditiva em ratos com otite média eosinofílica e investigar a sua patogênese.

Método: Os animais foram injetados intraperitonealmente com 2.000 mg de ovalbumina e 100 mg de hidróxido de alumínio (alúmen) no dia 0, seguido por 100 mg de ovalbumina e 100 mg de injeção de alúmen nos dias 7 e 14. Em seguida, receberam um reforço tópico através de uma aplicação diária de 100 mg da solução por gotejamento nasal e injeção intratimpânica de 0,1 mL de ovalbumina (1000 mg/mL) na orelha direita (grupo A, n=80) e 0,1 mL de solução salina na orelha esquerda como controle (grupo B, n=80), começou no dia 21 e continuou por 14 dias. Os ossos temporais foram dissecados nos dias 35, 38, 41 e 43 separadamente sob anestesia. Foram usadas microscopia eletrônica de varredura e coloração com hematoxilina-eosina e azul de toluidina para observar as alterações histopatológicas e morfológicas das amostras coradas de mucosa da tuba auditiva. Além disso, células inflamatórias e cílios foram contados.

Resultados: O epitélio da tuba auditiva no grupo A estava edematoso e espessado. Os cílios estavam dispostos de forma desordenada e parcialmente destacados. Os eosinófilos infiltraram a camada submucosa da tuba auditiva e seu número aumentou significativamente em comparação ao grupo B ($p < 0,05$). Simultaneamente, degranulação dos mastócitos foi observado no grupo A. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que os cílios estavam depositados e reunidos ao longo de todo o comprimento da tuba auditiva no grupo A. A densidade das células ciliadas foi significativamente menor do que no grupo B ($p < 0,01$).

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2020.09.011>

[☆] Como citar este artigo: Yang J, Zhao C, Chen P, Zhao S. Morphological and pathological changes of Eustachian tube mucosa in an animal model of eosinophilic otitis media. Braz J Otorhinolaryngol. 2022;88:701–7.

* Autor para correspondência.

E-mail: shouqinzhao01@163.com (S. Zhao).

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

Conclusão: No modelo de otite média eosinofílica, a alergia causou alterações significativas à histopatologia e na morfologia da mucosa da tuba auditiva, afetou a função normal dela, o que desempenhou um papel importante na ocorrência e no desenvolvimento da otite média eosinofílica.

© 2020 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

A otite média com efusão (OME) predispõe crianças em idade pré-escolar à perda auditiva condutiva. Um estudo anterior revelou que cerca de 90% das crianças em idade pré-escolar e 12,5% das crianças em idade escolar apresentavam OME, especialmente entre 6 meses a 4 anos, o que pode afetar seriamente a formação e o desenvolvimento da linguagem devido à longa duração do tratamento.^{1,2} Recentemente, a incidência clínica de OME aumentou; entretanto, sua fisiopatologia ainda não foi totalmente esclarecida. De acordo com o conceito de inflamação do trato respiratório superior e inferior, o sistema mucoso da orelha média é a continuação do trato respiratório superior, atua potencialmente como um órgão imune.³⁻⁵ Estudos epidemiológicos verificaram que a OME apresenta grande probabilidade de ser uma manifestação abrangente de doenças alérgicas atópicas, como rinite alérgica, eczema e asma.⁶⁻¹² Baseado nas observações clínicas, sugere-se que alguns pacientes com OME não apresentam sintomas de inflamação aguda, enquanto outros apresentam sintomas mesmo após a fase aguda ter passado.¹³⁻¹⁹ Há muitos relatos de pacientes com OME intratável ou otite média crônica associada à asma brônquica e/ou rinite alérgica. Tomioka et al.²⁰ denominaram a otite média intratável de tipo específico associada à asma brônquica como otite média eosinofílica (OMEo) porque o teste cutâneo não detectou alergia tipo I relacionada a um alérgeno específico em alguns pacientes, apesar da presença de eosinófilos. Os eosinófilos são células efetoras na patogênese das doenças alérgicas e desempenham um papel importante na ocorrência de OMEo. Iino et al. propuseram os critérios diagnósticos para OMEo com base na análise das características clínicas em 138 pacientes com diagnóstico de OMEo em cinco centros participantes do grupo de estudo da OMEo (tabela 1).²⁰

Na efusão da orelha média, já foram encontrados quimioatraentes de eosinófilos, como IL-5 e eotaxina, expressão

de quimioatraentes de eosinófilos, como eotaxina (regulada na ativação, linfócito T normal expresso e secretado). Além disso, mRNAs de eotaxina também foram observados na mucosa da orelha média por meio de testes de hibridização *in situ*. Esses achados indicam que a inflamação eosinofílica ativa ocorre localmente na orelha média.²¹⁻²³ A terapia com anti-IL-5 que usa mepolizumab foi eficaz na inibição do recrutamento eosinofílico para a orelha média em pacientes com OMEo.^{24,25}

Atualmente, a OMEo é considerada uma doença da orelha média bastante comum, mas ainda intratável. Embora estudos tenham investigado as condições histopatológicas da orelha média em OMEo, e revelado a presença de numerosos eosinófilos ativados, assim como da proteína catiônica eosinofílica (PCE) na mucosa espessada da orelha média, a sua presença na tuba auditiva (TA) ainda permanece obscura. Este estudo teve como objetivo determinar a relação entre OMEo e a TA através de experimentos em um modelo de rato com OMEo com o uso de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e coloração de H&E para observar as alterações histopatológicas e ultraestruturais do epitélio da mucosa da TA em ratos, de forma a investigar melhor a patogênese da OMEo e fornecer uma nova justificativa para sua ocorrência.

Método

Materiais experimentais

Para cálculos de poder do estudo, foi assumido um desvio-padrão igual nos grupos A e B. Oitenta ratos Sprague-Dawley (SD) machos saudáveis (idade de 6 a 8 semanas, peso de 250 a 300 g) foram usados. Os experimentos com animais foram aprovados pelo comitê institucional de experimentação e cuidado de animais (número EEI-2018-102). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais usados e seu sofrimento.

Tabela 1 Critérios de diagnóstico da OME

Critério maior	Critérios menores
Otite média com efusão ou otite média crônica com efusão predominantemente eosinofílica	1. Efusão da orelha média altamente viscosa 2. Resistência ao tratamento convencional para otite média 3. Associação com asma brônquica 4. Associação com polipose nasal
Caso definitivo: positivo para o critério maior, mais dois ou mais critérios menores	
Critérios de exclusão: síndrome de Churg-Strauss, síndrome hipereosinofílica	

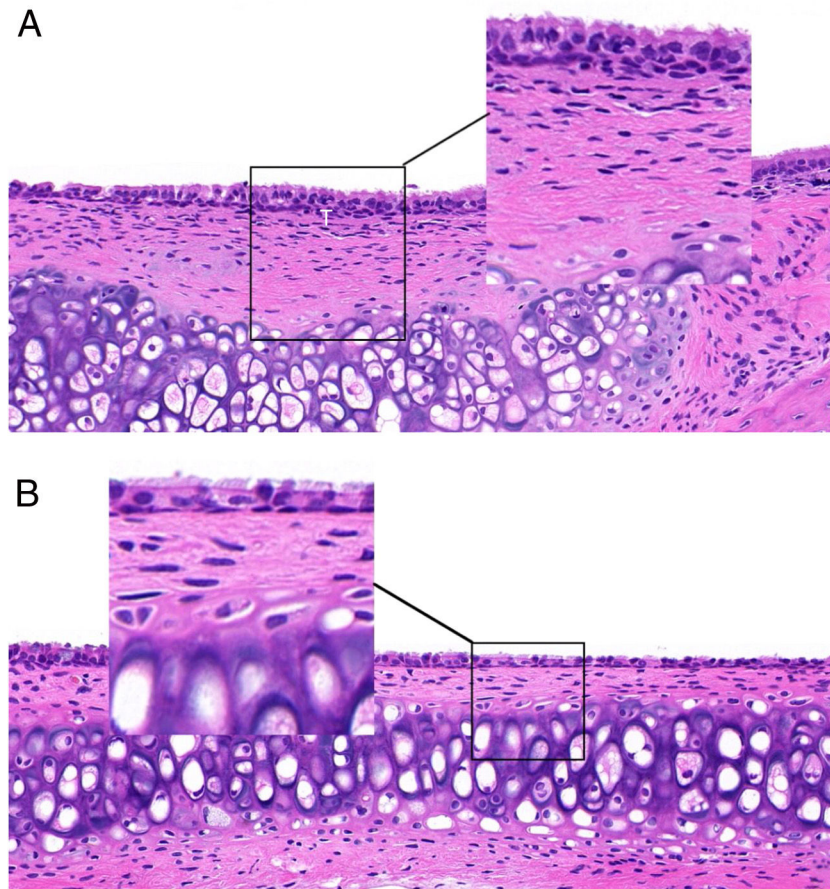


Figura 1 (A) A tuba auditiva do grupo A se apresenta com edema de células epiteliais ciliadas, cílios desordenados e descamados, mucosa espessada e capilares aumentados e expandidos. (B) O epitélio da mucosa da tuba auditiva do grupo B revelou um epitélio ciliado levemente edematoso, com estrutura ciliar normal e bem organizada.

Estabelecimento de um modelo de OMEo em ratos SD

Para a modelagem de OMEo no grupo A, os métodos de modelagem de Nishizawa H. foram consultados.²⁶ Resumidamente, 80 ratos receberam injeções intraperitoneais no dia 0 com 2.000 mg de ovalbumina (OVA) e 100 mg de hidróxido de alumínio (alúmen) e nos dias 7 e 14, com 100 mg de OVA e 100 mg de alúmen para sensibilização geral. Em seguida, a partir do dia 21 e pelos próximos 14 dias, os animais receberam reforço tópico com aplicação diária de solução de 100 mg de OVA por gotejamento nasal e injeção intratimpânica de 0,1 mL de OVA (1000 mg /mL) na orelha direita (grupo A) e 0,1 mL de solução salina na orelha esquerda para os controles (grupo B). Todos os procedimentos foram feitos sob anestesia com hidrato de cloral a 10% (0,1 mg/kg, i.p.).

Amostra de TA de rato

Após a injeção final de OVA, os animais foram anestesiados profundamente com hidrato de cloral a 10%. Os ossos temporais das orelhas direita (grupo A) e esquerda (grupo B) foram dissecados no 35º, 38º, 41º e 43º dia, resultaram em oito subgrupos: grupo A1, A2, A3, e A4 (orelha direita, n=20 por subgrupo) e grupo B1, B2, B3, e B4 (orelha esquerda,

n=20 por subgrupo). Em seguida, amostras de TA bilaterais foram completamente removidas sob microscopia cirúrgica (Leica, Alemanha), manteve-se a integridade da TA. As TAs bilaterais foram seccionadas ao longo do eixo longo nas partes superior e inferior. Uma parte foi usada para observar a superfície do tecido da mucosa sob MEV e a outra foi usada para análise com coloração com H&E e azul de toluidina.

Preparação e análise do tecido

Usaram-se a coloração de H&E e cortes do tecido da superfície da mucosa embebido em parafina em uma parte da TA de cada grupo, a seguir analisados sob microscópio óptico (Nikon, Japão). Primeiro, foram observadas alterações morfológicas no epitélio da mucosa, inclusive espessamento da mucosa, edema epitelial dos cílios, alinhamento dos cílios e queda dos cílios. Em segundo lugar, os eosinófilos e neutrófilos de três visualizações selecionadas aleatoriamente foram contados com uma ampliação de 1000 ×. Mastócitos foram contados com o mesmo método após a coloração com azul de toluidina. Os valores médios foram registrados como dados.

O tecido da superfície mucosa de outra parte da TA de cada grupo foi observado sob MEV (Leica, Alemanha) após inclusão e tingimento. Alterações histopatológicas na ultraestrutura do epitélio da mucosa, inclusive queda,

depósito e acúmulo de cílios, foram observadas em diferentes ampliações. O número de células ciliadas foi contado em cinco áreas de aproximadamente $80 \times 40 \mu\text{m}$; uma foi selecionada a $60 \mu\text{m}$ de distância da cavidade timpânica no ponto mais baixo da superfície côncava da TA e quatro foram selecionadas da superfície de ambos os lados. Os valores médios foram registrados.

Análise estatística

Todos os animais usados neste estudo eram machos e foram divididos aleatoriamente em oito subgrupos. Os dados foram analisados estatisticamente com o *software* estatístico SPSS 17.0. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Se nenhuma marcação especial fosse usada, então o teste *t* foi usado para análise estatística. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Resultados

Histopatologia da mucosa da TA

A coloração por H&E da mucosa da TA ao microscópio óptico revelou que o epitélio ciliado estava levemente edematoso e a estrutura dos cílios estava normal e bem organizada no grupo controle (grupo B) (fig. 1B). Em comparação, no grupo OMEo (grupo A) havia um edema evidente nas células epiteliais ciliadas na TA, cílios desordenados e queda de cílios, a mucosa da TA estava espessada e os capilares estavam aumentados e expandidos (fig. 1A). O número de eosinófilos e neutrófilos aumentava em comparação com os do grupo B (fig. 2). Além disso, infiltração e degranulação de mastócitos foram observadas sob coloração com azul de toluidina (fig. 3). A diferença entre o grupo OMEo A e o grupo controle B foi significativa ($p < 0,05$).

A contagem de células inflamatórias sob um microscópio de alta potência (fig. 4) não mostrou diferença significativa em relação a números de eosinófilos, mastócitos e neutrófilos entre os subgrupos A (1, 2, 3 e 4) e subgrupos B (1, 2, 3, e 4) ($p > 0,05$). Quando a comparação foi feita entre o subgrupo A e o subgrupo B em 1, 2, 3 e 4, as contagens de eosinófilos e mastócitos no grupo A foram significativamente mais altas do que aquelas no grupo B e a diferença foi estatisticamente significativa (teste *t*, eosinófilos: fig. 4A, $t = 4,608$, $\eta^2 = 0,7797$, $p = 0,0037$; mastócitos: fig. 4B, $t = 3,520$, $\eta^2 = 0,6737$, $p = 0,0125$), mas a contagem de neutrófilos não foi significativamente diferente entre os dois grupos (fig. 4C, $p > 0,05$).

Morfologia da mucosa da TA

A mucosa normal da TA sob MEV no grupo B era coberta por cílios contínuos (fig. 5C–D). No entanto, a mucosa mostrou-se descontínua e evidente, com grande amplitude de depósito ou agregação no grupo A (fig. 5A–B). As diferenças entre os dois grupos foram significativas.

Quando as células ciliadas foram contadas em MEV, não apresentaram diferença significativa em relação ao seu número entre os subgrupos A1, A2, A3 e A4, ou entre os

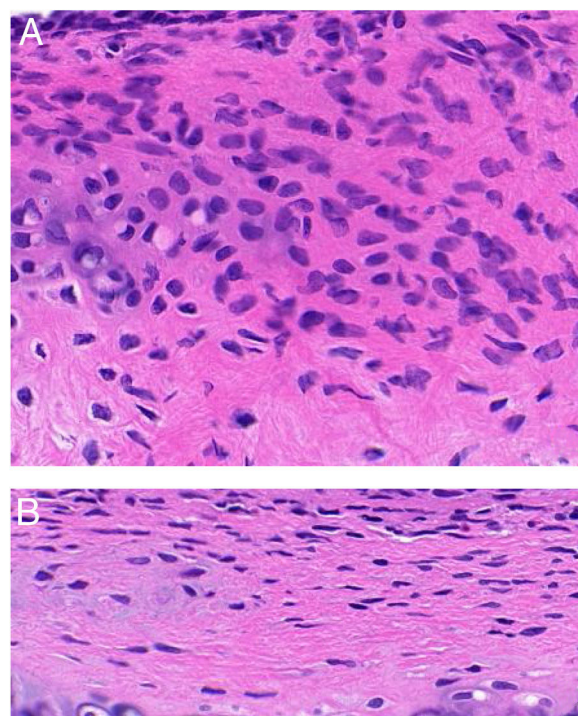


Figura 2 (A) Visualização dos eosinófilos e neutrófilos no grupo A. (B) Visualização de eosinófilos e neutrófilos no grupo B (HE $\times 1000$).

subgrupos B1, B2, B3 e B4 ($p > 0,05$). Entretanto, o número de células ciliadas no grupo A foi significativamente menor do que no grupo B (fig. 6). A diferença foi estatisticamente significativa (teste *t*, $t = 5,594$, $\eta^2 = 0,8391$, $p = 0,0014$).

Discussão

A OMEo é uma doença comum com alta morbidade em crianças e sua fisiopatologia é multifatorial, inclusive alergias, bactérias, vírus, doença do refluxo gastroesofágico e disfunção da TA.²⁷ Como a mucosa da TA desempenha um papel importante na excreção e manutenção do microambiente da orelha média, a disfunção da TA tem se tornado gradualmente um novo foco de pesquisa amplamente possibilitado pelos avanços na imunologia e na biologia molecular.

Nosso estudo demonstrou que a alergia foi responsável por mudanças significativas na histopatologia e morfologia da mucosa da TA. A morfologia e a composição celular da mucosa da tuba auditiva foram altamente consistentes com as da mucosa respiratória.⁴ A fim de esclarecer melhor as alterações estruturais e funcionais da mucosa da TA em OMEo, ratos SD foram usados como portadores experimentais do modelo de OMEo e a mucosa da TA foi observada sob um microscópio depois de submetida à coloração com H&E e azul de toluidina. Os resultados mostraram que os números de eosinófilos e mastócitos na mucosa da TA do grupo OMEo aumentaram significativamente em comparação com os do grupo controle ($p < 0,05$) e permaneceram estáveis. Isso confirmou que a mucosa da TA teve uma reação alérgica, permaneceu em um nível elevado por um período tempo no modelo de OMEo induzido pela mecanismo imunológico. A

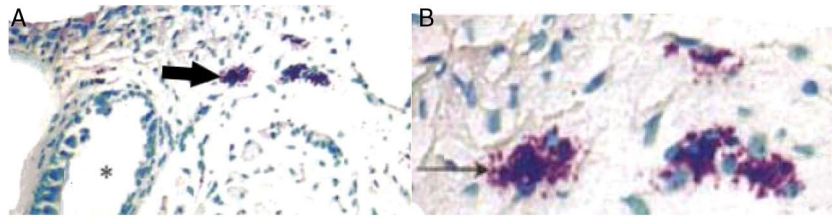


Figura 3 (A) Infiltração de mastócitos no tecido ao redor da tuba auditiva no grupo A. A seta preta indica mastócitos. O asterisco (*) corresponde ao lúmen tubário (coloração com azul de toluidina $\times 400$). (B) Degranulação de mastócitos ativos no tecido ao redor da tuba no grupo A. A seta preta aponta para mastócitos ativados (coloração com azul de toluidina $\times 1000$).

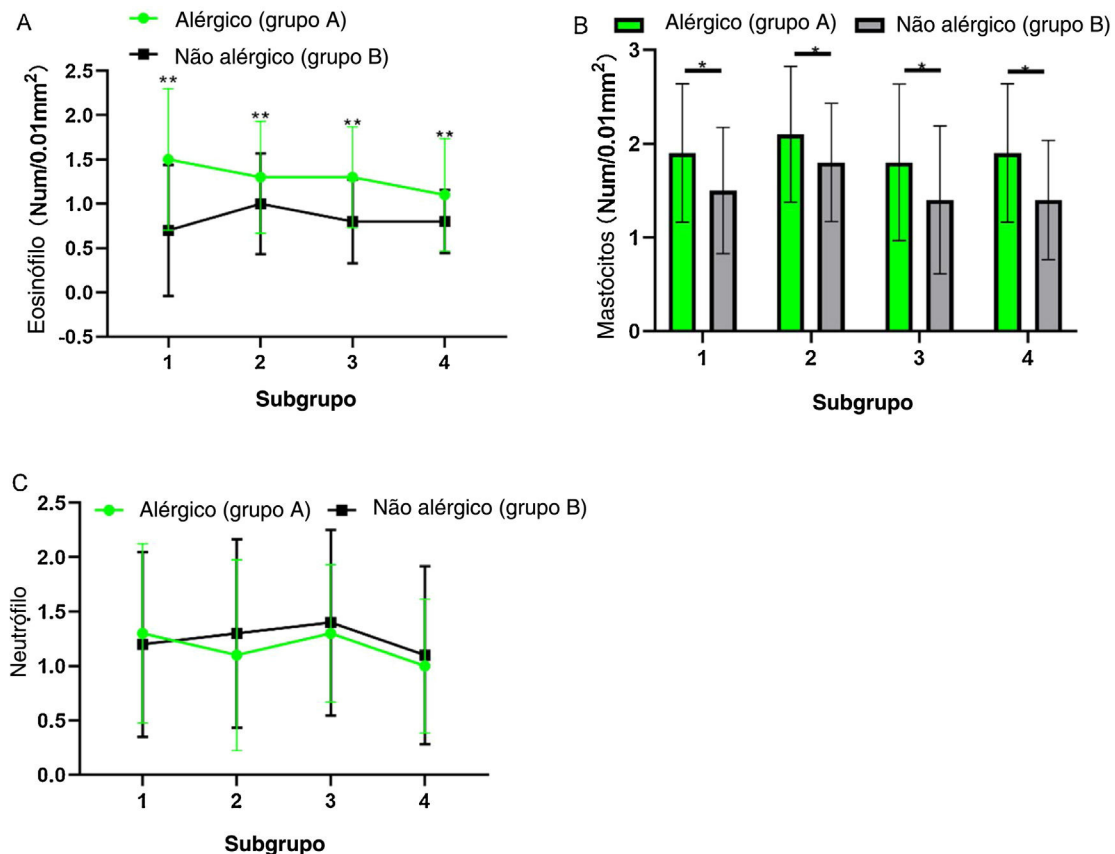


Figura 4 (A) As contagens de eosinófilos no grupo A foram significativamente maiores do que no grupo B e a diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). (B) O número de mastócitos no grupo A foi significativamente maior do que no grupo B e a diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). (C) As contagens de neutrófilos não diferiram significativamente entre os dois grupos.

partir dessa perspectiva, os fenômenos clínicos citados, em que alguns pacientes com OMEo não apresentam obstrução mecânica da TA, sintomas de infecção aguda ou sintomas prolongados, poderiam ser explicados, mesmo após a fase aguda ter passado.

Neste experimento, observou-se que os eosinófilos e mastócitos estavam aumentados no grupo OMEo, mas os neutrófilos não diferiram significativamente entre os grupos; isso excluiu fatores de infecção e assegurou a confiabilidade da moldagem, sugeriu que a resposta imune desempenha até certo ponto um papel importante na ocorrência de OMEo. Além disso, ativação e degranulação dos mastócitos também foram observados sob a coloração com azul de toluidina. Um

estudo anterior mostrou que a ativação dos eosinófilos e dos mastócitos pode liberar vários mediadores biologicamente ativos, como histamina, prostaglandinas e leucotrienos, que podem causar edema tecidual e aumentar o transudato.²⁸ A análise da mucosa da TA e do edema ciliar pela coloração H&E mostrou que a obstrução mecânica causada pelo estreitamento da tuba auditiva foi uma das causas da OMEo. A reação inflamatória alérgica ocorreu tanto na mucosa da orelha média quanto na mucosa da TA e aumentou o transudato da cavidade da orelha média, levou a uma sobrecarga de drenagem. Além disso, o aumento do volume de drenagem na TA causou um estreitamento adicional na TA, elevou a resistência à excreção. Esse pode ser

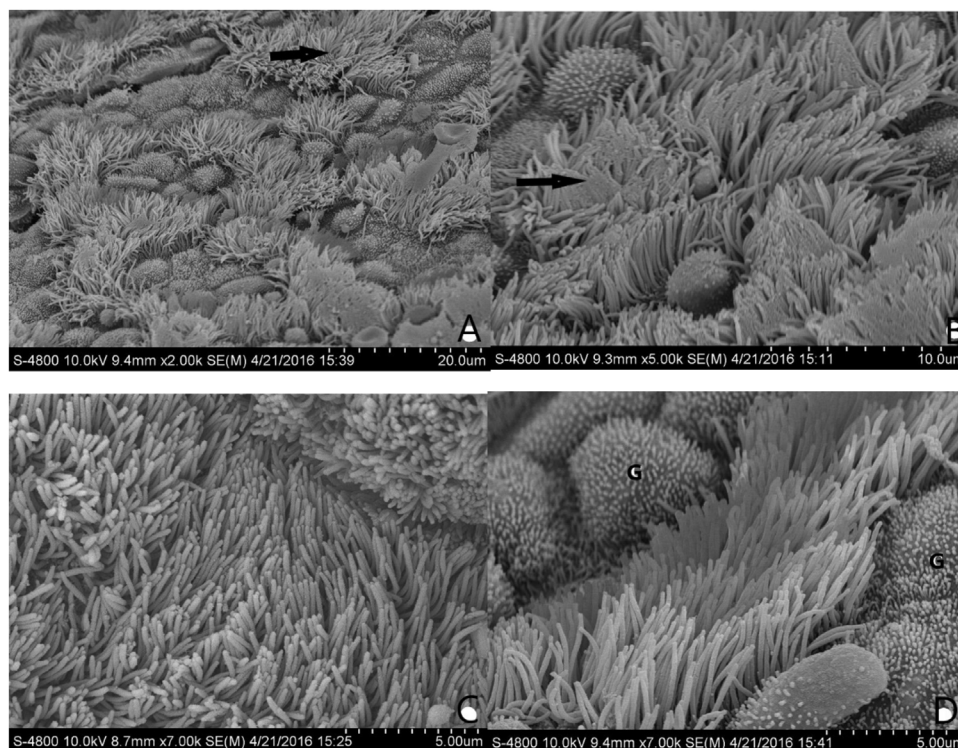


Figura 5 (A e B) Estrutura morfológica da mucosa da tuba auditiva no grupo A sob MEV. Há uma perda significativa e descontínua de cílios na mucosa da TA. O número de células ciliadas na área de abertura proximal à cavidade timpânica está significativamente reduzido e a densidade diminuída. Em (A), a seta preta está direcionada para a área com ausência de cílios. Em (B), a seta preta obviamente aponta para um depósito de cílios e uma área de agrupamento maciço. (C e D) Estrutura morfológica da mucosa da tubária no grupo B sob MEV. Em (C), toda a superfície da mucosa da TA está recoberta por cílios, sem perda ciliar ou depósito evidente. Em (D), as células ciliadas estão espalhadas no meio da mucosa; a letra "G" indica células caliciformes.

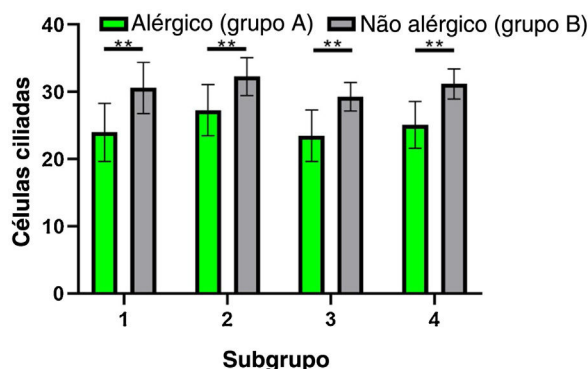


Figura 6 O número de células ciliadas no grupo A foi significativamente menor do que no grupo B. A diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

considerado como o mecanismo de ocorrência e desenvolvimento da OMEo.

O MEV tem muitas vantagens observacionais. Sua imagem tem uma ampla gama de ampliações, de dez vezes a várias centenas de milhares de vezes, e é apresentada em alta resolução. A razão de resolução entre o microscópio óptico e o microscópio eletrônico de varredura é de até 3 nm e fornece as condições necessárias para contar as células ciliadas e observar microalterações. Neste estudo, foi muito

importante que uma perda significativa de cílios na mucosa da TA dos ratos do grupo OMEo e uma grande variedade de acúmulo de cílios fossem claramente observadas. Além disso, a redução do número de células ciliadas efetivas foi vital para a comparação com o grupo controle, o que pôde ser observado claramente em MEV.

Neste estudo, o número de células caliciformes aumentou significativamente. Sem dúvida, a redução das células ciliadas e a morfologia ciliar anormal afetam seriamente a função drenagem da efusão pela TA na orelha média. Ao mesmo tempo, o aumento de eosinófilos, mastócitos e células caliciformes leva ao aumento do muco da TA, causa bloqueio e aumenta ainda mais a carga de fluidos a ser drenada na orelha média. Como a frequência de movimentos dos cílios vivos na mucosa da TA é grande e facilmente afetada pelo ambiente e pelos métodos de medição, é difícil calcular a contagem de depósito e acúmulo das células ciliares. Combinado com o edema de cílios observado na coloração de H&E e o óbvio acúmulo e depósito de cílios observados em MEV, a frequência de oscilação dos cílios vivos também está significativamente reduzida, o que pode ter um efeito negativo na mucosa da TA.

Considerando as limitações deste estudo, objetivamos agora observar os cílios vivos e estudar os mecanismos moleculares subjacentes, a fim de fornecer evidências objetivas sobre a patogênese da OMEo a serem usadas na sua prevenção e tratamento.

Conclusão

Este estudo confirmou o papel da disfunção da TA na patogênese e no desenvolvimento da OMEo do ponto de vista histopatológico e morfológico, causada pela alergia. O estudo aprofundado da patogênese da OMEo ajudará a encontrar métodos eficazes e viáveis para a prevenção e o tratamento da doença, que são de grande importância para acelerar a recuperação da doença, reduzir o custo econômico sobre os pacientes e melhorar a fala de crianças em idade pré-escolar.

Financiamento

Bolsa dada a Shouqin Zhao pela *National Natural Science Foundation of China* (bolsa n° 81770989).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Martines F, Bentivegna D, Di Piazza F, Martinciglio G, Sciacca V, Martines E. The point prevalence of otitis media with effusion among primary school children in Western Sicily. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2010;267:709–14.
- Zielhuis GA, Straatman H, Rach GH, van den Broek P. Analysis and presentation of data on the natural course of otitis media with effusion in children. *Int J Epidemiol*. 1990;19:1037–44.
- Nguyen LH, Manoukian JJ, Tewfik TL, Sobol SE, Joubert P, Mazer BD, et al. Evidence of allergic inflammation in the middle ear and nasopharynx in atopic children with otitis media with effusion. *J Otolaryngol*. 2004;33:345–51.
- Nguyen LH, Manoukian JJ, Sobol SE, Tewfik TL, Mazer BD, Schloss MD, et al. Similar allergic inflammation in the middle ear and the upper airway: evidence linking otitis media with effusion to the united airways concept. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:1110–5.
- Martines F, Salvago P, Ferrara S, Messina G, Mucia M, Plescia F, et al. Factors influencing the development of otitis media among Sicilian children affected by upper respiratory tract infections. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2016;82:215–22.
- Mena Viveros N. [Biofilms in otolaryngology]. *Acta Otorrinolaryngol Esp*. 2014;65:47–52.
- Yeo SG, Park DC, Eun YG, Cha CI. The role of allergic rhinitis in the development of otitis media with effusion: effect on eustachian tube function. *Am J Otolaryngol*. 2007;28:148–52.
- Val S, Poley M, Brown K, Choi R, Jeong S, Colberg-Poley A, et al. Proteomic Characterization of Middle Ear Fluid Confirms Neutrophil Extracellular Traps as a Predominant Innate Immune Response in Chronic Otitis Media. *PLoS One*. 2016;11:e0152865.
- Torretta S, Pignataro L, Carioli D, Ibba T, Folino F, Rosazza C, et al. Phenotype Profiling and Allergy in Otitis-Prone Children. *Front Pediatr*. 2018;6:383.
- Nielsen MC, Friis M, Martin-Bertelsen T, Winther O, Friis-Hansen L, Caye-Thomasen P. The middle ear immune defense changes with age. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016;273:81–6.
- Arshi S, Dehghani Firouzabadi F, Ghalebaghi B, Dehghani Firouzabadi A, Jalali F, Shekarabi M, et al. Otitis Media with Effusion in Children and the Impact of Risk Factors on Serum Cytokine Levels. *Iran J Otorhinolaryngol*. 2017;29:75–81.
- Seo Y, Nonaka M, Pawankar R. Eosinophilic otitis media and comorbid asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2019.
- Zhao S, Liu H, Han D, Xia Y, Fan E, Wang Y, et al. The expression and significance of NF-kappaB in the rat model of otitis media with effusion experimentally induced by ovalbumin. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2008;22:751–5.
- Zernotti ME, Pawankar R, Ansotegui I, Badellino H, Croce JS, Hossny E, et al. Otitis media with effusion atopy: is there a causal relationship? *World Allergy Organ J*. 2017;10:37.
- Teschner M. Evidence and evidence gaps in the treatment of Eustachian tube dysfunction and otitis media. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2016;15:Doc05.
- Lack G, Caulfield H, Penagos M. The link between otitis media with effusion and allergy: a potential role for intranasal corticosteroids. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011;22:258–66.
- Kwon C, Lee HY, Kim MG, Boo SH, Yeo SG. Allergic diseases in children with otitis media with effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2013;77:158–61.
- Crowson MG, Ryan MA, Ramprasad VH, Choi KJ, Raynor E. Intranasal fluticasone associated with delayed tympanostomy tube placement in children with eustachian tube dysfunction. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2017;94:121–6.
- Blanks DA, Ebert CS Jr, Eapen RP, Zdanski C, Kandimalla ER, Agrawal S, et al. Immune modulatory oligonucleotides in the prevention and treatment of OVA-induced eustachian tube dysfunction in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;137:321–6.
- Iino Y, Tomioka-Matsutani S, Matsubara A, Nakagawa T, Nonaka M. Diagnostic criteria of eosinophilic otitis media, a newly recognized middle ear disease. *Auris Nasus Larynx*. 2011;38:456–61.
- Iino Y, Nagamine H, Yabe T, Matsutani S. Eosinophils are activated in middle ear mucosa and middle ear effusion of patients with intractable otitis media associated with bronchial asthma. *Clin Exp Allergy*. 2001;31:1135–43.
- Iino Y, Kakizaki K, Katano H, Saigusa H, Kanegasaki S. Eosinophil chemoattractants in the middle ear of patients with eosinophilic otitis media. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:1370–6.
- Zhao C, Li J, Yang J, Yang L, Chen P, Dou J, et al. Inhibitor of gamma-secretase alleviates middle ear inflammation by regulating Th2 response in OVA-mediated allergic OME in vivo. *Immunobiology*. 2019.
- Iino Y, Takahashi E, Ida S, Kikuchi S. Clinical efficacy of anti-IL-5 monoclonal antibody mepolizumab in the treatment of eosinophilic otitis media. *Auris Nasus Larynx*. 2019;46:196–203.
- Esu Y, Iino Y, Masuda M, Kanazawa H, Yoshida N. Proposal of a Treatment Strategy for Eosinophilic Otitis Media Based on Middle Ear Condition. *Otol Neurotol*. 2018;39:e671–8.
- Nishizawa H, Matsubara A, Nakagawa T, Ohta N, Izuhara K, Shirasaki T, et al. The role of periostin in eosinophilic otitis media. *Acta Otolaryngol*. 2012;132:838–44.
- Damghani MA, Dehghan E. Is there any association between *Helicobacter pylori* and otitis media with effusion? *Braz J Otorhinolaryngol*. 2018.
- Gangwar RS, Friedman S, Seaf M, Levi-Schaffer F. Mast cells and eosinophils in allergy: Close friends or just neighbors. *Eur J Pharmacol*. 2016;778:77–83.