

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

**ANGIOGÊNESE E METALOPROTEINASES 2 E 9:
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE
COLESTEATOMAS ADQUIRIDOS DE PACIENTES
PEDIÁTRICOS E ADULTOS**

CRISTINA DE CARVALHO DORNELLES

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre, Brasil

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

**ANGIOGÊNESE E METALOPROTEINASES 2 E 9:
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE
COLESTEATOMA ADQUIRIDOS DE PACIENTES
PEDIÁTRICOS E ADULTOS**

Cristina de Carvalho Dornelles

Orientador: Prof. Dr. Sady Selaimen da Costa

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Luíse Meurer

A apresentação dessa tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Doutora.

Porto Alegre, Brasil

2008

D713a Dornelles, Cristina de Carvalho

Angiogênese e metaloproteinases 2 e 9: estudo comparativo entre colesteatoma adquiridos de pacientes pediátricos e adultos / Cristina de Carvalho Dornelles ; orient. Sady Selaimen da Costa ; co-orient. Luíse Meurer. – 2008.

155 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria. Porto Alegre, BR-RS, 2008.

1. Colesteatoma 2. Criança 3. Adulto 4. Neovascularização patológica 5. Metaloproteases I. Costa, Sady Selaimen da II. Meurer, Luíse III. Título.

NLM: QZ 275

“Pois o que Heu tenho de valor, Heu te dou, é o meu amor, é teu...” Hélder dos Santos Corrêa

“Se consegui ver tão longe, é por que me apoiei nos ombros de outros homens” Isaac Newton

Dedico essa tese aos meus grandes amores: Manuella e Nathálie, pois sem a compreensão delas, ao aceitarem minha ausência nesses anos, mais este grande passo em minha vida não teria sido possível.

Minha vida teve muitos marcos em 2008, porém a morte de minha filha foi o derradeiro, fundamental e crucial momento de virada em minha vida, por isto esta tese é para ela!

Nathálie: te amei, te amo e sempre amarei.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Sady Selaimen da Costa, orientador dessa tese, por todo seu apoio, compreensão e exigência; por sua instigante sede de conhecimento; mas, principalmente, por sua confiança e amizade.

À Prof^ª Dr^ª Luíse Meurer, co-orientadora, por sua prestimosa ajuda e interesse, mas, sobretudo, por ter se tornado uma amiga fiel.

À Prof^ª Dr^ª Newra Telechea Rotta, pelos inestimáveis conselhos, pela dedicação ao ensino e por sua paixão à educação, no sentido mais amplo que este substantivo possa ter.

Ao Prof. Arnaldo Linden, por ser uma fonte de inspiração a muitos pesquisadores da otologia.

Aos médicos Dr. Celso Dall'Igna, Prof. Dr. Oswaldo Laércio Cruz, Prof. Dr. Luís Lavinsky e Simão Piltcher, pelo auxílio na coleta das amostras.

Ao Prof. Dr. Carlos Thadeu Cerski, por sua importante contribuição na montagem e desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. João Carlos Prolla, pela gentileza e hospitalidade, as quais muito

contribuíram para a execução do projeto.

Às minhas filhas, razões de minha existência, luzes de minha vida, paixões eternas.

À minha mãe, Helena Costa de Carvalho, *in memoriam*, por ter sido a pessoa que segurou minha mão quando eu estava perdida e solitária.

À minha irmã, Ceres Carvalho Marzano, por ser meu exemplo de vida.

Ao doce Hélder dos Santos Corrêa - Deco, por sempre dizer-me o quanto sou especial, ou melhor “mais que especial”, por ficar sempre ao meu lado, por ter aparecido e ancorado em meu porto, por amar-me e deixar-se ser amado, simplesmente por existir e deixar este mundo mais belo e gracioso.

À amiga Paola Feltz Amaro, meu anjo particular, que encanta a tudo e a todos com seu carinho e seu sorriso contagiante.

À amiga Letícia Petersen Schmidt Rosito, por ser um ancoradouro seguro na horas de turbulência

À amiga Lílian Sander - Binha, por ser meu ombro, por me dar seu sorriso, por derramar lágrimas ao meu lado.

À amiga Lisiane Segato Kruse, por sua inestimável contribuição à elaboração de textos e artigos, pelo grande estímulo e confiança e, principalmente, pelas frutíferas horas

dedicadas à discussão de assuntos “científicos”.

À acadêmica de medicina Andréia Argenta, amiga, companheira, por seu auxílio indispensável em todos os nossos trabalhos.

À amiga Sabrina Lima Alves, pelo auxílio na leitura das amostras, mas acima de tudo por sua luz conduzida ao mundo com enormes sorrisos.

Ao amigo Andrei Roberto da Silva, pelos auxílios, acadêmicos e extra-acadêmicos.

Aos, atuais e passados, Residentes do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela dedicação na coleta das amostras utilizadas neste trabalho.

Aos funcionários do Serviço de Otorrinolaringologia e do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por sua ajuda.

Aos serviços de Patologia e Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela cedência de suas instalações.

À Comissão de Seleção do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, pela confiança em mim depositada.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Fundo de Investimento à Pesquisa e Eventos, pelo apoio e financiamento concedido.

Aos pacientes que aceitaram participar dessa pesquisa, pois sem eles nenhuma dessas páginas estaria escrita.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa pesquisa.

Sumário

PARTE I - PRESSUPOSTOS TEÓRICOS

Revisão da Literatura.....	1
1.1 O Vocábulo.....	1
1.2 Definição.....	2
1.3 Epidemiologia.....	2
1.4 Classificação.....	3
1.5 Etiopatogênese.....	4
1.6 Estrutura.....	5
1.7 Biologia do Colesteatoma.....	10
1.8 Angiogênese e Densidade Microvascular: Marcadores de inflamação.	18
1.9 Poder de Erosão Óssea.....	21
1.10 Colágeno e Metaloproteinases.....	24
1.11 Metaloproteinases.....	27

PARTE II - A PESQUISA

Justificativa.....	37
--------------------	----

Objetivos.....	38
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos.....	38
Métodos.....	39
4.1 Delineamento.....	39
4.2 Pacientes.....	39
4.3 Processo de Amostragem.....	40
4.3.1 Cálculo de Tamanho da Amostra.....	41
4.3.2 Critérios de Inclusão.....	42
4.3.3 Critérios de Exclusão.....	42
4.4 Colesteatomas.....	42
4.5 Descrição Histológica.....	44
4.6 Medição da Perimatriz.....	44
4.7 Imunoistoquímica.....	46
4.8 Considerações Éticas.....	48
4.9 Análise Estatística.....	48
Resultados.....	50
5.1 Dados Epidemiológicos.....	50
5.2 Dados Histológicos.....	51
5.3 Dados Imunoistoquímicos.....	54
Discussão.....	60
Conclusões.....	78
Referências Bibliográficas.....	79
Anexos.....	93

Lista de Abreviaturas

Å - Angstrom

β-FGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos

AOMC-HCPA – Ambulatório de Otite Média Crônica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

CD11a - molécula que faz parte da integrina LFA-1 (leukocyte function-associated antigen-1) presente na superfície de leucócitos

CD11b - integrina leucocitária

CD14 - marcador de monócito

CD19 - antígeno linfocitário

CD22 - antígeno de superfície de linfócitos B

CD25 - antígeno linfocitário

CD3 - antígeno linfocitário

CD31 - marcador de células endoteliais

CD34 - marcador de células endoteliais

CD44 - receptor para ácido hialurônico

CD45 - antígeno comum leucocitário

CD51 – receptor de integrina

CD68 – marcador de macrófagos

Ck 16 – Citoqueratina 16

dB - decibel

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EFG – Fator de Crescimento Epitelial

HE – Coloração Histológica em Hematoxilina-Eosina

HLA-DR - molécula do complexo de histocompatibilidade

IGF - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

IL-1 – Interleucina 1

IL-1 α - Interleucina 1 alfa

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

Ki 67 – Antígeno Nuclear

M-CSF - Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos

ME – Microscópio Eletrônico

MIB1 – marcador de proliferação celular

μm – Micrômetro

MMP – Metaloproteinases

MMP2 - Metaloproteinase 2

MMP9 - Metaloproteinase 9

MO – Microscopia Óptica

MT1MMP – Metaloproteinase Trans-membrana

NKCA - Células *Natural Killer*

NO – Óxido Nítrico

OCL – Orelha Contra Lateral

OMC – Otite Média Crônica

OMCC – Otite Média Crônica Colesteatomatosa

OMCNC – Otite Média Crônica Não-Colesteatomatosa

OPG - Osteoprotegerina

OPGL - Ligante de Osteoprotegerina

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

PDGF - Factor de Crescimento Derivado da Plaqueta

PGE₂ - Prostaglandina E2

proMMP – pró-enzima de metaloproteinase

¹⁸³RWTNNFREY - sítio catalítico da metaloproteinase 1

S156C – mutante de substituição de uma serotonina por uma cisteína na posição 156 na
TIMP-3

S181C – mutante de substituição de uma serotonina por uma cisteína na posição 181 na
TIMP-3

SPSS – Statistical Package for Social Science

Terminação C – Terminação Carboxila

Terminação N – Terminação Amino

TGF – Fator de Crescimento Tumoral

TGFβ - Fator de Transformação de Crescimento-beta

TIMP – inibidor tecidual de metaloproteinase

TNF – Fator de Necrose Tumoral

VEGF – Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

Lista de Figuras

- Figura 1: Cortes histológicos de espécimes de colesteatomas, corados em hematoxilina-eosina, mostrando a variabilidade da espessura da perimatriz. A e B - Perimatriz ausente (400x), C e D - Perimatriz muito estreita (200x), E e F – Perimatriz expessa (100x)..... 8
- Figura 2: Otoscopias de dois pacientes do AOMC-HCPA. Em A: Otite Média Crônica Não-Colesteatomatosa. Em B: Otite Média Crônica Colesteatomatosa..... 15
- Figura 3: Cortes transversais de colesteatomas corados em Picrossírios. A – perimatriz; B – matriz; C – conteúdo cístico..... 26
- Figura 4: ativação seqüencial de proMMP. A proMMP é secretada como zimogene inativa e pode ser ativada por proteinases (caminho superior) ou por agentes de não proteolíticos (caminho inferior). A atividade plena resulta da remoção da sobra do propeptídeo por processamento intermolecular. Adaptado de Nagase *et al.* (2006)..... 29
- Figura 5: Resumo dos diferentes tipos de células que produzem MMP e TIMP. A matriz do colesteatoma pode desencadear a resposta imunológica com ativação de diferentes células na perimatriz, tais como macrófagos, fibroblastos, e leucócitos, liberando citocinas, tal como a interleucina-1 (IL-1) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF α). As células imunológicas, ativadas, também podem liberar tanto MMP como TIMP. Sob condições fisiológicas, há um equilíbrio de MMP/TIMP. Reações inflamatórias levam a uma desigualdade entre MMP e para TIMP, podendo levar à remodelação da matriz extracelular. Modelo criado pela autora, adaptado de Nagase *et al.* (2006)..... 32
- Figura 6: Imagem digitalizada de lâmina, com corte transversal de colesteatoma, corada em Hematoxilina-Eosina. Podemos ver suas três partes constituintes: A – perimatriz, B –

matriz, C – conteúdo cístico. Aumento: 100x.....	41
Figura 7: Nessa imagem podemos ver a mesma amostra corada em HE (A), Picrossírios (B). CD31 (C), MMP2 (D), MMP9 (E). Aumento: 40x (A e B), 200x (C e D).....	43
Figura 8: Imagem capturada no programa ImagePro Plus, representando o módulo de medição. Aumento: 100x.....	45
Figura 9: Imagem capturada no programa ImagePro Plus, representando o módulo de quantificação da MMP9. Aumento: 200x.....	47
Figura 10: Fluxograma da inclusão e distribuição da amostra.....	51
Figura 11: Colesteatomas representativos da amostra, ilustrando seus constituintes histológicos. 1 – Perimatriz, 2 – Matriz, 3 – Conteúdo Cístico. A – Colesteatoma epitimpânico, proveniente de paciente do gênero feminino, com 44 anos de idade. Histologicamente apresenta-se como epitélio escamosos estratificado, queratinizado, com média de três camadas de células. Perimatriz ausente. Aumento: 200x. B – Colesteatoma epitimpânico, proveniente de paciente do gênero masculino, com 37 anos de idade. Histologicamente apresenta-se como epitélio escamoso estratificado, queratinizado, com média de seis camadas de células. Perimatriz estreita, fibrótica, com raros linfócitos. Ausência de granuloma. Aumento: 200x. C – Colesteatoma mesotimpânico, proveniente de paciente do gênero feminino, com 35 anos de idade. Histologicamente apresenta-se como epitélio escamoso estratificado, queratinizado, com média de quatro camadas de células. Perimatriz muito estreita, sem fibrose e sem infiltrado inflamatório. Aumento: 200x. D - Colesteatoma mesotimpânico, proveniente de paciente do gênero masculino, com 16 anos de idade. Histologicamente apresenta-se como epitélio escamoso estratificado, queratinizado, com média de seis camadas de células. Perimatriz estreita e delicada, sem fibrose e com infiltrado inflamatório discreto. Aumento: 200x. E - Colesteatoma epitimpânico, proveniente de paciente do gênero feminino, com 11 anos de idade.	

Histologicamente apresenta-se como epitélio escamoso estratificado, queratinizado, com média de doze camadas de células epiteliais. A perimatriz exhibe fibrose densa, infiltrado inflamatório crônico acentuado e está delimitada em seu plano profundo por epitélio cubóide simples. Aumento: 50x. F - Colesteatoma mesotimpânico, proveniente de paciente do gênero feminino, com sete anos de idade. Histologicamente apresenta-se como epitélio escamoso estratificado, queratinizado, com média de treze camadas de células. Perimatriz mostra fibrose discreta com infiltrado inflamatório acentuado e exsudação neutrocitária, estando delimitada em seu plano profundo por epitélio cubóide simples. Ausência de granulomas. Aumento: 50x.....	52
Figura 12: Colesteatoma marcado com CD 31. Aumento: 200x.....	55
Figura 13: Colesteatoma marcado com MMP2 no citoplasma. Aumento: 200x.....	56
Figura 14: Colesteatoma marcado com MMP2 no núcleo. Aumento: 200x.....	57
Figura 15: Colesteatoma marcado com MMP9. Aumento: 200x.....	58
Figura 16: Representação esquemática de possíveis eventos decorrentes de uma retração timpânica, com o toque dessa na cadeia ossicular.....	69
Figura 17: Hipótese de patogênese dos colesteatomas adquiridos.....	77

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparação dos grupos pediátrico e adultos quanto às características histomorfológicas do colesteatoma.....	54
Tabela 2: Comparação das variáveis estudadas entre os grupos Pediátrico e Adulto.....	58
Tabela 3: Correlações encontradas entre as variáveis estudadas.....	59

Lista de Quadros

Quadro 1: Principais hipóteses para a etiopatogênese dos colesteatomas.....	4
--	---

Anexos

Anexo 1: Protocolo de 1ª Consulta no Ambulatório de Otite Média Crônica do HCPA.....	94
Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Informado.....	96
Anexo 3: Carta de Aprovação do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA.....	97
Anexo 4: Descrição demográfica da amostra.....	98
Anexo 5: Artigo para publicação: Comparison of acquired cholesteatomas in adult and pediatric patients using MMP2 and MMP9 markers for immunohistochemistry analysis.....	100
Anexo 6: Carta de recebimento do artigo para publicação.....	128
Anexo 7: CD com coleção histológica.....	129

Resumo

A quantificação da angiogênese e das metaloproteinases pode ser útil na avaliação do comportamento dos colesteatomas, como marcadores de sua agressividade. **Objetivo:** Comparar os marcadores CD31, MMP2 e MMP9 entre pacientes pediátricos e adultos. **Método:** transversal. Grupos pediátricos(até 18 anos) e adultos(a partir de 19 anos). Coletados 120 colesteatomas, fixados em formol a 10%, preparadas cinco lâminas, de cada amostra, por técnicas histológicas habituais, observados: número de vasos sanguíneos(CD 31), marcação com MMP2 e MMP9, número de células na matriz e espessura na perimatriz. Dados analisados no SPSS através coeficiente Spearman, exato de Fisher e Mann-Whitney. **Resultados:** Colesteatomas distribuídos igualmente: 60 pediátricos(11,77±3,57anos); 60 adultos(38,29±14,51anos). CD31pediátrico 7(4 a 11), CD31adulto 4(0 a 10) (P=0,044). MMP2citoplasmática pediátrico 1(0 a 3), MMP2citoplasmática adulto 0(0 a 1) (P=0,006). MMP2nuclear pediátrico 0(0 a 1), MMP2nuclear adulto 0(0 a 1) (P=0,056). MMP9 pediátrico 2(0 a 4), MMP9 adulto 0(0 a 4) (P=0,049). O número de vasos sanguíneos e a quantificação das metaloproteinases estavam fortemente correlacionados com a espessura da perimatriz. **Conclusões:** Os colesteatomas pediátricos apresentam um grau inflamatório mais exacerbado, produzem mais metaloproteinases, fatores estes, que conjugados, poderiam caracterizar os colesteatomas pediátricos como mais agressivos que os colesteatomas adultos. **Palavras-Chave:** Colesteatoma, Perimatriz, Inflamação, Angiogênese, Metaloproteinases

Abstract

Cholesteatoma is an epidermal cyst with three distinct components: matrix, perimatrix and cystic content. The clinical significance of cholesteatoma lies in its association with potential intracranial complications due to bone destruction. Objective: To compare histological and immunohistochemistry analysis between pediatric and adult acquired. Methods: Cross-sectional study. The patients were divided in two groups, according to their age: 60 adults(>18 years old) and 60 children(until 18 years old). The cholesteatomas were fixed in formalin 10%. Five slides from each sample were prepared using standard histology techniques. Slides were analyzed according to average number of blood vessels (CD31), MMP2 and MMP9 positivity and thickness of the perimatrix. Data were analyzed using Mann-Whitney and Fisher's exact tests and Spearman coefficient, with P values<0.05 considered significant. Results: Perimatrix thickness was 78(34-217); CD31 was 6(0-11), cytoplasmic MMP2 positivity was 0(0-2), nuclear MMP2 positivity was 0(0-1); MMP9 positivity was 2(0-4). Statistical difference, between children and adults, was found in perimatrix thickness(P=0.014); blood vessels(P=0.044); cytoplasmic MMP2(P=0.006), nuclear MMP2(P=0.056); MMP9(P=0.049). Conclusions: Pediatric cholesteatomas have a thicker perimatrix, a greater degree of inflammation, and produce more metalloproteinases than those of adult patients, we can suggest, with the combination of these factors, that cholesteatoma is more aggressive in children than in adults.

KEY WORDS: Cholesteatoma, Perimatrix, Inflammation, Angiogenesis, Metalloproteinases

Introdução

O colesteatoma é uma doença caracterizada pela presença de epitélio escamoso estratificado queratinizado no interior de qualquer área pneumatizada do osso temporal (Schuknecht, 1974). Histologicamente, é constituído por matriz (epitélio), perimatriz (tecido conjuntivo subepitelial) e conteúdo cístico (lamelas de queratina) (Lim e Saund, 1972).

Os colesteatomas têm sido tema de numerosos estudos clínicos, cirúrgicos histológicos e experimentais com o objetivo de desvendar suas múltiplas características etipatogênicas e, assim, abortar o seu desenvolvimento ou, quando estabelecido, aprimorar o seu tratamento (Albino *et al.*, 1998b; Aumente *et al.*, 1996; Axon *et al.*, 1999; Bernal-Sprenkelsen *et al.*, 2001; Bollmann *et al.*, 1991; Broekaert *et al.*, 1992; Bujia *et al.*, 1996a; Bujia *et al.*, 1996b; Chao e Shen, 1996; Chole *et al.*, 2001a; Chole *et al.*, 2001b; Chole *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 2003; Cureoglu, 2004; Darrouzedt *et al.*, 2000; Desloge *et al.*, 1997b; Dornelles *et al.*, 2002; Edelstein, 1989; Ergun *et al.*, 1994; Glasscock *et al.*, 1981; Goycoolea *et al.*, 1999; Hamzei *et al.*, 2003; Hildmann e Sudhoff, 1999; Hueb, 1997; Jahnke e Falk, 1976; Jansen, 1978; Junh e Paparella, 1976; Kim e Chung, 1999; Lim e Saunders, 1972; Lino *et al.*, 1998; Marcato *et al.*, 1991; Mayot *et al.*, 1991; Milewski *et al.*, 1998b; Mitrovic, 1991; Palva *et al.*, 1997; Palva *et al.*, 2000; Pereira, 1997; Pereira *et al.*, 2002; Quaranta *et al.*, 1986; Rignér *et al.*, 1991; Scheibe *et al.*, 2002; Schmidt e Hellstrom, 1994; Sheehy, 1978; Sheehy, 1985; Sien, 1996; Stankovic, 2003; Sudhoff *et al.*, 1996; Sudhoff *et al.*, 2000; Sudhoff e Tos,

2000; Tomita, 2000; Toner e Smyth, 1990; Tos, 1983; Vartiainen, 1993). Ainda assim, apesar desta verdadeira enxurrada de publicações acerca desta doença, várias questões restam em aberto. Como exemplo, muito ainda se discute sobre as possíveis diferenças estruturais entre os colesteatomas que se desenvolvem na populações pediátrica e adulta. Estas interrogações obviamente extrapolam a esfera do simples conhecimento da ultra-estrutura desta prevalente patologia com implicações profundas e críticas na sua abordagem clínica e cirúrgica.

A literatura é pródiga em estampar estas dúvidas e uma revisão cuidadosa não revela uma uniformidade de pensamentos e condutas. Ao contrário, as controvérsias sobejam quando o foco da discussão é direcionado à procura da melhor abordagem cirúrgica em crianças com colesteatoma. Jansen (1978), Sheehy (1978) e Glasscock (1981) preferem técnicas cirúrgicas mais conservadoras, com o objetivo de preservação anatômica e funcional das estruturas da orelha média. Jahnke e Falk (1976) e Palva *et al.* (1997) são favoráveis a um manejo mais agressivo para evitar a ocorrência de doença residual ou recorrente e as complicações associadas.

A discussão quanto ao manejo dos colesteatomas está acompanhada de resultados conflitantes em estudos a respeito do comportamento clínico destes, em crianças, quando comparados com os de adultos (Jansen, 1978; Sheehy, 1978; Glasscock, 1981; Jahnke e Falk, 1976; Palva *et al.*, 1997). Muitos autores sugerem que os colesteatomas pediátricos sejam mais agressivos, mostrando uma alta atividade proliferativa e com incidência mais alta de recorrência (Edelstein *et al.*, 1988; Galsscock, 1981; Palva *et al.*, 1997), porém outros reportam baixas taxas de complicação e menores índices de expansão (Sanna *et al.*, 1994; Sheehy, 1978; Tos, 1983). Iwanaga e Yamamoto (1986) sugeriram que o potencial invasivo dos colesteatomas poderia estar diretamente relacionado à atividade colagenolítica da perimatriz. Para Quaranta *et al.* (1986), a patogenia do colesteatoma em crianças está intimamente ligada a essa hipótese, visto que, para estes autores, aparentemente, a otite média

crônica colesteatomatosa é mais agressiva quando ocorre na infância do que quando em adultos. Porém, Hildmann e Sudhoff (1999) sugeriram que as complicações, a destruição ossicular e o comportamento biológico dos colesteatomas possam estar relacionados mais com o estado de pneumatização da mastóide, com a duração da doença e com o grau de inflamação, do que com a idade do paciente. Essa controvérsia persiste porque, até o momento, foram encontradas poucas diferenças histológicas e bioquímicas, porém não conclusivas, que justifiquem essas aparentes divergências clínicas entre as faixas etárias.

Outras questões fundamentais, ainda sem respostas, estão relacionadas à patogênese dos colesteatomas. Qual a origem do epitélio escamoso estratificado? Qual a influência do comportamento invasivo e proliferativo da epiderme? Muitos trabalhos (Bernal-Sprekelsen *et al.*, 2001; Broekaert *et al.*, 1992; Bujia *et al.*, 1996a; Chao e Shen, 1996; Chole *et al.*, 2002; Cureoglu, 2004; Durko e Kaczmarczyk, 2004; Ergun *et al.*, 1994; Goycoolea *et al.*, 1999; Hamzei *et al.*, 2003; Hassmann-Poznanska *et al.*, 2003; Jacob *et al.*, 2001; Kuijpers *et al.*, 1996; Lepercque *et al.*, 1993; Marena e Audfemorte, 1995; Milewski *et al.*, 1998b; Nair *et al.*, 2004; Pereira, 1997; Pereira *et al.*, 2002; Shinoda e Huang, 1995; Sudhoff *et al.*, 1996; Sudhoff e Tos, 2000; Sudhoff *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 1998; Tomita, 2000) tentaram, sem sucesso, responder plenamente a essas interrogações. Acreditamos que um dos caminhos para esclarecê-las poderá ser encontrado no conhecimento aprofundado das características bioquímicas e biofísicas dos colesteatomas.

Meu interesse em estudar os colesteatomas iniciou-se com a implantação, no ano de 2000, do Ambulatório de Otite Média Crônica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (AOMC-HCPA).

Especificamente, o tema dessa tese surgiu durante a realização de minha dissertação de mestrado (Dornelles *et al.*, 2006) na qual encontrei evidências de que há correlação inversa entre o tamanho da perimatriz, medida em micrômetros, com a idade do paciente na data da

cirurgia, e uma correlação direta da perimatriz com o número médio de camadas celulares na matriz. Essas correlações levam-nos a pensar na existência de um estado proliferativo mais acentuado nos colesteatomas pediátricos. Também foi encontrado que o grau de inflamação na perimatriz apresentava correlação com a espessura da perimatriz, ou seja, o grau de inflamação era mais acentuado quanto mais jovem era o paciente à data da cirurgia.

Sendo assim, busco com esta tese aprofundar a análise desses dados, pois a confirmação dessa hipótese indicaria uma maior agressividade dos colesteatomas pediátricos. Além da polêmica em torno do comportamento biológico dos colesteatomas na infância, inexistem, ainda, dados comparativos consistentes, entre crianças e adultos, acerca dos seus componentes histológicos, ultra-estruturas e bioquímicos.

Na tentativa de acrescentar subsídios a essa discussão, decidi dedicar-me a esse projeto que tem como objetivo correlacionar, através da análise imunoistoquímica, o estado inflamatório da perimatriz de colesteatomas adquiridos com a idade do paciente à data da cirurgia.

PARTE I – PRESSUPOSTOS TEÓRICOS

1. Revisão da Literatura

1.1 O Vocábulo

A palavra “colesteatoma” foi utilizada pela primeira vez pelo anatomista alemão Johannes Mueller, em 1838 (*aput Cruz e Costa, 1999*). As raízes deste vocábulo significam *cole* – colesterol; *esteado* – gordura; *oma* – tumor, ou seja, um tumor onde estão presentes tecido gorduroso e cristais de colesterol. Etimologicamente, este termo é completamente incorreto, sendo, inclusive, considerado o segundo termo mais errôneo em otologia (em primeiro está o “neurinoma do acústico”, visto que, na verdade, trata-se de um Schwannoma do nervo vestibular) (*Costa et al., 1992*). O uso dessa denominação é inadequado porque o colesteatoma origina-se de epitélio escamoso queratinizado da membrana timpânica e/ou do conduto auditivo externo, sem presença de cristais de colesterol ou gordura na sua estrutura, além de sua natureza tumoral ser totalmente discutível.

Outras denominações foram sugeridas, como *tumor peroláceo*, por Cruveilhier, em 1829; *margaritoma*, por Craigie, em 1891, *colesteatoma epidérmico* por Cushing, em 1922,

epidermóide por Critchley e Ferguson, em 1928 e *queratoma*, por Shuknecht, em 1974; todos estes termos, apesar de mais adequados e descritivos, não são empregados e o vocábulo colesteatoma é consagrado entre os otologistas (Cruz e Costa, 1999).

1.2 Definição

Os colesteatomas foram definidos por Friedmann, em 1959, como estruturas císticas revestidas por epitélio escamoso estratificado, repousando sobre um estroma fibroso de espessura variável, o qual pode conter alguns elementos do forro mucoso original.

Mais simplesmente, Schuknecht, em 1974, define-os como acúmulo de queratina esfoliada dentro da orelha média ou de qualquer área pneumatizada do osso temporal, nascendo a partir de um epitélio escamoso queratinizado.

1.3 Epidemiologia

A incidência anual de colesteatomas está em torno de 3 por 100.000 em crianças e 9 por 100.000 em adultos, sendo mais predominante no gênero masculino (Tos *et al.* 1989; Kemppainen *et al.*, 1999; Potsic *et al.*, 1997; Quantin *et al.*, 2002).

Dados epidemiológicos mostram uma alta prevalência do colesteatoma entre os caucasianos, seguidos pelos descendentes do povo africano, sendo raramente visto em asiáticos. De acordo com Ratnesar (1977), essa prevalência é bem mais baixa nos esquimós Inuit, sugerindo que suas características anatomomorfológicas poderiam facilitar a aeração da orelha média e prevenir as seqüelas das otites crônicas.

No Ambulatório de Otite Média Crônica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (AOMC-HCPA), dos 700 pacientes acompanhados desde agosto de 2007, 30% eram portadores de Otite Média Crônica Colesteatomatosa (OMCC), apresentando-se bilateralmente em 12% da amostra total. Dos pacientes com OMCC, 45% tinham até 18 anos, considerados, portanto, pediátricos. Quanto ao gênero, encontramos 70% de homens (Dornelles *et al.*, 2004a).

1.4 Classificação

Habitualmente, os colesteatomas são classificados como congênitos e adquiridos, sendo esses subdivididos em primários e secundários.

Os congênitos são restos epiteliais, encontrados, geralmente, em orelhas com membranas timpânicas intactas e sem história prévia de infecções (Derlacki e Clemis, 1965). De acordo com Valvassori (1974), são encontrados em quatro regiões do osso temporal: tímpano-mastoideo, ápice petroso, ângulo pontocerebelar e forame jugular. Há ainda uma quinta localização, descrita por Sobol (1980), o qual relatou a existência de pequenas pérolas epiteliais entre as camadas da membrana timpânica.

Os colesteatomas adquiridos primários seriam decorrentes de retrações timpânicas, que acumulariam epitélio descamado e perderiam seu poder de autolimpeza. Já os secundários seriam formados a partir da migração do epitélio através de uma perfuração marginal na membrana timpânica (Costa e Dornelles, 2006)

Um profundo entendimento sobre a patogênese do colesteatoma da orelha média é particularmente importante, visto que sua natureza destrutiva é responsável por muitas das complicações. A tendência de erosão óssea dos colesteatomas e a falta de um tratamento não-

cirúrgico justificam a importância da investigação dos mecanismos básicos relacionados ao desenvolvimento da otite média crônica colesteatomatosa.

1.5 Etiopatogênese

Ferlito (1997) descreve que seriam necessárias três condições predisponentes para o desenvolvimento de um colesteatoma: a) o encontro de dois epitélios diferentes na fenda auditiva; b) a destruição crônica da camada submucosa da orelha média pelos processos infeccioso e inflamatório; c) o processo de cicatrização ou fase de proliferação.

Porém, a etiopatogênese dos colesteatomas é ainda muito discutida, havendo, basicamente, seis hipóteses principais (Quadro 1), as quais geram controvérsia há mais de 100 anos.

Quadro 1: Principais hipóteses para a etiopatogênese dos colesteatomas

Hipótese	Autor	Ano
Colesteatomas congênitos	Korner e Virchow	1863
Metaplasia	Wendt	1873
Migração	Habermann	1889
	Bezold	1889
Invaginação	Bezold	1908
Hiperplasia	Manasse	1917
Implantação	Schöer	1958

Adaptado de Cruz e Costa, 1999

Existem diversos estudos a respeito da patogênese dos colesteatomas, porém ainda resta muito a ser esclarecido (Sculerati e Bluestone, 1989). Conforme observações no AOMC-HCPA, e vários trabalhos deste grupo (Dornelles *et al.*, 2002; Dornelles *et al.*, 2003; Dornelles *et al.*, 2004a; Hemb *et al.*, 2003; Schweiger *et al.*, 2003; Matter *et al.*, 2003;

Schmidt *et al.*, 2002; Costa, Petersen e Dornelles, 2007), essas hipóteses, individualmente, não explicariam a patogênese de todos os colesteatomas.

É inequívoca a existência de colesteatomas congênitos e o surgimento de colesteatomas por invaginação e por implantação, mas essas situações não poderiam ser responsáveis por todos os casos de OMCC. Acreditamos que a patogênese dos colesteatomas, na verdade, envolveria várias dessas hipóteses agregadas (Quadro 1), podendo haver a interposição de duas ou mais delas em um mesmo paciente.

Em consequência dessa constatação, parece-nos que a hipótese do *continuum*, postulada pelo Dr. Michael Paparella, em 1970, aproxima-se de uma concepção multifatorial, mais abrangente de patogênese. Segundo essa, a otite média pareceria existir ao longo de uma série contínua de eventos epiteliais e subepiteliais, onde, após um insulto inicial, uma otite serosa ou purulenta tornar-se-ia seromucóide, mucóide e, finalmente, caso não houvesse regressão espontânea ou terapêutica do quadro, sobreviria a cronificação (Costa, 1991). Podemos dizer, baseados nessa hipótese, que o colesteatoma é a apoteose de uma única patologia da orelha média, a otite média crônica, e não, portanto, um evento isolado (Dornelles *et al.*, 2006).

1.6 Estrutura

O colesteatoma, macroscopicamente, é uma lesão cística redonda ou oval com configuração e tamanho variáveis. Ferlito *et al.* (1997) caracterizaram o colesteatoma como um cisto epidermóide, de crescimento independente e progressivo, com destruição dos tecidos adjacentes, em especial o tecido ósseo, com tendência a recorrer.

O advento da microscopia eletrônica de transmissão possibilitou muitos avanços no

conhecimento da estrutura celular. Utilizando esse instrumento, em 1972, Lim e Saunders apresentaram uma descrição histológica detalhada dos colesteatomas. Descreveram que o colesteatoma possui um epitélio escamoso estratificado queratinizado, com as quatro camadas idênticas às da epiderme normal (basal, espinhosa, granulosa e córnea), células de Langerhans (em maior quantidade do que na epiderme normal) e grânulos querato-hialinos. Chamaram este epitélio de matriz do colesteatoma. Observaram, ainda, a presença de um tecido conjuntivo, contendo fibras colágenas, fibrócitos e células inflamatórias, que foi denominado de perimatriz, a qual estava em contato, na maioria dos casos, com uma camada de células escamosas ou cilíndricas ciliadas, remanescentes da mucosa original da orelha média. Em alguns casos, apesar de a perimatriz estar ausente à microscopia óptica, fazia-se presente quando estudada com o microscópio eletrônico de transmissão, mostrando-se extremamente fina, com as fibras colágenas praticamente ausentes e contendo cristais de carbonato de cálcio. Já em trabalho realizado por Paludetti *et al.* (1989), os autores descrevem a perimatriz como um tecido de granulação ou tecido conectivo subepitelial inflamado.

Segundo Milewski *et al.* (1998b), o crescimento de um colesteatoma poderia requerer angiogênese no tecido conjuntivo da perimatriz, e que, células e substâncias da cascata de cicatrização poderiam ter um importante papel no desenvolvimento e crescimento dos colesteatomas. Esses processos envolveriam o fator de crescimento fibroblástico b (b-FGF), o qual, segundo esses autores, poderia estimular a produção de metaloproteinase (MMP). Sugeriram, ainda, que a persistência da inflamação causaria um processo permanente de cicatrização na perimatriz, a proliferação de fibroblastos (tecido de granulação) e do epitélio (matriz).

Ferlito *et al.* (1997) descrevem a perimatriz como a porção mais periférica do colesteatoma, constituída de tecido de granulação ou tecido conjuntivo subepitelial inflamatório, com linfócitos, histiócitos e neutrófilos. Sprekelsen *et al.* (2001) afirmam que a

matriz e a perimatriz, em tecidos normais ou patológicos, são formadas por colágeno tipo IV, tenascina, fibronectina, b-FGF e metaloproteinases. Segundo Jacob *et al.* (2001), o incremento na proliferação da matriz do colesteatoma seria resultado do processo de inflamação, sugerindo que a perimatriz seria o principal fator para o crescimento dos colesteatomas.

Resumidamente, podemos definir a perimatriz como uma rede inflamatória que envolve o colesteatoma. A Figura 1, a seguir, apresenta cortes histológicos de colesteatomas, onde podemos ver seus componentes estruturais: a perimatriz, a matriz e o conteúdo cístico.

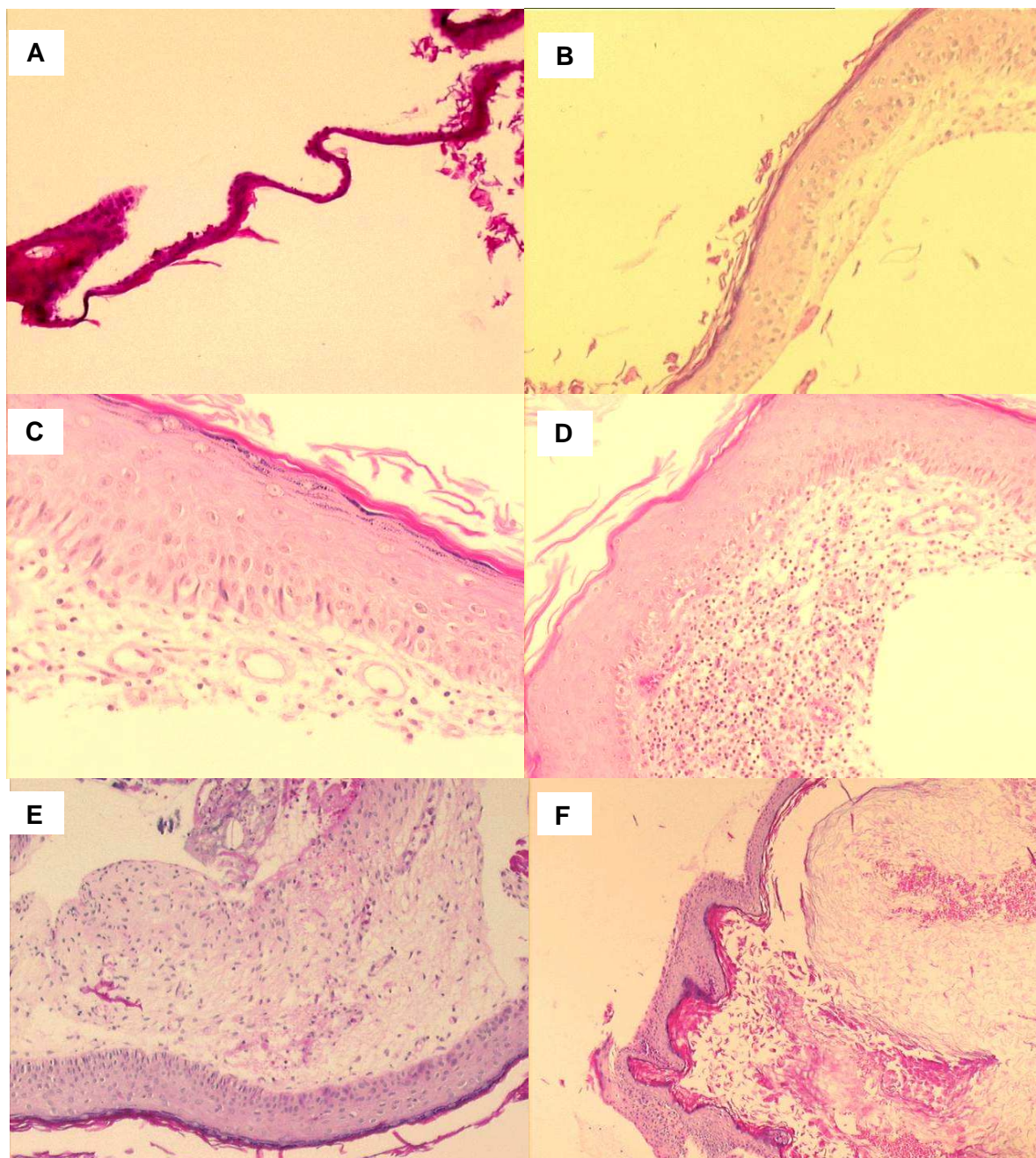


Figura 1: Cortes histológicos de espécimes de colesteatomas, corados em hematoxilina-eosina, mostrando a variabilidade da espessura da perimatriz. **A e B** - Perimatriz ausente (400x), **C e D** - Perimatriz muito fina (200x), **E e F** - Perimatriz espessa (100x).

Foi com o intuito de buscar algumas respostas para as indagações acerca da patogênese da OMCC que realizamos o estudo histológico dos colesteatomas, bem como a comparação dos achados entre as faixas etárias (Dornelles *et al.*, 2006). Para tanto, foram coletados os dados do número médio de camadas celulares e presença de hiperplasia na

matriz; espessura e epitélio delimitante da perimatriz, fibrose, inflamação e granuloma na perimatriz.

Dornelles *et al.* (2006) encontraram uma grande variabilidade na espessura da perimatriz dos colesteatomas, tanto intrapacientes, ou seja, num mesmo espécime encontramos regiões mais delgadas do que outras; quanto interpacientes. Ao microscópio óptico, as espessuras médias variaram desde expressivamente delicadas, por nós consideradas igual a zero, até extremamente espessas (1.926 micrômetros). Nesse estudo, dentre os 57 colesteatomas da amostra, foram encontrados apenas quatro com perimatriz tão fina que não puderam ser medidas, sendo consideradas com espessura igual a zero, havendo mais casos de ausência no grupo de adultos (13, 35, 37 e 53 anos). Além disso, ao utilizar o coeficiente de Spearman entre a idade do paciente à cirurgia e a espessura da perimatriz, foram encontradas correlações moderadas e inversas, fato que demonstra que a espessura da perimatriz diminui conforme aumenta a idade do paciente.

Pereira *et al.* (2002) também confirmaram encontrarem diferenças na espessura da perimatriz dos colesteatomas de sua amostra, observando que um número significativamente maior de colesteatomas provenientes de adultos apresentava perimatriz visível à microscopia óptica.

As funções fisiológicas das macromoléculas da perimatriz estão relacionadas com adesão, migração, crescimento e diferenciação celulares (Olszewska *et al.*, 2004). A partir dessas características, e considerando que a ação das metaloproteinases pode ser um dos fatores envolvidos na erosão óssea, universalmente encontrada nas otites médias colesteatomatosas e que clinicamente esta doença poderia ser mais agressiva em crianças do que em adultos, buscamos, através de medidas objetivas, verificar se havia correlação da espessura da perimatriz com a idade do paciente à cirurgia. Uma diminuição dessa, em

crianças, poderia ser explicada por uma menor quantidade das fibras de colágeno, causada, por sua vez, pela ação de metaloproteinases.

Através das descrições da estrutura dos colesteatomas relatadas (Lim e Saunders, 1972; Paludetti *et al.*, 1989; Ferlito *et al.*, 1997; Sprekelsen *et al.*, 2001; Dornelles *et al.*, 2006) constata-se que a perimatriz é constituída por vários outros elementos, além das fibras de colágeno, é nessa região do colesteatoma que também encontramos as células inflamatórias. A inflamação, que geralmente acompanha o quadro clínico de pacientes com colesteatoma, representa uma seqüência de complexos e inter-relacionados eventos decorrentes de lesão tecidual, podendo ser induzida por diferentes estímulos (Olszewska *et al.*, 2004). A resposta inflamatória é essencial para reparar e restaurar a estrutura e função do tecido lesado; em situações onde haja a persistência do estímulo inflamatório, essa resposta pode tornar-se crônica, resultando em alteração patológica no comportamento tecidual (Wysocki *et al.*, 1998).

1.7 Biologia do Colesteatoma

O estudo das células, em microscopia óptica e eletrônica, pode dar a impressão enganosa de que essas são estruturas estáticas. Porém, ao contrário, muitos processos e movimentos estão constantemente acontecendo na intimidade celular, ocorrendo em alguns tecidos de forma mais rápida, em outros mais vagarosamente. É fácil compreender que, à medida que as células vão se diferenciando, paralelamente vão adquirindo certas particularidades estruturais e fisiológicas.

Os epitélios são tecidos com vida limitada, com renovação constante, decorrente de uma atividade mitótica contínua. A velocidade dessa reposição celular é variável, podendo ser de dois a 50 dias, dependendo do tecido considerado (Junqueira e Carneiro, 1985).

Já o tecido conjuntivo, constituinte da perimatriz do colesteatoma, apresenta um processo de crescimento mais complexo, pois é formado por diversos tipos de células – fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, leucócitos – separadas por abundante material intercelular. A riqueza desse material é uma das suas características mais importantes. Constitui-se por uma parte com estrutura microscópica definida – fibras do conjuntivo – e por outra não estruturada – substância fundamental amorfa (Junqueira e Carneiro, 1985). Por toda essa complexidade, é de se esperar que o processo de renovação desse tecido seja bastante elaborado.

Dentre os três constituintes do colesteatoma, a perimatriz é a que possui histomorfologia mais variável; também é o local onde encontra-se o processo inflamatório e a produção de enzimas osteolíticas; constitui-se na verdadeira interface entre o colesteatoma e a orelha média, chamada por Dornelles *et al.* (2006) de “campo de batalha”.

O colesteatoma poderia ser resultado de um descontrole da proliferação celular (Ferlito *et al.*, 1997) decorrente de uma desordem no controle do crescimento celular, compreendendo uma série de complexos e dinâmicos eventos envolvendo componentes celulares e extracelulares com alterações em seu comportamento biológico, como desregulação dos queratinócitos (Vennix *et al.*, 1996), os quais apresentam um crescimento hiperproliferativo e alterações na diferenciação celular. Determinar a existência de defeitos na sua biologia, bioquímica e genética é crítico para o conhecimento da sua patogênese.

A capacidade de invasão, migração, alteração na diferenciação, proliferação e recorrência dos colesteatomas é muito similar às neoplasias, porém há relutância, entre os pesquisadores, em aceitar o enquadramento dos colesteatomas nessa categoria (Desloge *et al.*, 1997a; Albino *et al.*, 1998b). Para os colesteatomas serem considerados uma lesão neoplásica é necessário a evidência de instabilidade genética; esta pode ser manifestada através de alterações no DNA ou de anormalidades cromossômicas específicas. Em 1995, Shinoda e

Huang detectaram a proteína p53 em colesteatomas, sugerindo que estes poderiam ser tumorais. Porém, Desloge *et al.* (1997a) demonstraram não haver alterações no DNA, descartando, assim, essa hipótese.

Como as pesquisas citadas não indicam nenhuma instabilidade genética dessas lesões, devemos investigar uma outra possível razão para o desenvolvimento da OMCC, sendo necessário perguntar sobre a origem do epitélio escamoso queratinizado nos colesteatomas. Para estudar essa questão, muitas investigações utilizando análise imunoistoquímica têm sido realizadas para comparar a localização de marcadores de diferenciação nos colesteatomas e na pele do canal auditivo externo. Devido às propriedades apresentadas pelas citoqueratinas, essas têm sido consideradas, por alguns investigadores como um dos melhores instrumentos para este propósito (Bujia *et al.*, 1993; Kuijpers *et al.*, 1996; Vernnix *et al.*, 1996).

As citoqueratinas são proteínas que constituem uma das duas categorias de filamentos intermediários, localizados no citoplasma das células epiteliais; possuem vinte subclasses, sendo sua expressão dependente do tipo de epitélio e do seu estágio de diferenciação (Moll *et al.*, 1982). Pereira (1997), Albino *et al.* (1998b) e Kim e Chung (1999) relatam que a matriz dos colesteatomas expressa citoqueratina 16 (CK16) nas camadas suprabasais, sendo que a expressão deste filamento protéico é característica de epitélios hiperproliferativos. Lepercque *et al.* (1993) descrevem que a CK16 não aparece no epitélio normal, a não ser em áreas sob pressão e atrito, ou no epitélio de revestimento dos folículos pilosos. Segundo Broekaert *et al.* (1992), a CK16 é expressa em regiões específicas, como o anel timpânico e as regiões medial e inferior do meato acústico externo. A presença de CK16 na matriz do colesteatoma poderia indicar seu comportamento hiperproliferativo, semelhante ao de algumas doenças epidérmicas, mesmo que o aspecto histológico do colesteatoma seja igual ao da epiderme normal. De acordo com Albino *et al.* (1998a), o colesteatoma forma-se como decorrência da tentativa de reparar uma lesão, o que poderia explicar a presença de CK16, caracterizando

este epitélio como imaturo com predomínio de proliferação celular. Kujipers *et al.* (1996) analisaram o padrão de citoqueratinas e sugeriram que a matriz do colesteatoma não é resultado de uma mudança metaplásica. Em seu estudo, encontraram um epitélio semelhante ao da membrana timpânica e ao da pele do canal auditivo externo, mas em diferentes estágios de proliferação, dependendo do grau de inflamação presente.

Um sinal característico dos colesteatomas é a infiltração da perimatriz por células do sistema imune. Piltcher (2000), em sua tese sobre citocinas na otite média crônica com efusão, afirma que, além dos já conhecidos fatores de risco, como a disfunção tubária e as infecções, muitas pesquisas sobre otite média têm-se direcionado ao estudo dos diferentes componentes da resposta inflamatória. O ponto fundamental é se a inflamação deve ser considerada apenas como um processo de defesa ou se ela tem papel na perpetuação da otite média crônica colesteatomatosa.

Milewski (1998a) sugeriu que as citocinas inflamatórias, os fibroblastos e os macrófagos seriam os responsáveis pela origem, crescimento e destruição óssea dos colesteatomas. Várias citocinas e fatores de crescimento poderiam estar envolvidos no mecanismo de proliferação e desenvolvimento do epitélio do colesteatoma (Aumente *et al.*, 1996; Bujia *et al.*, 1996b).

Tomita (2000) afirma que existem várias hipóteses de que os fatores de crescimento e as citocinas, presentes nos colesteatomas, induzam a ativação de genes, como o *c-myc*, causando a desregulação da proliferação celular. Sudhoff *et al.* (1997) investigaram a distribuição e expressão do fator de crescimento tumoral (TGF-alfa), do fator de crescimento epitelial (EGF-R) e do oncogene *c-myc* em células epiteliais normais da orelha média e em colesteatomas. Estes fatores foram encontrados na matriz de colesteatomas, porém não em células normais. Além da regulação autócrina do epitélio, pela produção de fator de

crescimento epitelial (EGF), a hiperproliferação do colesteatoma poderia depender da interação do tecido subepitelial e das mudanças inflamatórias que ocorrem nessa doença.

Uma característica comum na patogênese dos vários tipos de colesteatomas é a presença de bactérias. A presença de bactérias poderia promover um vínculo crítico entre o colesteatoma e o hospedeiro, impedindo que o epitélio neoformado concluísse o seu processo de diferenciação, o que o deixaria em um estado quiescente, minimamente proliferativo, sem ser migratório ou invasivo nessa etapa (Chole e Faddis, 2002). As interações entre células inflamatórias e o epitélio do colesteatoma poderiam ser responsáveis pela indução das características biológicas aberrantes dessa doença.

Chole e Faddis (2002) estudaram, por microscopia eletrônica de transmissão, 24 colesteatomas humanos e 22 de esquilo da Mongólia (gerbil). Das amostras provenientes de humanos, 16 apresentaram achados histológicos consistentes com bactérias em biofilme, enquanto no material de gerbil, 21 mostraram evidências dessa forma. Esse achado poderia estar relacionado com a atividade dos colesteatomas, principalmente com as infecções persistentes ou recorrentes e com sua resistência aos antimicrobianos tópicos e sistêmicos. Os autores sugeriram que a matriz do colesteatoma é um meio ideal para o desenvolvimento de um misto de biofilme microbiológico. Estes autores afirmam, ainda, que as bactérias com biofilme são resistentes aos antibióticos por mecanismos diferentes dos usados por bactérias planctônicas, porém o exato mecanismo de resistência das colônias de bactérias em biofilme é desconhecido.

Os estudos publicados até agora apresentam alguns dados a respeito da biologia dos colesteatomas, porém muitas dúvidas persistem. Como anteriormente referido, os colesteatomas apresentam características neoplásicas (invasão, migração, alteração na diferenciação), mas, até o momento, não foi encontrada nenhuma comprovação de instabilidades genéticas na sua estrutura, fato que descarta a possibilidade de enquadrá-los

como neoplasia. Uma possível resposta para suas características de agressividade e crescimento descontrolado dos colesteatomas seja a hiperproliferação da matriz. Além desse fato, citocinas relacionadas às células inflamatórias da perimatriz, representam um forte candidato ao papel de ator principal dessa trama intrincada de mecanismos. Todas essas hipóteses levam-nos a considerar a complexidade envolvida na biologia dos colesteatomas e, conseqüentemente, ao emaranhado de eventos relacionados a sua patogênese.

Neste ponto instiga-nos uma indagação: qual seria o papel das características intrínsecas dos indivíduos na patogênese dos colesteatomas? Na Figura 2 podemos ver duas otoscopias digitais. Em A está representada uma OMCNC e em B, uma OMCC.

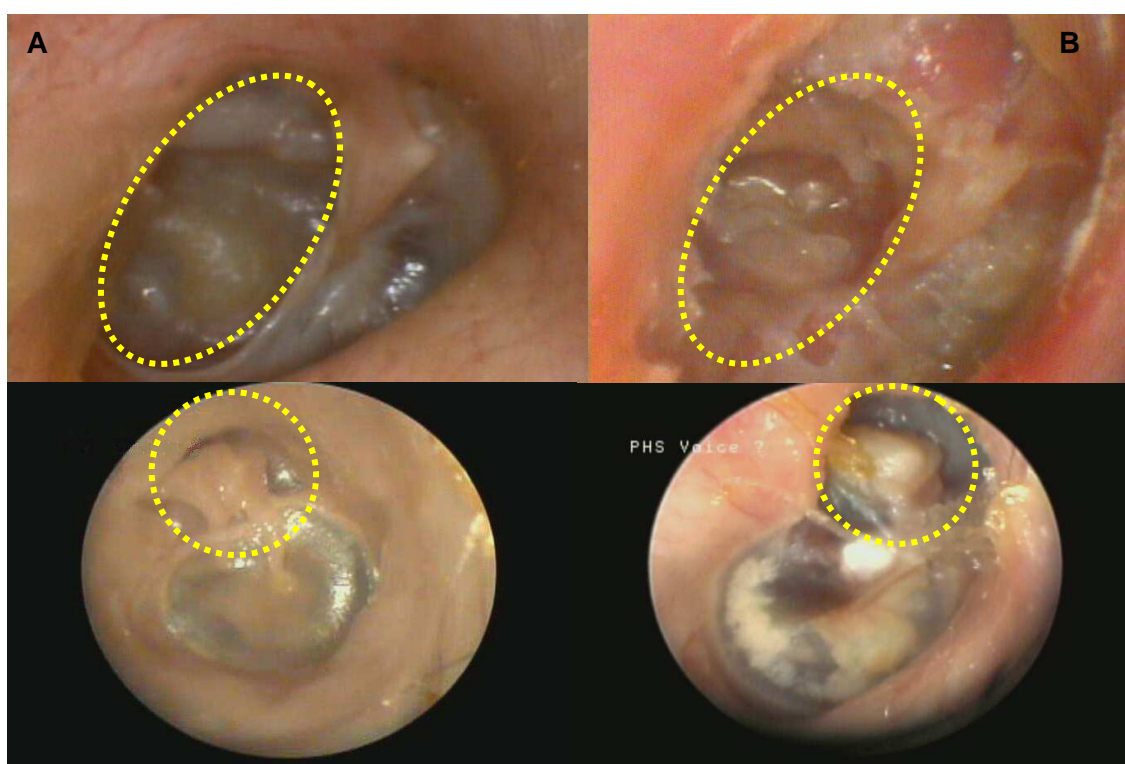


Figura 2: Otoscopias de dois pacientes do AOMC-HCPA. Em A: Otite Média Crônica Não-Colesteatomatosa. Em B: Otite Média Crônica Colesteatomatosa

As semelhanças entre essas duas imagens são impressionantes, fato que não ocorre somente nestas fotos, mas que também é constante na prática clínica. Entretanto, é de se questionar por que no primeiro paciente o processo, até esse momento, se estabilizou em uma

retração severa, porém seca, e não se desenvolveu o colesteatoma, como no segundo paciente? Apesar dos muitos estudos já citados, os mecanismos que levariam ao surgimento de um colesteatoma ainda não foram bem determinados.

Sabemos que, para o desenvolvimento do colesteatoma, uma das condições necessárias é o encontro de dois epitélios dentro da orelha média (Ferlito, 1997); parece-nos claro, porém, que esta condição é insuficiente.

Uma evidência de que há inúmeros fatores, intrínsecos e extrínsecos, envolvidos na patogênese dos colesteatomas são os trabalhos experimentais com animais. Apesar de serem submetidos às mesmas condições, as cobaias não apresentam uma incidência plena de colesteatomas. Wright *et al.* (1985) conseguiram 39%; Wolfman e Chole (1986), 40,6%; Vassali *et al.* (1988), 54,1%; Huang *et al.* (1988), 76,1%; de Jove *et al.* (1990), 75%; Meyerhoff *et al.* (1990), 66,6%; Sobol (1980), 53,5%; Pownell *et al.* (1994), 50%; Schimdt e Hellstrom (1994), 89,5%; White *et al.* (1995), 70,6% e Hueb (1997), 53,5%.

Dentre estes trabalhos, o de Hueb (1997) apresenta muitos dados interessantes sobre o tema dessa tese. Esse autor realizou um estudo experimental com chinchilas, tendo como objetivo o estabelecimento de um novo modelo animal para o desenvolvimento de colesteatoma através de uma perfuração timpânica, utilizando uma “ponte facilitadora” para a migração do epitélio ao interior da orelha média e um irritante tecidual (estímulo inflamatório). Nesse procedimento, em quase metade dos animais (46,5%) houve fechamento da perfuração da membrana timpânica através da migração de células do epitélio escamoso sobre a efusão organizada. Nos animais com maior sobrevida, observou-se a recuperação da orelha média, após a interrupção do estímulo inflamatório. Hueb (1997) relata, ainda, que a presença de colesteatoma ocorreu, predominantemente, na bula timpânica anterior, região onde foi observada uma reação inflamatória mais intensa.

Parece-nos claro o envolvimento da inflamação na patogênese da OMCC, pois a persistência dessa poderia perpetuar o processo de cicatrização e proliferação epitelial na matriz do colesteatoma (Milewsky, 1998). Tomita (2000) afirma que a inflamação foi um fenômeno constante, na sua amostra em estudo, e sugere que essa talvez se constitua no único parâmetro que possa ser correlacionado com o caráter agressivo dos colesteatomas.

No caso da otite média crônica, as defesas do sistema imune, provenientes da mucosa da orelha média, são recrutadas e contribuem para a patogênese do colesteatoma (Mayot *et al.*, 1991), podendo a inflamação da perimatriz contribuir para o comportamento aberrante do colesteatoma (Palva, 1997). Alguns autores acreditam que haja a necessidade do tecido inflamatório de granulação (perimatriz) para que ocorra a erosão óssea, característica na otite média crônica colesteatomatosa (Swartz, 1984; Mafee, 1993; Jung, 2002).

O papel desempenhado pela perimatriz no estabelecimento da agressividade dos colesteatomas já havia sido aventado por Quaranta *et al.* (1986), tendo esses autores sugerido que as diferenças clínicas dos colesteatomas entre crianças e adultos poderiam estar relacionadas às características histomorfológicas da perimatriz, e que esta exerceria um importante papel no desenvolvimento do colesteatoma. Corroborando essa hipótese, Jacob *et al.* (2001) sugeriram que o crescimento do colesteatoma não seria estimulado pela matriz, mas sim decorrente do processo inflamatório. A persistência da inflamação causaria um processo contínuo de cicatrização na perimatriz, com conseqüente aumento no nível das citocinas (moléculas de inflamação e da resposta imune).

A existência de citocinas nos colesteatomas foi comprovada com a imunolocalização de cinco diferentes tipos dessas moléculas na perimatriz (Marenda e Aufdermorte, 1995). As citocinas, dentre outros fatores, poderiam ser responsáveis pelo crescimento do colesteatoma e pela destruição óssea por esse causada (Milewski, 1998a; Michaels, 1989 e Ferlito, 1997). Baseados nos achados de Lazarus *et al.* (1969), os quais sugeriram que a atividade química da

perimatriz tem um papel na absorção óssea, Gantz *et al.* (1979), demonstraram que as células mononucleares inflamatórias produzem enzimas colagenolíticas. A importância da perimatriz na reabsorção óssea também foi destacada por Abramson *et al.* (1975), tendo sido esses autores os primeiros a sugerir que o potencial de infiltração dos colesteatomas estaria correlacionado com atividades quimioenzimáticas da perimatriz.

1.8 Angiogênese e Densidade Microvascular: Marcadores de Inflamação

Um processo inflamatório pode ser quantificado, indiretamente, pela angiogênese, que consiste na formação de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes. Este processo depende da proliferação de células endoteliais, que são as células de revestimento dos vasos sanguíneos (Meurer, 2003; Folkman, 1986; Folkman, 1990; Folkman, 1995a).

A angiogênese é fundamental para o desenvolvimento normal e a homeostasia dos tecidos. Existe nos tecidos normais do organismo em resposta a certos estímulos fisiológicos. Por exemplo, ocorre durante o processo inicial de cicatrização de uma ferida, em sua forma fisiológica, é essencial ao desenvolvimento tecidual, reprodução e cicatrização de feridas (Folkman, 1986; Folkman, 1990; Folkman, 1995a).

No entanto, ao contrário destes processos auto-limitados e controlados no tempo, a angiogênese patológica intervém ativamente na patogênese de certas doenças, incluindo artrites, doenças de foro dermatológico, neo-vascularizações oculares e neoplasias malignas. Nessas condições patológicas, a angiogênese persiste durante meses ou anos, e raramente termina espontaneamente. Teoriza-se que, nos tumores malignos, as células endoteliais se encontram em estado dormente durante algum tempo e que, em presença de certos fatores e estímulos apropriados, passam a uma fase de crescimento ativo com a resultante neo-vascularização (Meurer, 2003).

Está demonstrado que o crescimento progressivo dos tumores e a eventual migração de células tumorais para zonas distantes, são mecanismos dependentes, em larga escala, da angiogênese. O aparecimento de atividade angiogênica num tumor é um processo independente que ocorre naturalmente, e é um dos vários estágios de evolução das doenças oncogênicas ou pré-oncogênicas (Folkman, 1971). As neoplasias crescem de forma avascular até atingir um a dois milímetros de diâmetro, obtendo oxigênio e nutrientes por difusão passiva. Em dado momento, adquirem o fenótipo angiogênico, e começam a recrutar vasos maduros adjacentes, que passam a emitir brotamentos vasculares que, então, permeiam o tumor (Kerbel, 2000).

Teorias fisiopatológicas sobre a angiogênese (Dameron *et al.*, 1994; Folkman, 1995b; Folkman, 1996; Hanahan e Folkman, 1996; Iliopoulos *et al.*, 1996; Volpert *et al.*, 1995) salientam o fato dessa depender, em última análise, de um equilíbrio delicado entre fatores estimuladores e fatores inibidores. De acordo com esse princípio, a angiogênese pode ser o resultado de um excesso de atividade dos fatores estimuladores ou de uma redução da atividade dos fatores inibidores da neo-vascularização. Cao *et al.* (1996) consideram, por exemplo, que em condições de hipóxia, células normais reagem induzindo a formação de VEGF, um fator pró-angiogênico. Para Folkman (1996), o estado de dormência poderia ser atribuído a um balanço do fenômeno de neoformação vascular, prevalecendo o efeito antiangiogênico. Através de estudo experimental, Folkman (1986) conseguiu caracterizar a chamada angiostatina, que tem grande capacidade de inibir a proliferação de células endoteliais (Thompson, 2001; von Bulow *et al.*, 2001).

Os reguladores positivos da angiogênese podem-se dividir, esquematicamente, em dois grandes subgrupos: os fatores de crescimento e as citocinas. Foram identificadas dezenas dessas moléculas, e em algumas a seqüência genética já é conhecida, e a respectiva clonagem já é possível. Entre os fatores de crescimento salientam-se o fator de crescimento fibroblástico

básico (bFGF), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), e fatores estimulantes da multiplicação de granulócitos e monócitos (GM-CSF). Entre as citocinas, destaca-se a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 8 (IL-8).

Embora a quantificação da angiogênese tenha sido realizada mais extensamente no estudo de neoplasias, compreendendo a maioria dos tipos tumorais, muitos apresentam resultados contraditórios (Meurer, 2003), além do que estudos em colesteatomas são escassos.

A metodologia proposta por Vermeulen *et al.*, em 1996, para a quantificação da angiogênese, e que têm mostrado bons resultados, inclui a seleção de zonas com grande proliferação vascular, chamadas de *hot spot*, na margem invasiva do tumor (Meurer, 2003). Os cortes, corados pelo CD31 seriam observados em pequenos aumentos, e estas zonas, uma vez reconhecidas, seriam submetidas à contagem em grande aumento, de 200 vezes (Meurer, 2003). Neste método, células endoteliais, ou grupos de células endoteliais, claramente separados de microvasos adjacentes devem ser considerados como microvasos e contados (Vermeulen *et al.*, 1996). Esta metodologia está amplamente baseada no estudo de Weidner *et al.* (1991) em carcinomas mamários, onde a contagem de vasos mostrou-se como possível fator preditor de doença metastática.

Uma alternativa para este exaustivo método foi testada por Fox *et al.*, em 1995, na qual, após a seleção do *hot spot*, uma ocular contendo 25 pontos aleatórios é rodada de maneira que o máximo de pontos está sobre ou dentro de vasos, e estes são contados. Esta metodologia foi chamada de contagem de pontos de Chalkley. Os resultados obtidos nessa metodologia obtiveram boa correlação com a contagem por análise de imagem e com a contagem manual, mostrou-se como fator preditor independente de prognóstico (Fox *et al.*, 1995).

Kuczkowski *et al.* (2004) apresentaram os resultados de uma avaliação

imunomorfológica de 31 colesteatomas, divididos em três grupos (quatro congênitos, 19 adquiridos primários, oito adquiridos secundários). Utilizaram o anticorpo CD31, para quantificar tecido vascular nos três tipos de colesteatomas, tanto na matriz como na perimatriz, não encontrando diferença de angiogênese entre os grupos.

Olszewska *et al.* (2004b), utilizando outro marcador de angiogênese (CD34) fizeram uma comparação entre colesteatomas, tecido de granulação e pele normal e encontraram a angiogênese aumentada nos colesteatomas.

1.9 Poder de Erosão Óssea

Conforme Fisch (1984), as complicações causadas pelos colesteatomas podem ser divididas em dois grupos: as intracraniais – meningites, abscessos e trombose do seio venoso – e as do osso temporal – mastoidite, fístula labiríntica, paralisia do nervo facial, labirintites e destruição ossicular.

Os colesteatomas apresentam grande poder de erosão óssea (Sadé e Halevy, 1974; Bretlau *et al.*, 1982). Usualmente atingem a cadeia ossicular e, menos freqüentemente, os ossos do crânio, inclusive o osso mais rígido do corpo humano, a cápsula ótica, o que demonstra sua forte ação destrutiva sobre o tecido ósseo. A destruição parcial ou total dos ossículos é observada em cerca de 80% dos pacientes com colesteatoma, ao passo que na otite média crônica não-colesteatomatosa há erosão da cadeia ossicular em aproximadamente 20% dos casos (Chole, 1997; Costa, 1991). Os mecanismos que levam a esse aumento na degradação óssea e invasão ainda estão em investigação (Dornelles *et al.*, 2002).

Segundo Swartz (1984), a destruição ossicular é a mais comum entre as complicações dos colesteatomas, sendo que o tipo de destruição depende da sua origem e do seu modo de

expansão. Segundo seus dados, a cadeia ossicular está intacta em apenas 26% dos colesteatomas aticais, sendo o processo longo da bigorna a região mais afetada, seguida pelo corpo da bigorna e a cabeça do martelo. Já os colesteatomas da parte tensa apresentam um poder de erosão de 90%.

Sadé e Berco (1974) realizaram exame histológico em 80 ossículos, obtidos em cirurgia, sendo 41 desses provenientes de pacientes com OMCNC, e 39 de OMCC. A erosão óssea foi encontrada em 42,5% dos ossículos de pacientes sem colesteatoma e em 84% dos pacientes com colesteatoma, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($P < 0,0001$). Em estudo de Prescott (1999), foram acompanhadas 81 crianças com Otite Média Crônica Colesteatomatosa; de um total de 96 colesteatomas (15 bilaterais), havia apenas 19 cadeias ossiculares íntegras, 23 apresentavam erosão no martelo com a supraestrutura intacta, 51 com erosão no martelo e perda da supraestrutura, três não foram descritos.

Sadé e Fuchs (1994) compararam os achados da erosão ossicular em adultos (idade \geq 14 anos) com aqueles achados em crianças (idade \leq 13 anos). O percentual de destruição do estribo e do martelo foram similares nos dois grupos; já a bigorna apresentou destruição significativamente maior em adultos. Também a paralisia do nervo facial e a fístula labiríntica apresentaram percentual maior nos adultos. Dornelles *et al.* (2002) realizaram um estudo de descrições dos achados, da orelha média, no trans-operatório de 55 pacientes com Otite Média Crônica, acompanhados no AOMC-HCPA. Desses pacientes, 49% tinham diagnóstico de Otite Média Crônica Colesteatomatosa (OMCC). No conjunto da amostra, havia algum envolvimento da cadeia ossicular em 66%, sendo que, na OMCC, este índice era de 96% e na OMCNC caía para 37%. A presença de colesteatoma estava associada à existência de dois ou mais ossículos afetados, assim como à maior prevalência de ausência ou erosão dos ossículos. Esses achados indicam que a maioria dos pacientes com OMC, submetidos à intervenção cirúrgica, possuem algum acometimento da cadeia ossicular, e que a frequência e a extensão

do comprometimento estavam muito mais relacionados com a presença de colesteatoma. Nesse trabalho (Dornelles *et al.*, 2002) a idade foi categorizada como: crianças até 18 anos e adultos a partir de 19 anos; quando analisado o conjunto da cadeia ossicular, observado no trans-operatório de pacientes com otite média crônica colesteatomatosa, foi encontrado 100% de comprometimento nas crianças e 92% nos adultos. Quando comparados os ossículos, separadamente, havia 30% de alterações no martelo, 30% no estribo e 90% na bigorna, sem diferenças entre adultos e crianças (Dornelles *et al.*, 2002).

A absorção óssea é estimulada por uma variedade de fatores, incluindo a inflamação, a pressão local, citoqueratinas específicas e queratina (Olszewska *et al.*, 2004). O conceito enzimático, no qual enzimas de origem epitelial são consideradas as responsáveis pela destruição óssea, foi definido por Abramson (1969, 1971a, 1971b e 1976), o qual demonstrou a presença de metaloproteinases e hidrolases no colesteatoma, hipótese posteriormente confirmada por Thompsen (1977). Ferlito *et al.* (1997) sugeriram que a propriedade destrutiva dos colesteatomas, a erosão óssea, é causada pela produção de metaloproteinases pelos componentes dos tecidos epitelial escamoso e fibroso (matriz e perimatriz, respectivamente). Não está bem demonstrado, ainda, se o osso mineralizado possa ser absorvido pela colagenase. À hipótese de reabsorção óssea por ação bioquímica, exclusivamente exercida por enzimas colagenolíticas, foram incorporados, posteriormente, outros agentes, como o fator de necrose tumoral (TNF), as interleucinas (IL-1 α) e as prostaglandinas (PGE₂) (Minotti, 1996; Kurihara, 1991; Hansen *et al.*, 2001).

Hamsei *et al.* (2003) analisaram 21 colesteatomas, através de reação em cadeia de polimerase (PCR), imunoistoquímica e histologia, com o objetivo de investigar os fatores de estimulação e diferenciação de osteoclastos em colesteatomas, utilizando pele do meato acústico externo como controle. A análise imunoistoquímica demonstrou uma elevação de células precursoras de osteoclastos e macrófagos nos colesteatomas. A análise da perimatriz

demonstrou que, nesta região do colesteatoma, há todos os fatores necessários para a osteoclastogênese e para a estimulação da reabsorção óssea.

Peek *et al.* (2003) estudaram a concentração de lipopolissacarídeos (componente da membrana de bactérias Gram-negativas – Schorder *et al.*, 2004) em colesteatomas e compararam com os níveis encontrados em amostras de pacientes com otite média crônica não-colesteatomatosa. Encontraram concentrações mais altas em pacientes com colesteatoma e sugeriram que estes resultados estariam correlacionados com os altos índices de absorção óssea.

Dornelles *et al.* (2005b) utilizando a escala proposta por Saleh e Mills (1999) encontraram que havia algum envolvimento da cadeia ossicular, em pacientes com OMCC, em 98% dos casos. O ossículo mais frequentemente afetado era a bigorna, seguida pelo estribo e pelo martelo. Quando correlacionaram o grau de comprometimento da cadeia ossicular com a idade do paciente à cirurgia, a espessura da perimatriz e o grau histológico de inflamação não foram detectadas correlações com nenhuma das variáveis analisadas. Os achados desses autores sugerem que é, praticamente, universal o acometimento da cadeia ossicular na otite média crônica colesteatomatosa, mas que o estado dos ossículos não tinha, ao menos naquele momento, correlação com os achados histológicos dos colesteatomas estudados (Dornelles *et al.*, 2005b).

1.10 Colágeno e Metaloproteinases

O colágeno é a proteína formadora das fibras colágenas, sendo a mais abundante proteína do reino animal e o principal constituinte dos ossos, peles e tecidos conectivos de todos os mamíferos. No ser humano, representa 30% do conteúdo protéico total do corpo. É

sintetizado por diversos tipos de células, como os fibroblastos, osteoblastos, e condrócitos. Essa proteína tem como principal função impedir a deformação dos tecidos, mantendo sua forma estrutural. Suas fibras são responsáveis, além de outras funções, pela estrutura de tendões e ligamentos (Junqueira e Carneiro, 1985).

O nome colágeno deve-se ao fato de que, quando fervida em água, forma uma substância que pode ser usada como cola. Essas fibras são birrefringentes, brancas e constituídas por moléculas alongadas e paralelas; possuem uma estriação transversal típica, fato que possibilita sua fácil identificação nas micrografias eletrônicas (Kramer *et al.*, 2001). A molécula de colágeno apresenta-se em forma de bastão, formado por uma tríplice hélice, com cerca de 3.000 Å de comprimento e 15 Å de diâmetro (Okuyama *et al.*, 1981). A estabilidade dessa tríplice hélice é mantida por pontes de hidrogênio entre os filamentos e por um efeito estérico de suas prolinas e hidroxiprolinas (Berisio *et al.*, 2002). Em condições laboratoriais, o colágeno é obtido a partir da hidrólise enzimática de matérias-primas colágenas selecionadas, onde, através de processos bioquímicos, se quebra a estrutura original da molécula, resultando, assim, num produto completamente solúvel em água fria, sem as características geleificantes da gelatina e de sabor e odor neutros (Stryer, L., 1996).

Em otologia, materiais compostos de colágeno são utilizados como esponjas degradáveis que, depois de umedecidas, têm uma apresentação gelatinosa, sendo utilizadas como um suporte-base para os enxertos nas cirurgias, em cubos, empregadas como um legítimo colchão de apoio ao enxerto, ou em pequenas tiras ou “trilhos” (Dornelles *et al.*, 2003).

A degradação do colágeno, na matriz extracelular, é obtida por uma família de metaloproteinases (MMP) que clivam suas fibras intactas em fragmentos menores que podem ser fagocitados e, subsequentemente, degradados por enzimas lisossômicas até seus aminoácidos constituintes (Champe e Harvey, 1996).

Wysocki *et al.* (1998) sugeriram que altos níveis de metaloproteinase aumentariam a degradação de componentes moleculares essenciais ao processo cicatricial e, também, que a diminuição dessas enzimas, em feridas, impediria a cronicidade das lesões e as dificuldades de cicatrização. Os fibroblastos são induzidos, pela interleucina-1 (IL1) e pela linfatossina (TNF), a produzirem metaloproteinases, as quais são mediadoras de eventos importantes de proteção e regeneração de tecidos lesados, mas que, em condições especiais, podem estar envolvidas em destruição de tecido sadio (Wysocki *et al.*, 1998).

Como já mencionado anteriormente, o colesteatoma é um cisto epidermóide, tendo como um dos fatores de significância clínica sua associação com uma progressiva destruição óssea. A possibilidade de que o colesteatoma possua uma substância capaz da lise óssea foi sugerida por Lautenschlager, em 1927. Em 1969, Abramson demonstrou a capacidade dos colesteatomas de produzirem metaloproteinase.

A perimatriz possui, em sua composição, fibras de colágeno, além de outros elementos. Na Figura 3, apresentamos uma imagem digital de cortes transversais de colesteatomas corados em Picrossírus, a qual cora as fibras dessa proteína em bordô (A), contrastando com a coloração verde do epitélio (B). Nessa figura, podemos perceber a grande quantidade de colágeno na estrutura da perimatriz.

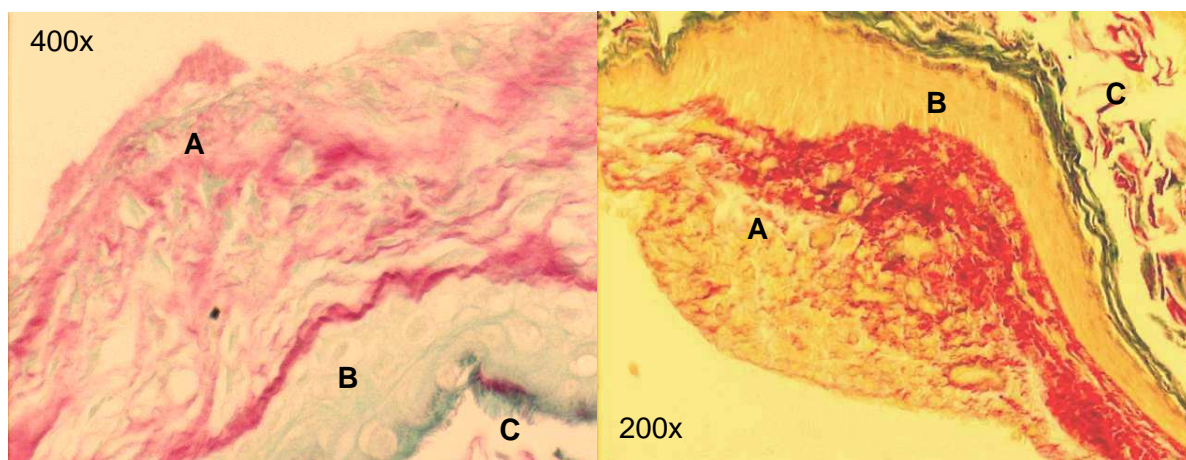


Figura 3: Cortes transversais de colesteatomas corados em Picrossírus.
A – perimatriz; B – matriz; C – conteúdo cístico

A maior espessura da perimatriz nos colesteatomas pediátricos, poderiam estar relacionados a atividade de metaloproteinases, se nesses espécimes houvesse uma diminuição das fibras colágenas. Confirmando-se esses achados, bem como uma maior quantidade de enzimas colagenolíticas, ou uma ação diferencial dessas em crianças, estaríamos mais próximos de uma explicação sobre o porquê de que o colesteatoma pediátrico poderia ser mais agressivo.

1.11 Metaloproteinases

A matriz extracelular desenvolve papel crucial no desenvolvimento e na manutenção da arquitetura tecidual, é composta por colágenos, lamininas, fibronectina, vitronectina e proteoglicanos (Yoon *et al.*, 2003). A degradação da matriz extracelular leva à perda da integridade tecidual, fato que é fundamental em processos fisiológicos, tais como: remodelação óssea, implantação trofoblástica e cicatrização, porém esse mesmo fenômeno está envolvido em processos inflamatórios (Kraien e Korem, 2000).

Proteinases participam de todas as etapas do processo de degradação da matriz extracelular, sendo essenciais para a interação das células com o meio circundante (Yoon *et al.*, 2003). Existem diversas famílias de enzimas que atuam nesse processo, destaca-se, por sua participação em praticamente todos os passos da degradação dos componentes da matriz extracelular: a família de metaloproteinases (MMP).

As MMP constituem uma família de endopeptidases, com atividade hidrolítica de amplo espectro para as proteínas extracelulares.

A atividade da maioria de metaloproteinase é muito baixa ou insignificante nos tecidos normais, sendo a expressão é transcricionalmente controlada por citocinas inflamatórias,

fatores de crescimento, hormônios, interação célula-célula e célula-matriz (Nagase e Woessner, 1999).

As MMP são proteínas extracelulares, mas estudos recentes indicaram que MMP 1 (Limb *et al.*, 2005), MMP 2 (Kwan *et al.*, 2004) e MMP 11 (Luo *et al.*, 2002) também são achados intracelularmente e podem agir em proteínas de intracelulares.

Uma MMP típica consiste num pró-peptídeo de, aproximadamente, 80 aminoácidos, um sítio catalítico metaloproteinase, em torno de 170 aminoácidos, um peptídeo de ligação com comprimentos variáveis e uma hemopexina, sítio aproximado de 200 aminoácidos (Bode *et al.*, 1993).

As MMP podem ser ativadas (Figura 4) por proteinases ou por ativação química, *in vitro* (Nagase, 1997). A ativação das MMP é seqüencial em muitos casos, um ataque proteolítico inicial ocorre com a exposição da região de dobra entre a primeira e a segunda hélices do propeptídeo. A clivagem específica da região de ligação é determinada por uma seqüência específica encontrada em cada MMP. Apenas uma parte do propeptídeo é removida, o que, provavelmente, desestabiliza o restante do propeptídeo, incluindo a interação cisteína-zinco, o que permite o processamento intermolecular, ativando, parcialmente, as MMP intermediárias (Suzuki *et al.*, 1990; Nagase *et al.*, 1990), sendo o passo final nessa ativação conduzido por uma outra MMP.

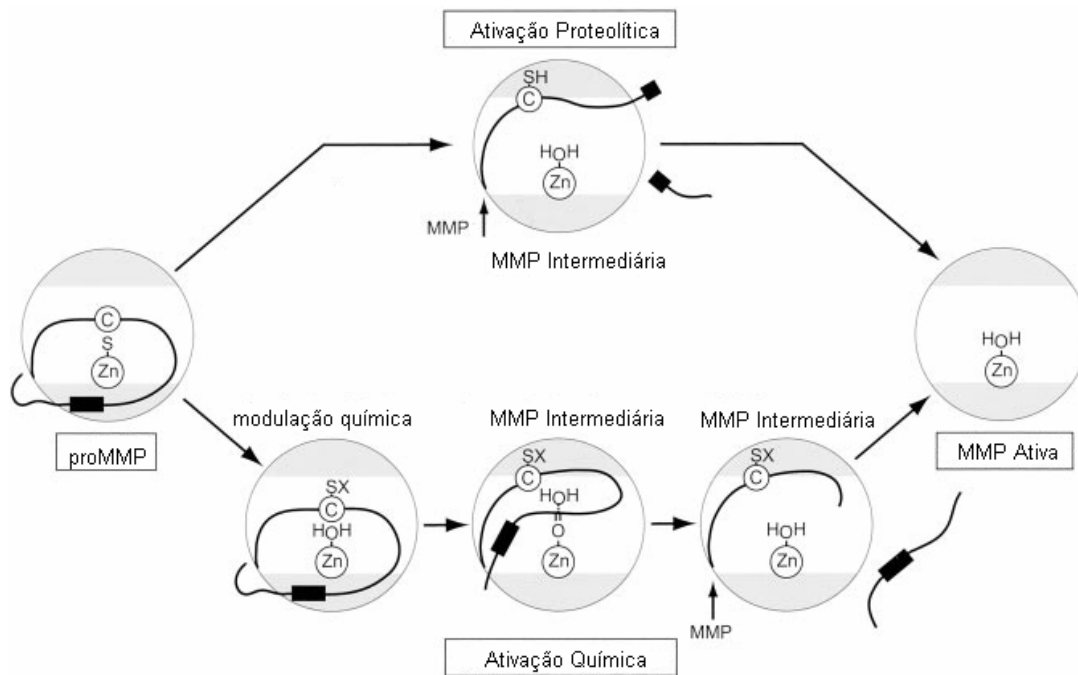


Figura 4: ativação sequencial de proMMP. A proMMP é secretada como zimogene inativa e pode ser ativada por proteinases (caminho superior) ou por agentes de não proteolíticos (caminho inferior). A atividade plena resulta da remoção da sobra do propeptídeo por processamento intermolecular. Adaptado de Nagase *et al.* (2006).

A maioria das proMMP são secretadas nas células e ativadas extracelularmente. A proMMP 2 não é prontamente ativado por proteinases em geral. A ativação principal da proMMP 2 acontece na superfície da célula e é mediada por MT-MMP. Isto inclui MT1MMP, MT5 MMP (Llano *et al.*, 1999; Pei, 1999) MT3 MMP (Takino *et al.*, 1995) MT2 MMP (Butler *et al.*, 1997), e MT6 MMP (Velasco *et al.*, 2000). A MT4 MMP não ativa a proMMP 2 (English *et al.*, 2000).

Uma importante função das MMP pensa-se ser a remoção da matriz extracelular na reabsorção tecidual. No entanto, a matriz extracelular não é simplesmente um arcabouço extracelular; também age como um reservatório de moléculas biologicamente ativas, tal como fatores de crescimento (Sternlicht *et al.*, 2001). Alguns componentes da matriz extracelular podem expressar funções biológicas críticas na proteólise. A degradação de componentes da matriz extracelular, por MMP, pode alterar tanto o comportamento celular como os fenótipos. Por exemplo, a degradação do colágeno tipo I por collagenase é associado com ativação de

osteoclastos (Holliday *et al.*, 1997), migração de queratinócitos durante re-epitelização (Pilcher *et al.*, 1997), e apoptose de células epiteliais (Lei *et al.*, 1996). A clivagem da MMP 2 e da MT1MMP da cadeia de laminina 5 expõe um sítio crítico pró-migratório, promovendo a migração de células normais no cérebro (Giannelli *et al.*, 1997; Koshikawa *et al.*, 2000). A clivagem de CD44 por MT1MMP está associada com migração de célula (Kajita *et al.*, 2001). A MMP 2 expressa em células Schwann de nervos periféricos degrada proteoglicanos de sulfato de condroitina acarretando neurite (Krekoski *et al.*, 2002). Portanto, a função das MMP é muito mais complexa e sutil que uma simples degradação, adicione-mos a esse um jamais explorado número de proteínas que não são da matriz extracelular, mas também são substratos de MMP e exercem atividades biológicas (McCawley e Matrisian, 2001; Sternlicht e Werb, 2001), a complexidade do papel de MMP em saúde e doença parece evidente.

As MMP interferem umas com as outras à medida em que muitas delas podem ativar outras pro-enzimas, o que sugere que a ativação controlada das mesmas pode envolver uma cascata, englobando diferentes membros da família das MMP (Cawston, 1998).

As células endoteliais sintetizam várias MMP: MMP1, MMP2, MMP9 e MT1MMP. Dentre estas a MMP2, MMP9 e a MT1MMP foram descritas como exercendo importante papel na angiogênese (Stetler-Stevenson, 1999).

A angiogênese envolve proliferação e migração de células endoteliais, remodelamento da matriz extracelular, formação tubular, recrutamento de estruturas adjacentes para a sustentação dos neovasos, anastomoses e desenvolvimento de membrana basal (Ramsden, 2000). As metaloproteinases participam desde a ruptura da membrana basal vascular até a proliferação endotelial, sendo parte de sua ação sobre moléculas pró-angiogênicas como a família dos fatores de crescimento endotelial vascular, e angiogênicas como a angiostatina (Yoon *et al.*, 2003).

Nguyen *et al.* (2001) postularam um modelo para o papel das MMP2 e MMP9 na angiogênese. A MMP2, constitutivamente secretada pelas células endoteliais, seria ativada através de uma cascata de ações enzimáticas a partir da trombina.

As metaloproteinases, em especial a MMP 2, são enzimas capazes de causar erosão óssea (Morales *et al.*, 2007). As MMP são produzidas na matriz dos colesteatomas, tendo sua ação na perimatriz (Figura 5).

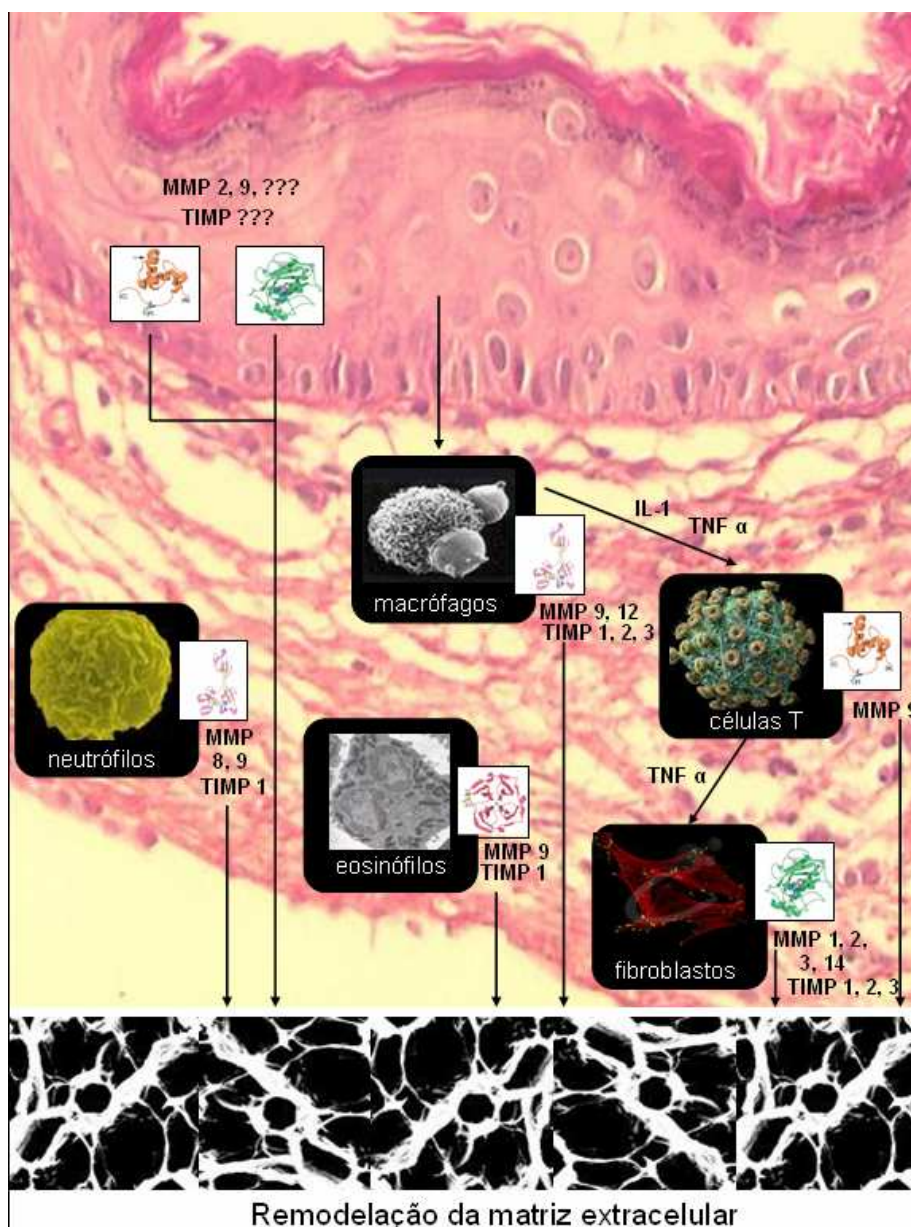


Figura 5: Resumo dos diferentes tipos de células que produzem MMP e TIMP. A matriz do colesteatoma pode desencadear a resposta imunológica com ativação de diferentes células na perimatriz, tais como macrófagos, fibroblastos, e leucócitos, liberando citocinas, como a interleucina-1 (IL-1) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF α). As células imunológicas, ativadas, também podem liberar tanto MMP como TIMP. Sob condições fisiológicas, há um equilíbrio de MMP/TIMP. Reações inflamatórias levam a uma desigualdade entre MMP e para TIMP, e isto pode levar à remodelação da matriz extracelular. Modelo criado pela autora, adaptado de Nagase *et al.* (2006).

Naim *et al.* (2004) afirmam que as metaloproteínases podem ser caracterizadas como "escavadoras-destruidoras" da matriz extracelular, as quais permitem o remodelamento do tecido normal e contribuem para a destruição de tecido patológico. Estes autores estudaram 12

espécimes de colesteatomas obtidos durante a remoção cirúrgica e utilizaram tecido do meato acústico externo normal, como controle. O material foi marcado com os anticorps para MMP-2 e MMP-9. O imunoestadiamento para metaloproteinases estava aumentado em todas as camadas do colesteatoma, entretanto, a pele do meato acústico externo apresentou imunoestadiamento moderado. Os mesmos autores (Naim *et al.*, 2004) sugeriram que as metaloproteinases poderiam modular o balanço entre o crescimento e a apoptose celulares, garantindo a integridade do tecido. As circunstâncias desequilibradas, tais como descritos pelos autores (Naim *et al.*, 2004), poderiam resultar em descamação e acúmulo não reguladas de queratinócitos inoperantes, crescimento invasivo e defeituoso no tecido adjacente, e a perda do controle do crescimento.

Naim *et al.* (2005), estudando um sistema antagonista das metaloproteinases, encontraram que somente as camadas basais dos espécimes de colesteatoma foram marcadas, já as camadas suprabasais mostraram imunoestadiamento diminuído ou negativo, entretanto, na pele do meato acústico externo, todas as camadas estavam homogeneamente positivas. Esses autores (Naim *et al.*, 2005) sugeriram que o equilíbrio entre fatores desintegradores e estabilizadores no tecido normal, estaria perturbado no tecido inflamado e/ou neoplásico.

Em 1996, Gohlke *et al.* descreveram a metaloproteinase 2, uma collagenase produzida no núcleo de células, estando esta relacionada, em vários aspectos, com a progressão de tumores, incluindo crescimento, invasão, metástase e angiogênese. Segundo Sun e Hemler (2001) a MMP2, são enzimas proteolíticas capazes de degradar componentes conectivos dos tecidos e estão envolvidas nas interações extracelulares.

Schonermark *et al.* (1996) demonstraram que a invasão de tecidos pelo colesteatoma estava relacionada à MMP2, Banerjee *et al.* (1997) demonstraram a presença de MMP2 em colesteatomas. Zhu *et al.* (2001) observaram que há estreita relação entre colesteatomas e metaloproteinases (MMP2 e MMP9); concluíram que a desordem entre as metaloproteinases

e seus inibidores, foram uma das razões pela absorção óssea causada tanto por câncer de orelha média quanto por colesteatoma.

Para Bernal-Sprekelsen *et al.* (2001) o epitélio do colesteatoma é caracterizado por uma falta de regulação no queratinócito, acompanhado por destruição dos ossículos e outras partes do osso temporal. Através de métodos imunoistoquímicos perceberam que metaloproteinases e o fator de crescimento básico de fibroblastos poderiam explicar atividades destrutivas e proliferativas do colesteatoma na orelha média. Ainda nesse trabalho, Bernal-Sprekelsen *et al.* (2001) conseguiram demonstrar alterações na membrana basal de colesteatomas acompanhada da presença de MMP e uma linear imunoreatividade para colágeno tipo IV e laminina. Os autores concluem dizendo que as MMP podem ter um importante papel na manutenção da atividade proliferativa e na agressividade dos colesteatomas.

Em 2003, Wilmoth *et al.* descrevem que as MMP são conhecidas por participarem da fisiologia normal do metabolismo do colágeno, mas também estão associadas com a absorção patológica da matriz extracelular de processos inflamatórios crônicos de pele, tumor e metástases. Djonov *et al.* (2001) correlacionaram a presença de MMP2 com a progressão do câncer de mama para fenótipos mais agressivos e com a indiferenciação celular.

Todas as MMP são inibidas e reguladas por uma família específica de proteínas, que se denominam inibidores teciduais de metaloproteinases - TIMP (Matrisian,1990; Nguyen *et al.*, 2001). Atualmente são conhecidos quatro membros da família das TIMP, os quais são capazes de se ligar e inibir a atividade de todos os membros da família das MMP. (McCawley e Matrisian, 2000).

A interrupção da homeostase MMP-TIMP, pode desencadear um processo patológico, ou seja, a maior quantidade de metaloproteinases, poderia contribuir para o processo de absorção óssea. Neste sentido, a quantificação das metaloproteinases pode ser útil na

avaliação do comportamento dos colesteatomas, como marcadores de sua agressividade. O entendimento da complexidade das MMP, em termos de suas atividades biológicas, ainda é incipiente, algumas questões são paradoxais, por exemplo como podem exibir efeitos pró e anti inflamatórios, ou pró e anti angiogênicas? (Nagase *et al.*, 2006).

PARTE II – A PESQUISA

2. Justificativa

Existem controvérsias quanto às características clínicas dos colesteatomas pediátricos. Alguns autores sugerem que, na infância, a otite média crônica colesteatomatosa seria mais agressiva e teria um prognóstico menos favorável do que em adultos (Glasscock, 1981; Ruah, 1992; Bujia *et al.*, 1996, Palva *et al.*, 1997; Sudhoff *et al.*, 2000). Porém, ainda não há achados histológicos, bioquímicos e/ou biofísicos, conclusivos que confirmem essa hipótese.

Após a comparação histológica dos colesteatomas, em especial da perimatriz, entre pacientes pediátricos e adultos, Dornelles *et al.* (2006) encontraram fortes evidências de que o processo inflamatório nos colesteatomas pediátricos seria mais exuberante. A análise imunoistoquímica auxiliará a determinar, com maior precisão, o grau de inflamação, bem como sua correlação com a idade do paciente à data da cirurgia. Ao mesmo tempo que a quantificação das metaloproteinases na perimatriz poderá nos auxiliar a saber se a espessura da perimatriz está relacionada ao seu grau inflamatório ou a quantidade de fibras de colágeno da sua estrutura.

O conhecimento gerado por essa tese poderá acrescentar subsídios para a determinação da maior agressividade ou não da OMCC em crianças, com conseqüentes implicações terapêuticas decorrentes do esclarecimento desse ponto.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Descrever e comparar, histologicamente, colesteatomas adquiridos de crianças e adultos vistos à microscopia óptica.

3.2 Objetivos Específicos

- 1 - Correlacionar a espessura da perimatriz, medida em micrômetros (μm), com a idade do paciente na data da cirurgia.
- 2 - Correlacionar a espessura da perimatriz, medida em micrômetros (μm), com grau histológico de inflamação.
- 3 - Correlacionar a espessura da perimatriz com os anticorpos de CD31, MMP2 citoplasmática e nuclear e MMP9
- 4 - Correlacionar o grau histológico de inflamação com os anticorpos de CD31, MMP2 citoplasmática e nuclear e MMP9
- 5- Correlacionar a idade do paciente à cirurgia com os anticorpos de CD31, MMP2 citoplasmática e nuclear e MMP9

4. Métodos

4.1 Delineamento

Estudo transversal, comparativo e contemporâneo, onde o fator em estudo foi a faixa etária dos pacientes, e o desfecho foram componentes histológicos e imunoistoquímicos da perimatriz e da matriz dos colesteatomas adquiridos.

4.2 Pacientes

Os pacientes incluídos neste estudo foram provenientes do Ambulatório de Otite Média Crônica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (AOMC-HCPA), com diagnóstico de otite média crônica colesteatomatosa, não havendo discriminação quanto a sexo e etnia. Os pacientes foram separados em dois grupos: pediátrico, constituídos por pacientes na faixa entre 0 e 18 anos, 11 meses e 30 dias; e adulto, com pacientes a partir de 19 anos (conforme a

Convenção das Nações Unidas sobre os Direitos da Criança, 1989), sendo considerada a idade do paciente à data da cirurgia.

No AOMC-HCPA, na primeira consulta, foram coletados: dados básicos de identificação (nome, sexo, data de nascimento, data da consulta, número do prontuário, telefone de contato) e motivo do encaminhamento para o Serviço de Otorrinolaringologia. Foi realizada anamnese dirigida, acumetria com diapasão de 512 Hz, teste de Rinne, teste de Weber e otoscopia das duas orelhas. No Anexo 1, encontra-se o modelo do protocolo de primeira consulta do AOMC-HCPA.

Ainda nessa consulta inicial, foi realizada uma filmagem das duas orelhas para análise das doenças, discussão da patogênese e arquivo. Essas imagens foram captadas através do *Vídeo Digital Recorder* e armazenadas em CD.

Conforme a rotina do Serviço de Otorrinolaringologia e a disponibilidade de horários, os pacientes foram encaminhados para cirurgia. Durante o ato cirúrgico é preenchido protocolo detalhado de onde são extraídos os dados sobre o estado da cadeia ossicular e a via de formação dos colesteatomas.

4.3 Processo de Amostragem

4.3.1 Cálculo do Tamanho da Amostra

Com base no trabalho de Dornelles (2004), considerando-se $\alpha = 0,05$, $\beta = 0,10$ e um tamanho de efeito padronizado de 0,70, foi calculado um número total de 90 pacientes, sendo 45 de cada grupo. Este tamanho de amostra é suficiente para encontrar uma correlação igual ou maior que 0,50, entre a idade do paciente à data da cirurgia e a espessura da perimatriz.

4.3.2 Critérios de Inclusão

A inclusão dos pacientes neste estudo obedeceu dois critérios:

1. Diagnóstico de Otite Média Crônica Colesteatomatosa
2. Presença histológica de matriz e perimatriz no colesteatoma coletado.

Para auxiliar o entendimento do segundo critério de inclusão, caso clássico de representação histológica da presença de matriz e perimatriz no material processado pode ser visto na Figura 6, a seguir. Em A, vê-se a perimatriz constituída por tecido conjuntivo subepitelial, contendo fibras colágenas, elásticas, fibroblastos e células inflamatórias. A matriz está identificada pela letra B, sendo um epitélio semelhante ao da epiderme da pele normal. O conteúdo cístico, formado por queratina, é visualizado na região identificada pela letra C.

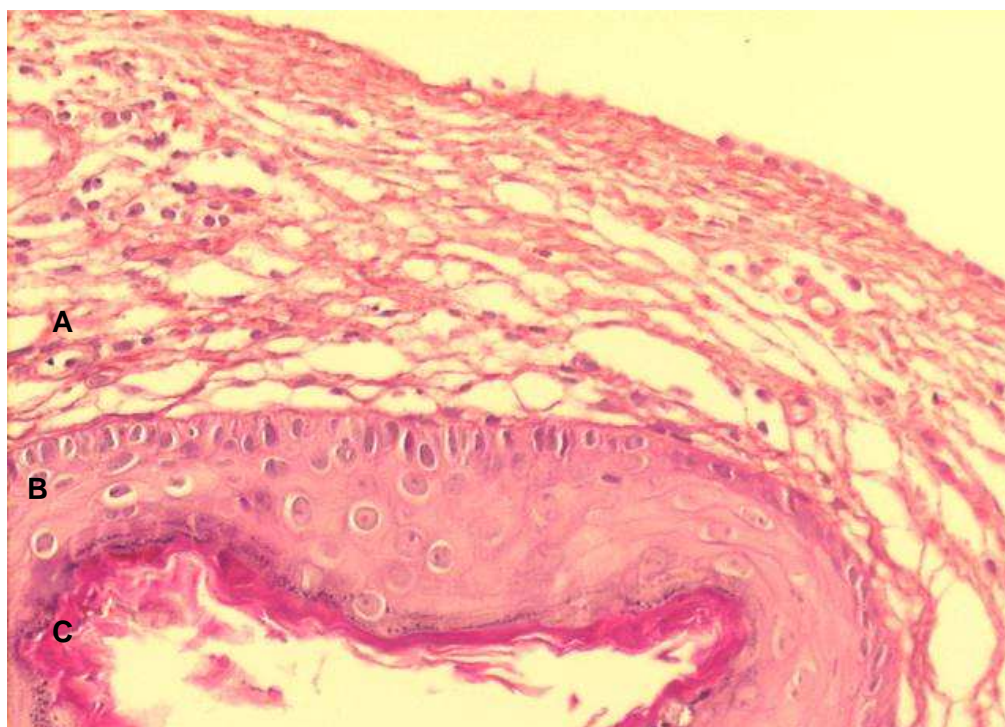


Figura 6: Imagem digitalizada de lâmina, com corte transversal de colesteatoma, corada em Hematoxilina-Eosina. Podemos ver suas três partes constituintes: A – perimatriz, B – matriz, C – conteúdo cístico. Aumento: 100x

4.3.3 Critério de Exclusão

Foram critérios de exclusão:

- 1 - o diagnóstico de colesteatoma congênito;
- 2 - a não reatividade aos anticorpos após a terceira coloração.

4.4 Colesteatomas

Os colesteatomas foram coletados, no período de maio de 2003 a março de 2007, pelos cirurgiões otologistas, em locais específicos da orelha média, sendo eles no mesotímpano, no ático e sobre o canal semicircular lateral. Estes locais foram selecionados para tentar garantir que as amostras coletadas, as quais deveriam ter no mínimo 5 milímetros, tivessem matriz e perimatriz. O material coletado foi imediatamente fixado em formol a 10% e posteriormente processado pelas técnicas histológicas habituais, com inclusão em parafina.

Foram preparadas cinco lâminas para análise de cada amostra de colesteatoma (Figura 7). As lâminas foram coradas em Hematoxilina-Eosina (HE), Picrossírius (Sirius Red), Anticorpo CD31, Anticorpo MMP2, Anticorpo MMP9 e analisadas em microscópio óptico. A coloração em HE foi utilizada para avaliar a integridade histológica do colesteatoma (presença de matriz e perimatriz), além da obtenção das descrições histológicas dos componentes dos colesteatomas; a de Picrossírius serviu para a medição da espessura da perimatriz, pois nela as fibras de colágenos coram-se em bordô, facilitando a delimitação do campo a ser medido. As lâminas com o anticorpo CD31 foram utilizadas para a contagem total de vasos. As amostras com as metaloproteinases (MMP2 e MMP9) foram utilizadas para a quantificação de metaloproteinases.

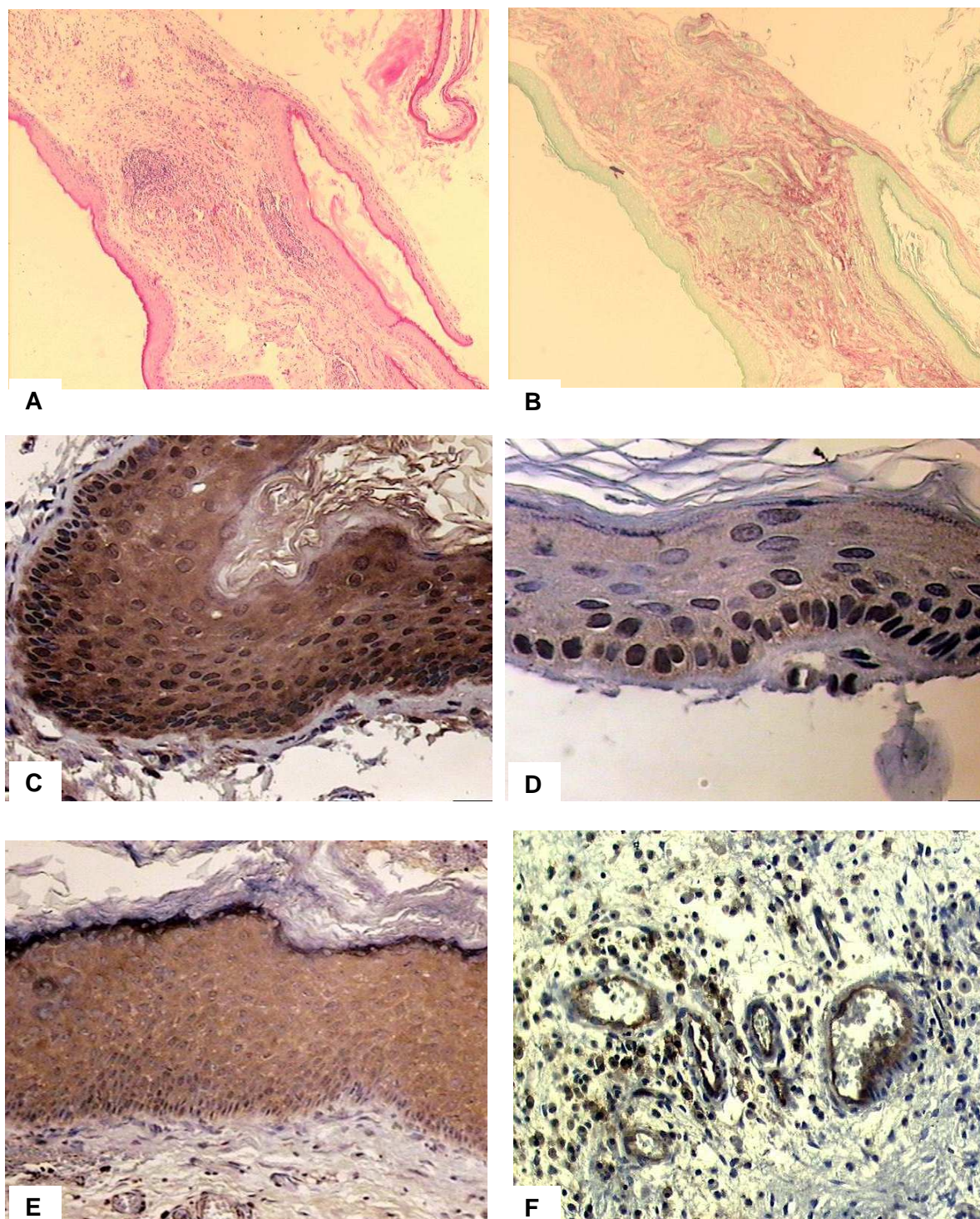


Figura 7: Nessa imagem podemos ver a mesma amostra corada em HE (A), Picrosírrios (B), MMP2 citoplasmática (C), MMP2 nuclear (D), MMP9 (E), CD31 (F). Aumento: 40x (A e B), 200x (C a F)

4.5 Descrição Histológica

Todas as descrições foram realizadas pela mesma patologista, de maneira “cega”, sendo observados os seguintes constituintes: número médio de camadas celulares da matriz, presença de hiperplasia na matriz, espessura e epitélio delimitante da perimatriz, fibrose e granuloma na perimatriz.

O número médio de camadas celulares da matriz foi obtido pela contagem dessas, em cinco campos diferentes, e coletado de maneira contínua. Os dados de hiperplasia na matriz, o epitélio delimitante da perimatriz, fibrose e granuloma na perimatriz foram coletados de maneira qualitativa do tipo sim ou não.

4.6 Medição da Perimatriz

Após a avaliação da lâmina em HE, com a confirmação da integridade histológica das amostras, era feita a segunda lâmina em Picrosísrios (Figura 3B), a qual foi utilizada para a medida da espessura da perimatriz.

As lâminas com cortes transversais de colesteatoma foram analisadas no microscópio Olympus modelo BX40, acoplado a uma câmera digital Sony, conectada a um microcomputador com placa de captura de imagens, para a obtenção das imagens digitais do material. A leitura foi “cega” e controlada pela pesquisadora.

A espessura da perimatriz, medida em micrômetros, foi obtida através de análise de imagens computadorizadas, utilizando-se o *software ImagePro Plus* (Figura 8, a seguir).

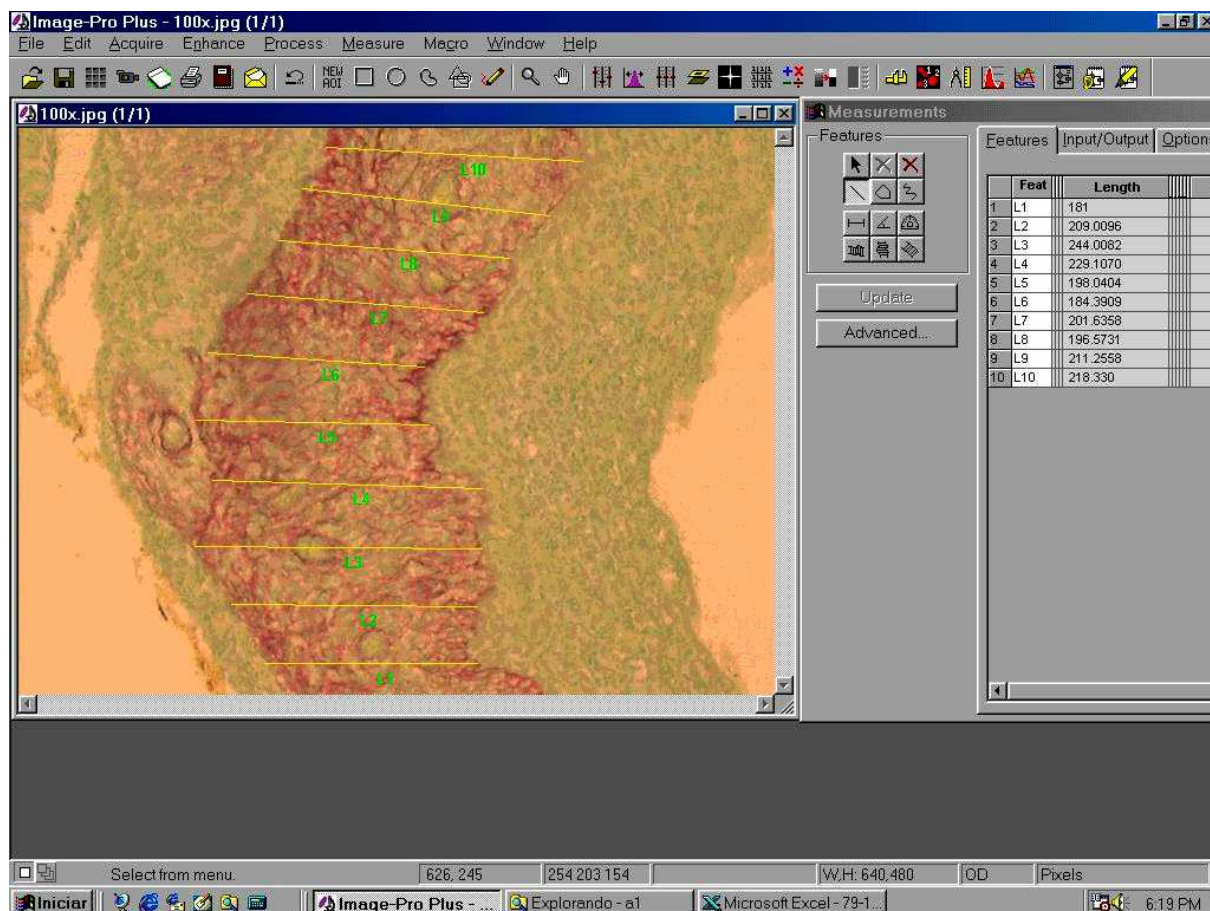


Figura 8: Imagem capturada no programa *ImagePro Plus*, representando o módulo de medição. Aumento: 100x

De cada amostra foram realizadas 20 medidas da espessura da perimatriz. Dessas medidas, foram obtidas a média, a mediana, o tamanho mínimo, o tamanho máximo, o delta (tamanho máximo – tamanho mínimo) e a soma, sendo esses os parâmetros utilizados para as comparações entre os grupos.

Para a obtenção das 20 medidas de espessura, a lâmina foi percorrida em toda a sua extensão, sendo digitalizadas quantas imagens fossem necessárias para retratarmos a variabilidade intrapacientes.

Os dados coletados foram registrados em planilhas do aplicativo *Excel*.

4.7 Imunoistoquímica

Os mesmos colesteatomas utilizados para os cortes com coloração em Picrossírios foram submetidos à técnica de imunoistoquímica utilizada na rotina do Serviço de Patologia, a qual consiste na desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação de peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas.

Para a contagem do número médio de vasos sangüíneos foi preparada a terceira lâmina utilizado-se o anticorpo anti-CD31 primário (clone JC70A, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA). O material foi encubado por 12 horas, a quatro graus *Celsius*, na diluição 1:40, seguido de aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako).

A leitura das lâminas foi realizada sob microscopia óptica com aumento de 200 vezes, por duas observadoras independentes (sendo uma delas professora do Departamento de Patologia da FAMED-UFRGS e a outra sendo a própria pesquisadora). Todas as lâminas passaram por uma leitura “cega” e controlada pela pesquisadora.

O número médio de vasos sangüíneos na perimatriz foi coletado de maneira contínua, obtida pela contagem de pontos de Chalkley, onde uma grade, contendo 25 pontos, é colocada sobre a imagem digitalizada e são contados todos os pontos que coincidam com os vasos marcados (Figura 9). Foram realizadas de duas a cinco imagens, dependendo do tamanho dos colesteatomas, com o número de vasos contados em cada imagem foi obtida a média. As áreas da perimatriz com óbvio tecido de granulação foram evitadas na captura das imagens. A leitura das lâminas foi realizada por duas observadoras independentes (uma aluna do Departamento de Patologia da FAMED-UFRGS e segunda a própria pesquisadora), a variável final foi a média de todas as leituras realizadas em cada lâmina.

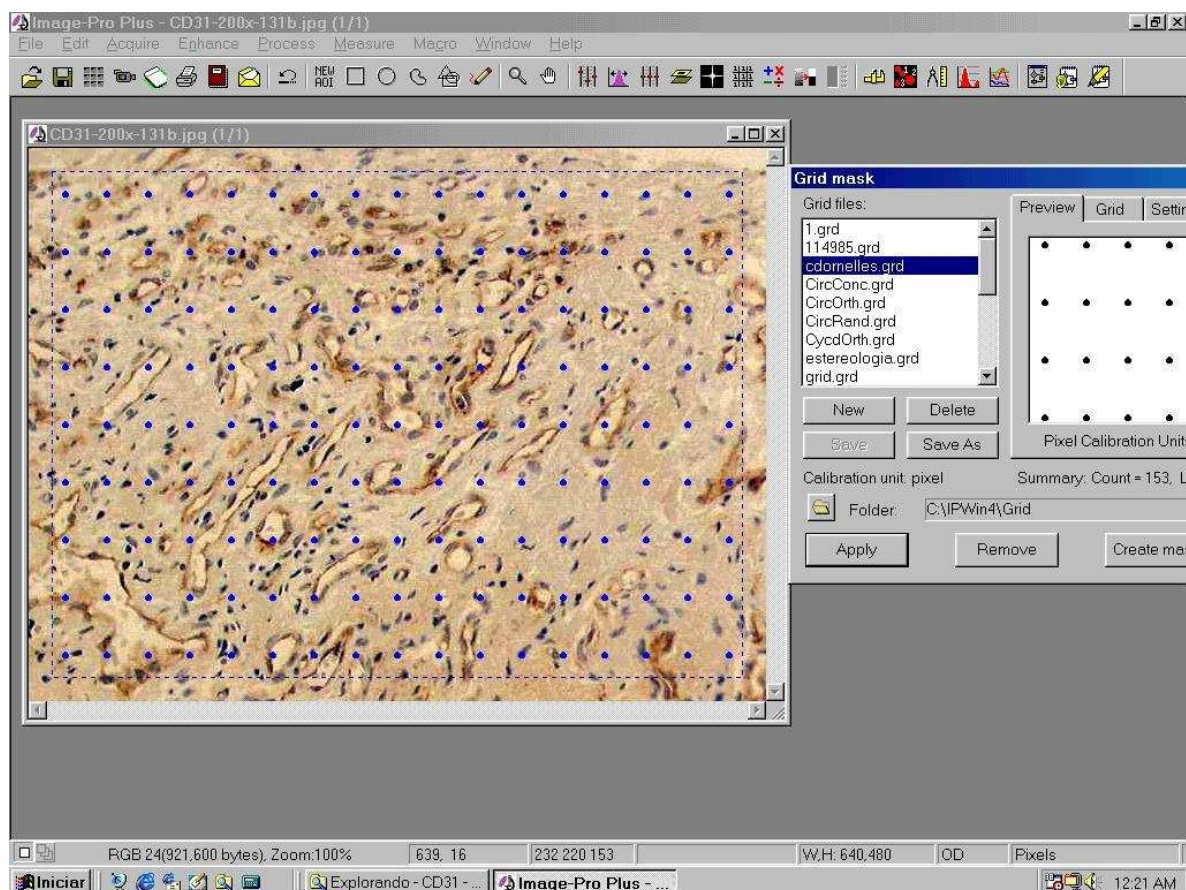


Figura 9: Imagem capturada no programa *ImagePro Plus*, representando o módulo de contagem dos vasos sanguíneos. Aumento: 200x

Para avaliar a produção das metaloproteinases foram preparadas as duas últimas lâminas utilizando-se os anticorpos anti-MMP2 (72kDa Collagenase IV, Chemicon Internacional, USA) e o anti-MMP9 (clone 9D4.2, Chemicon Internacional, USA). Os cortes de colesteatomas foram incubados por 72 horas, a quatro graus *Celsius*, na diluição 1:40, seguido de aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). A imunoreatividade das metaloproteinases foi observada na matriz dos colesteatomas, sendo que a MMP9 no citoplasma das células do epitélio e a MMP2 no citoplasma e no núcleo.

Observou-se a intensidade de coloração da MMP2 e da MMP9, sendo resultado o expresso em 0, 1, 2 e 3, de acordo com a intensidade de coloração das metaloproteinases (ausente, discreto, moderado e acentuado, respectivamente). Além de avaliar a intensidade da coloração, também foi estimado o percentual de células que haviam sido coradas, numa escala que variou de zero (nenhuma imunoreatividade) a 100% (todas as células coradas), esse percentual foi dicotomizado em: 1 - quando os percentuais variavam de 0 a 50% e 2 - de 51 a 100%. A variável final a ser analisada, estatisticamente, foi o resultado do produto entre a intensidade de coloração (de zero a três) pelo fator multiplicador (1 ou 2) resultante do percentual de material corado.

4.8 Considerações Éticas

Foi obtido Termo de Consentimento Livre Informado (Anexo 2) para a utilização anônima dos dados dos pacientes e para coleta do material em cirurgia. A obtenção ou não do consentimento informado não influenciou o tratamento dos pacientes. Este projeto foi aprovado, quanto às questões éticas e metodológicas, pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, em outubro de 2002 (Anexo 3).

4.9 Análise Estatística

A comparação entre os grupos foi realizada através dos testes de Mann-Whitney e exato de Fisher. Para verificar a existência de correlação, foi utilizado o coeficiente de correlação de

Spearman. A análise estatística foi executada no *software Statistical Package for Social Science (SPSS) 10.0 for Windows*.

1) Coeficiente de correlação de Spearman: foi utilizado para o estudo das correlações entre duas variáveis contínuas, correlacionando-se a variável idade com a espessura da perimatriz, com a imunoreatividade das metaloproteinases, com o número de vasos sanguíneos na perimatriz e com o número médio de camadas celulares da matriz. Também foi utilizado para verificar a existência de correlação entre a espessura da perimatriz com o número de vasos sanguíneos na perimatriz e o número médio de camadas celulares da matriz.

2) Teste Mann-Whitney: foi utilizado para testar a homogeneidade dos dois grupos em relação ao número médio de camadas celulares da matriz, o número médio de vasos sanguíneos na perimatriz, a imunoreatividade dos anticorpos anti-CD31, anti-MMP2 e anti-MMP9.

3) Teste de exato de Fisher: foi utilizado para testar a homogeneidade dos dois grupos em relação às variáveis hiperplasia na matriz, fibrose, granuloma e epitélio delimitante da perimatriz.

A análise descritiva da idade foi realizada por meio da observação do cálculo de médias e desvios-padrão. Para a variável gênero, foi calculada a frequência absoluta.

Todos os testes foram realizados na forma bi-caudal, admitindo-se como estatisticamente significativos os valores de P menores ou iguais a 0,05.

5. Resultados

5.1 Dados Demográficos

A amostra contou com 120 colesteatomas, sendo distribuídos igualmente entre os grupos pediátrico (até 18 anos de idade à data da cirurgia) e adulto (com mais de 18 anos à data da cirurgia). A amostra estava igualmente dividida quanto ao gênero também.

A média \pm desvio padrão da idade dos pacientes à data da cirurgia foi de $24,99 \pm 16,80$ anos. O grupo pediátrico apresentou média de idade igual a $11,75 \pm 3,48$ anos, sendo de $38,02 \pm 14,31$ anos no grupo adulto.

A Figura 10, a seguir, apresenta o fluxograma da amostra e o Anexo 4 apresenta uma descrição detalhada do grupo de pacientes.

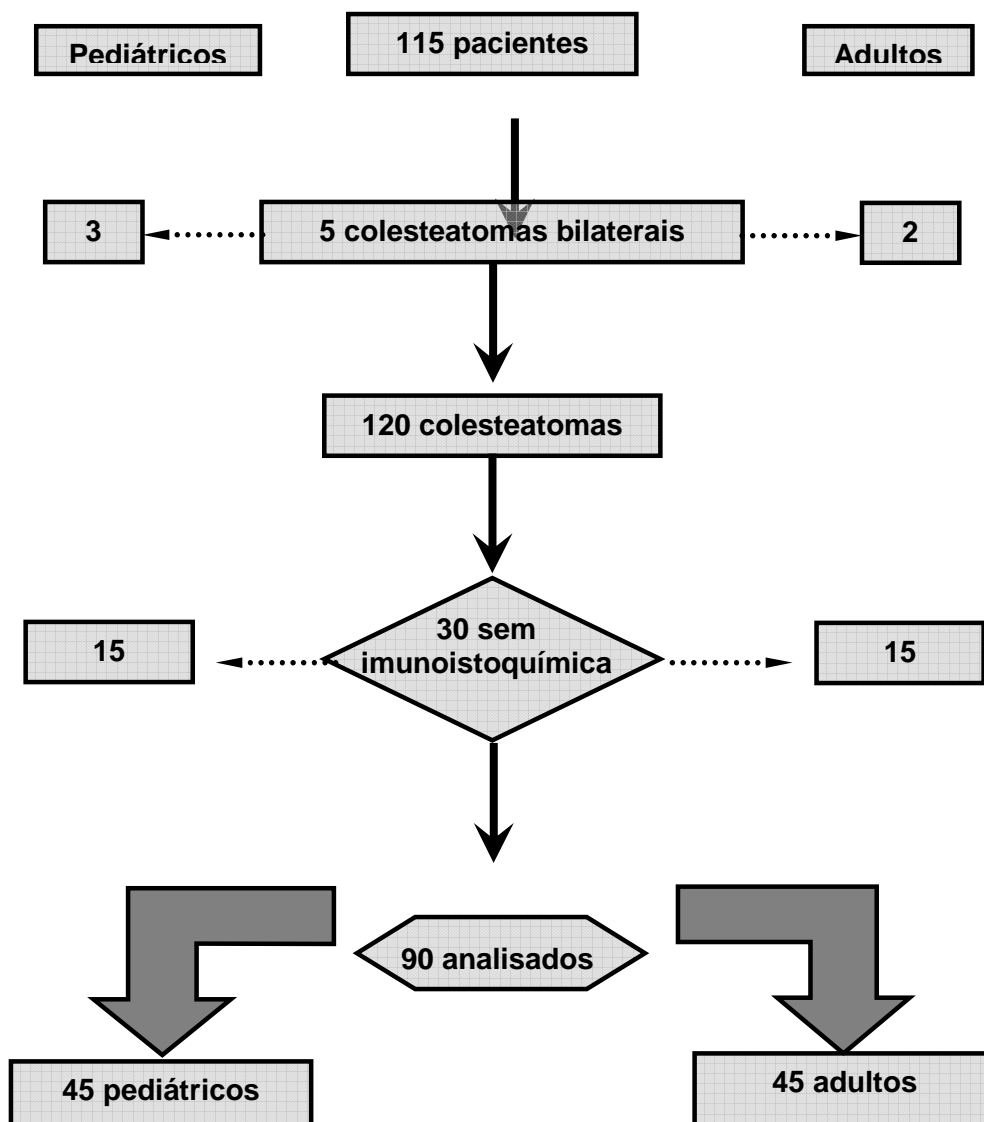


Figura 10: Fluxograma da inclusão e distribuição da amostra.

5.2 Dados Histológicos

Nesta seção, são relatados dados obtidos das descrições histopatológicas das lâminas referentes aos casos estudados, bem como algumas imagens digitais representativas dos resultados encontrados (Figura 11). As demais imagens da coleção estão em CD anexo a esse volume (Anexo 6).

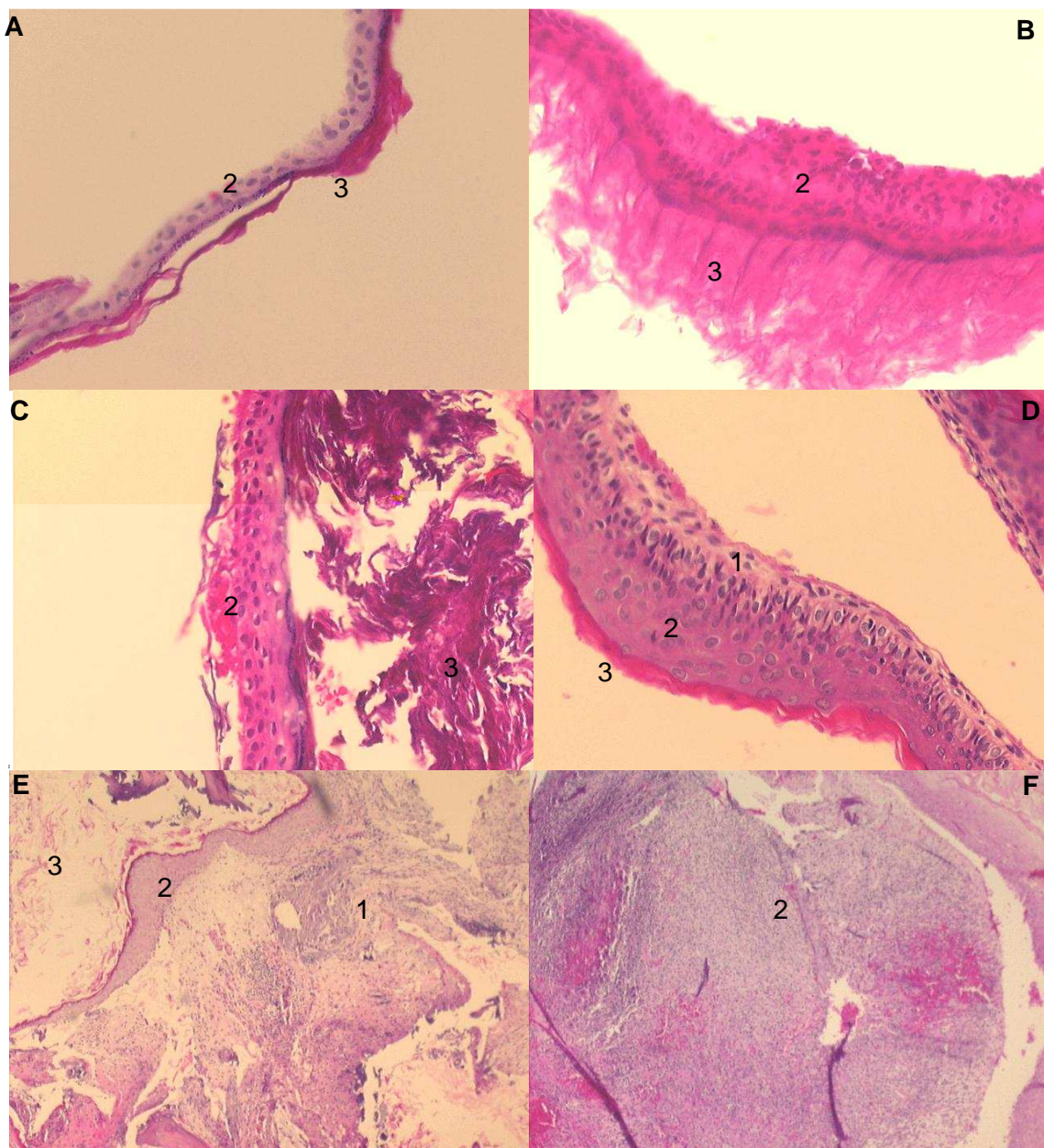


Figura 11: Colesteatomas representativos da amostra, ilustrando seus constituintes histológicos. 1 – Perimatriz, 2 – Matriz, 3 – Conteúdo Cístico. A – Colesteatoma epitimpânico, proveniente de paciente do gênero feminino, com 44 anos de idade. Histologicamente apresenta-se como epitélio escamoso estratificado, queratinizado, com média de três camadas de células. Perimatriz ausente. Aumento: 200x. B – Colesteatoma epitimpânico, proveniente de paciente do gênero masculino, com 37 anos de idade. Histologicamente apresenta-se como epitélio escamoso estratificado, queratinizado, com média de seis camadas de células. Perimatriz estreita, fibrótica, com raros linfócitos. Ausência de granuloma. Aumento: 200x. C – Colesteatoma mesotimpânico, proveniente de paciente do gênero feminino, com 35 anos de idade. Histologicamente apresenta-se como epitélio escamoso estratificado, queratinizado, com média de quatro camadas de células. Perimatriz muito estreita, sem fibrose e sem infiltrado inflamatório. Aumento: 200x. D - Colesteatoma mesotimpânico, proveniente de paciente do gênero masculino, com 16 anos de idade. Histologicamente apresenta-se como epitélio escamoso estratificado, queratinizado, com média de seis camadas de células. Perimatriz estreita e delicada, sem fibrose e com infiltrado inflamatório discreto. Aumento: 200x. E - Colesteatoma epitimpânico, proveniente de paciente do gênero feminino, com 11 anos de idade. Histologicamente apresenta-se como epitélio escamoso estratificado, queratinizado, com média de doze camadas de células epiteliais. A perimatriz exhibe fibrose densa, infiltrado inflamatório crônico acentuado e está delimitada em seu plano profundo por epitélio cubóide simples. Aumento: 50x. F - Colesteatoma mesotimpânico, proveniente de paciente do gênero feminino, com sete anos de idade. Histologicamente apresenta-se como epitélio escamoso estratificado, queratinizado, com média de treze camadas de células. Perimatriz mostra fibrose discreta com infiltrado inflamatório acentuado e exsudação neutrocitária, estando delimitada em seu plano profundo por epitélio cubóide simples. Ausência de granulomas. Aumento: 50x.

Os colesteatomas apresentaram-se, ao microscópio óptico, como uma formação cística, revestida por epitélio escamoso estratificado e queratinizado, a chamada matriz, assentada sobre tecido conjuntivo denso de espessura variável, tanto intra como interpaciais, designado de perimatriz. Essa, por vezes, exibia infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e/ou tecido de granulação e reação de corpo estranho, especialmente se tivesse ocorrido ruptura da lesão. O conteúdo cístico, por sua vez, consistia de lamelas de queratina.

Pode-se afirmar que o revestimento (matriz) dos colesteatomas é indistinguível de uma mucosa escamosa (epitélio escamoso estratificado com um córion – lâmina própria – subjacente, como os encontrados no revestimento da boca, vagina, esôfago) e da pele, exceto pelo fato de esta última exibir os anexos cutâneos (pêlos e glândulas). Também não podem ser distinguidos dos cistos epidérmicos ou infundibulares, de qualquer localização.

O número médio de camadas celulares do epitélio escamoso estratificado variou de 2 a 23, com mediana de 6 (5 a 9). A hiperplasia na matriz apareceu em 34% dos colesteatomas, 14% apresentavam granuloma e em 61% havia fibrose presente. A presença de um epitélio cubóide simples, delimitando a perimatriz em seu plano profundo, ocorreu em 22% dos casos.

Quando estratificado por grupo etário, os componentes histológicos analisados apresentaram distribuição semelhante nos dois grupos, com exceção da espessura da perimatriz e da presença de epitélio delimitante (Tabela 1).

Tabela 1: Comparação dos grupos pediátrico e adultos quanto às características histomorfológicas do colesteatoma

Variável	Geral n=120	Pediátrico n=60	Adulto n=60	Valor P
Espessura	81 (34 a 217)	104 (48 a 245)	49 (15 a 176)	0,045 ¹
Matriz	6 (5 a 9)	6 (5 a 9)	6 (5 a 10)	0,721 ¹
Hiperplasia	39 (34,5%)	20 (33,3%)	19 (32,2%)	0,988 ²
Epitélio Delimitante	25 (22,1%)	17 (28,3%)	7 (11,9%)	0,037 ²
Fibrose	75 (61,3%)	39 (65,0%)	36 (61,0%)	0,668 ²
Granuloma	16 (14,3%)	8 (13,3%)	8 (14,5%)	0,999 ²

Mann-Whitney¹, Exato de Fisher²

A perimatriz aparece como uma rede inflamatória que envolve o colesteatoma, de espessura variável, tanto intra como interpacientes. Havia sete amostras com perimatriz igual a zero, sendo seis no grupo de adultos e apenas uma no grupo pediátrico.

5.3 Dados Imunológicos

Nesta seção, são relatados dados obtidos das análises com os marcadores imunológicos (anti-CD31, anti-MMP2 citoplasmática e nuclear e anti-MMP9) das lâminas referentes aos casos estudados, bem como as imagens digitais representativas dos resultados encontrados (Figuras 12, 13, 14 e 15).

Dos 120 colesteatomas analisados, 30 tiveram de ser excluídos desta parte da análise, por não apresentarem condições para o processamento imunoistoquímico.

O número médio de vasos sanguíneos (Figura 12) foi de 6 (0 a 11). No grupo pediátrico foi igual a 7 (4 a 11), e no grupo adulto de 4 (0 a 10). Ao compararmos o número médio de vasos sanguíneos entre os grupos, através do teste Mann-Whitney, encontramos diferença estatisticamente significativa (P=0,044).

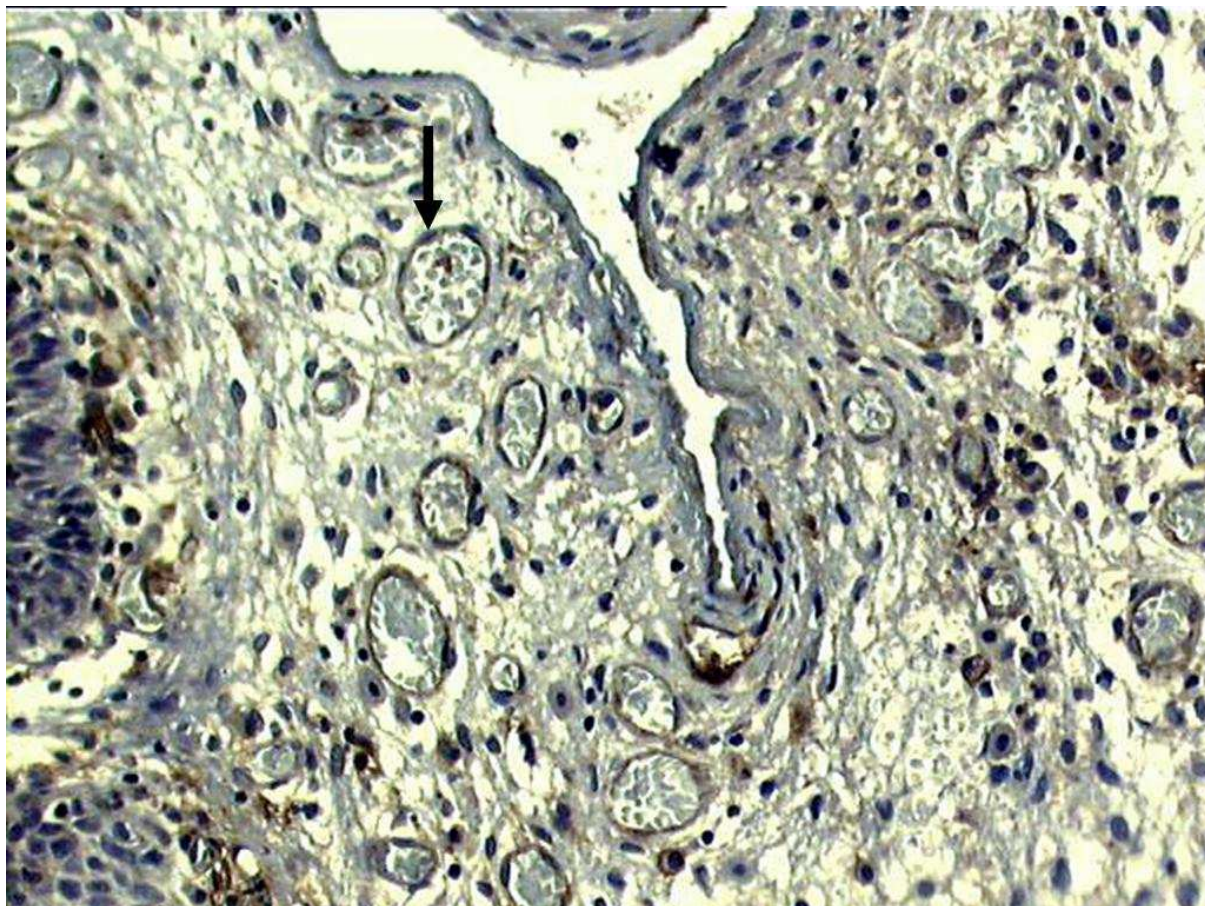


Figura 12: Colesteatoma marcado com CD 31. Aumento: 200x

A mediana da MMP 2 citoplasmática (Figura 13) foi de 0 (0 a 1). No grupo pediátrico foi igual a 1 (0 a 3), e no grupo adulto de 0 (0 a 1). Ao compararmos a quantidade de MMP2 citoplasmática entre os grupos, através do teste Mann-Whitney, encontramos diferença estatisticamente significativa ($P=0,006$).

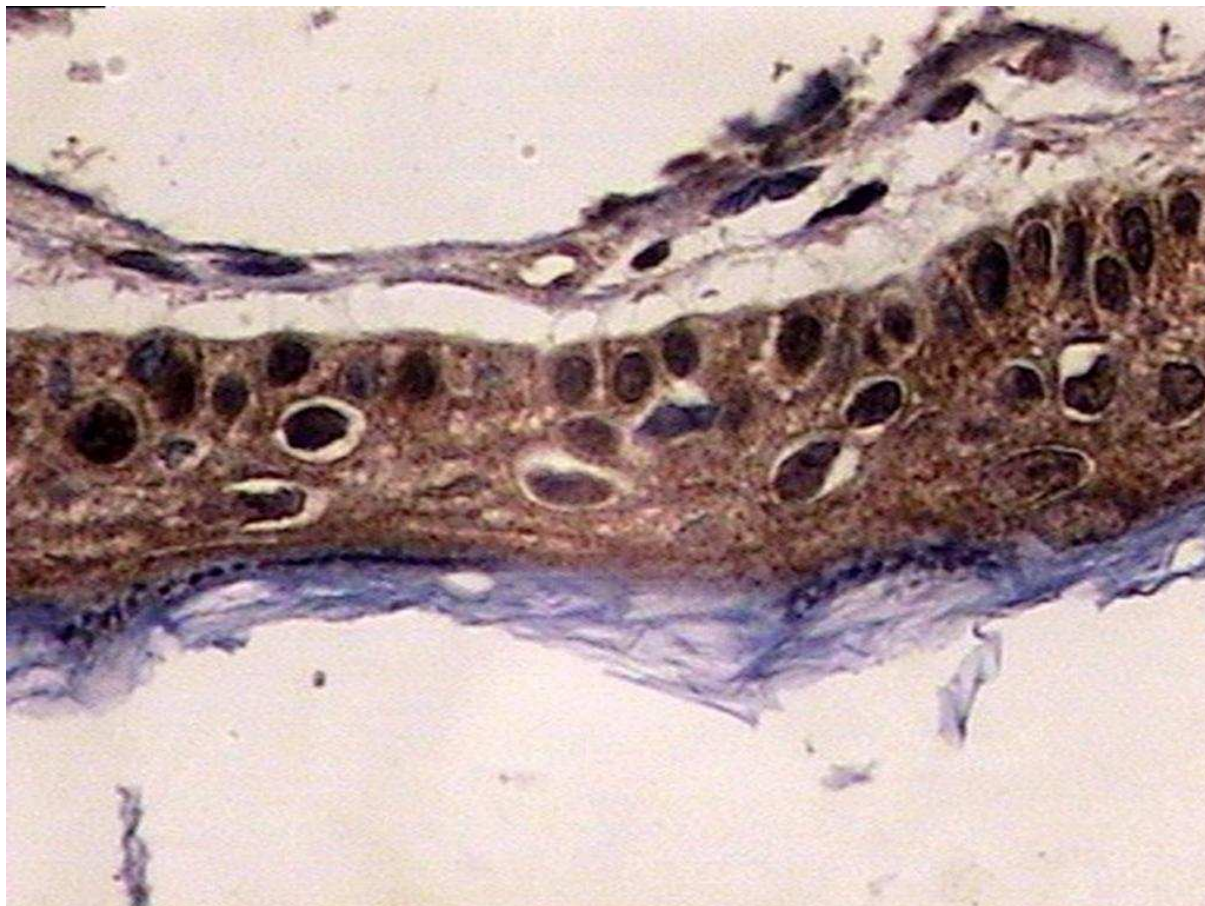


Figura 13: Colesteatomas marcados com MMP2 no citoplasma. Aumento: 200x

Os resultados para MMP2 nuclear (Figura 14) apresentaram semelhantes: mediana grupo geral foi de 0 (0 a 1); no grupo pediátrico foi igual a 1 (0 a 1), e no grupo adulto de 0 (0 a 1). Ao compararmos a quantidade de MMP2 citoplasmática entre os grupos, através do teste Mann-Whitney, encontramos uma tendência à significância ($P=0,056$).

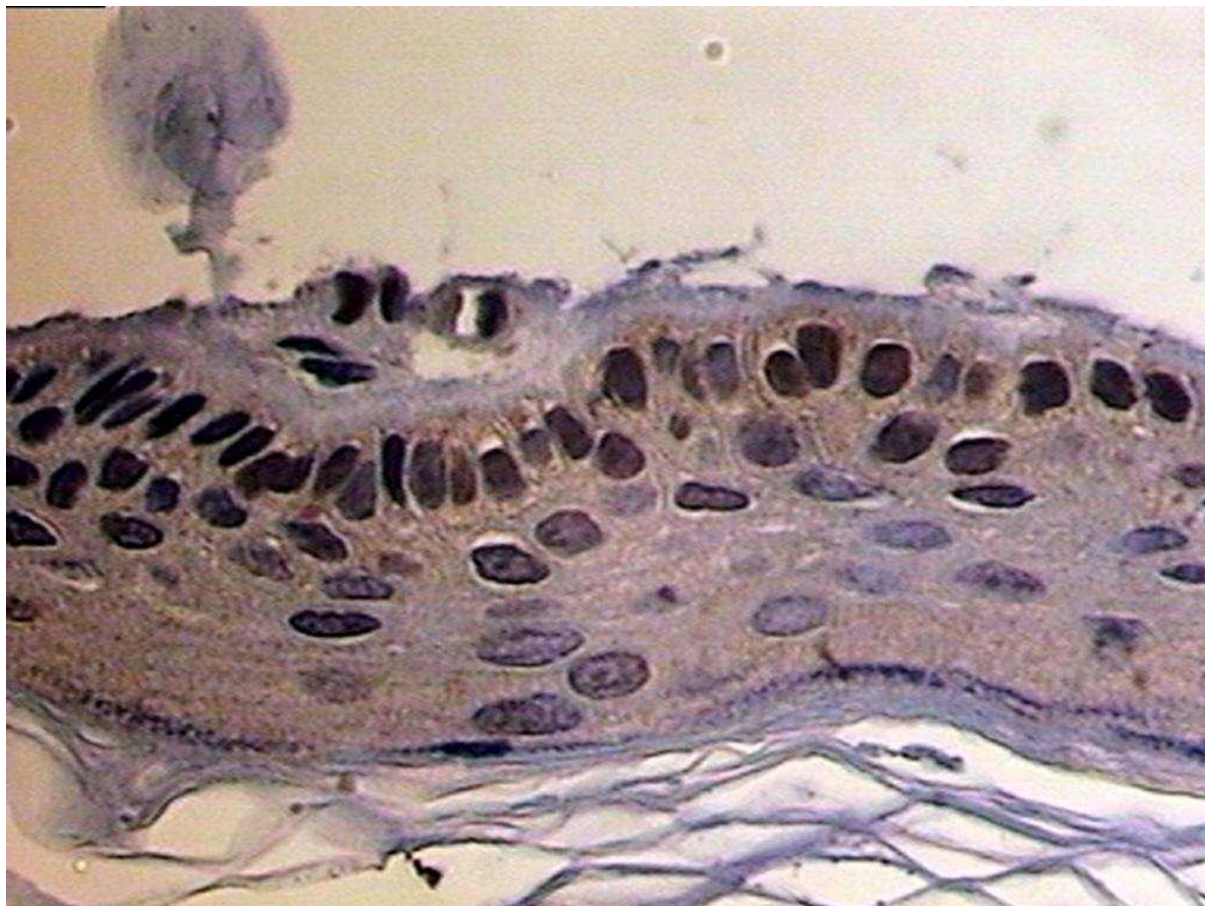


Figura 14: Colesteatomas marcados com MMP2 no núcleo. Aumento: 200x

A mediana da MMP 9 (Figura 15) foi de 1 (0 a 4). No grupo pediátrico foi igual a 2 (0 a 4), e no grupo adulto de 0 (0 a 4). Ao compararmos a quantidade de MMP9 entre os grupos, através do teste Mann-Whitney, encontramos diferença estatisticamente significativa ($P=0,049$).

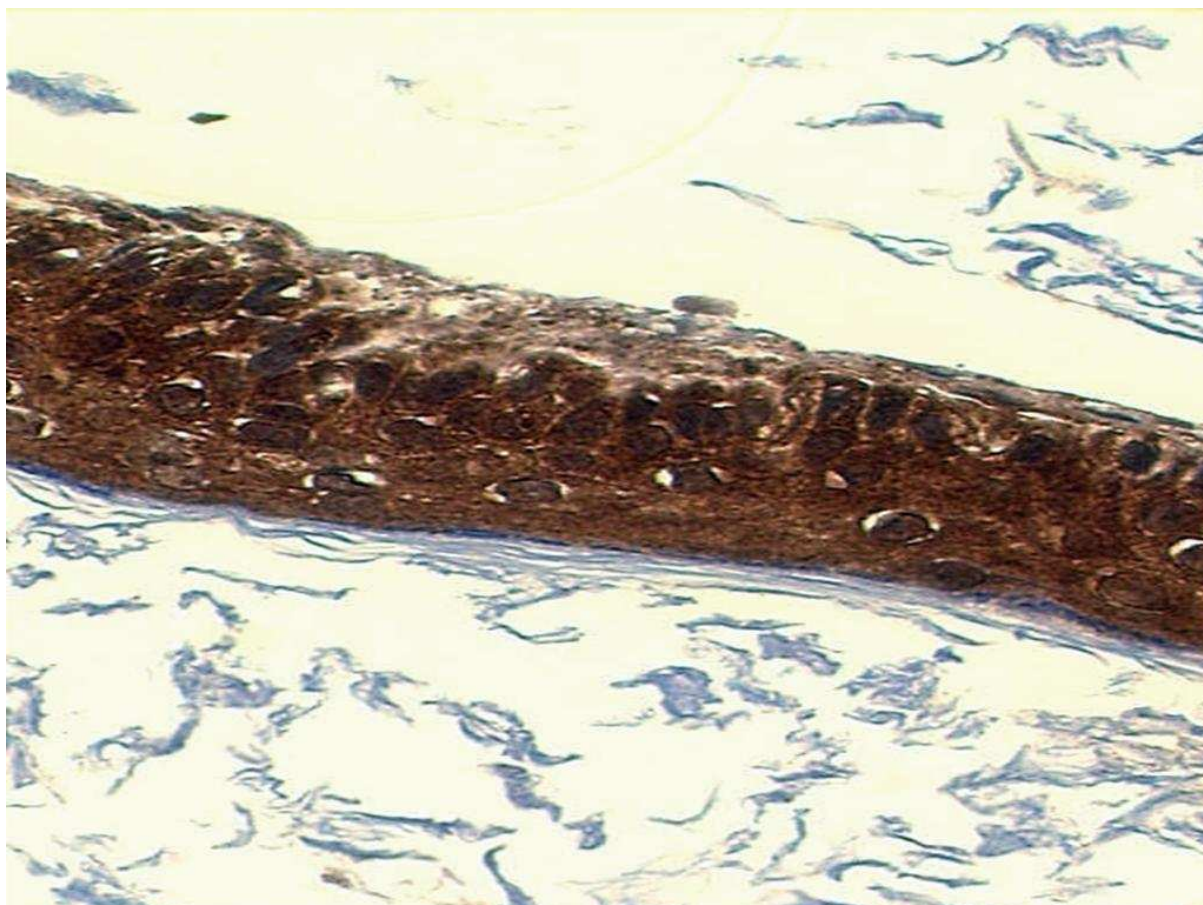


Figura 15: Colesteatomas marcados com MMP2 no citoplasma. Aumento: 200x

A tabela 2 apresenta a comparação das variáveis, entre os grupos pediátrico e adulto, através dos testes de Mann-Whitney.

Tabela 2: Comparação das variáveis estudadas entre os grupos Pediátrico e Adulto 70

Variável	Geral n=90	Pediátrico n=45	Adulto n=45	Valor P
Número de Vasos: CD31	6 (0 a 11)	7 (4 a 11)	4 (0 a 10)	0.044
MMP2 citoplasmática	0 (0 a 2)	1 (0 a 3)	0 (0 a 1)	0.006
MMP2 nuclear	0 (0 a 1)	0 (0 a 1)	0 (0 a 1)	0.056
MMP9	1 (0 a 4)	2 (0 a 4)	0 (0 a 4)	0.049

Mann-Whitney

Ao correlacionarmos o número médio de vasos sanguíneos e das metaloproteínases, entre si, e com o número médio de camadas celulares da matriz, com a espessura da

perimatriz e com o grau histológico de inflamação encontramos correlações fortes, porém somente a MMP2 citoplasmática apresentou correlação com a idade do paciente à data da cirurgia (Tabela 3).

Tabela 3: Correlações encontradas entre as variáveis estudadas

	Idade	Espessura	Matriz	CD31	MMP2 c	MMP2 n	MMP9
Idade	_____	-0.256 (0.008)	-0.010 (0.919)	-0.164 (0.160)	-0.248 (0.027)	-0.139 (0.180)	-0.154 (0.173)
Espessura	-0.256 (0.008)	_____	0.479 (<0.0001)	0.742 (<0.0001)	0.465 (<0.0001)	0.414 (<0.0001)	0.643 (<0.0001)
Matriz	-0.010 (0.919)	0.439 (<0.0001)	_____	0.473 (<0.0001)	0.302 (<0.0001)	0.183 (0.077)	0.300 (0.007)
CD31	-0.164 (0.160)	0.742 (<0.0001)	0.473 (<0.0001)	_____	0.539 (<0.0001)	0.515 (<0.0001)	0.850 (<0.0001)
MMP2 c	-0.248 (0.027)	0.465 (<0.0001)	0.302 (<0.0001)	0.539 (<0.0001)	_____	0.908 (<0.0001)	0.664 (<0.0001)
MMP2 n	-0.139 (0.180)	0.414 (<0.0001)	0.183 (0.077)	0.515 (<0.0001)	0.908 (<0.0001)	_____	0.548 (<0.0001)
MMP9	-0.154 (0.173)	0.643 (<0.0001)	0.300 (0.007)	0.850 (<0.0001)	0.664 (<0.0001)	0.548 (<0.0001)	_____

Idade= idade do paciente à data da cirurgia, em anos; Espessura= espessura da perimatriz, em micrômetros; Matriz= número médio de camadas celulares da matriz; Inflamação= grau histológico de inflamação; CD31= número médio de vasos sanguíneos na perimatriz; MMP2 c= reatividade da metaloproteinase 2 no citoplasma das células da matriz; MMP2 n= reatividade da metaloproteinase 2 no núcleo das células da matriz; MMP9= reatividade da metaloproteinase 9 no citoplasma das células da matriz; Coeficiente de Correlação de Spearman (Valor P)

6. Discussão

Iniciamos essa discussão retomando algumas questões já elencadas na introdução e revisão da literatura dessa tese. Em nossa dissertação de mestrado (Dornelles *et al.*, 2006) apresentamos evidências de que há correlação inversa entre o tamanho da perimatriz, medida em micrômetros, com a idade do paciente na data da cirurgia, e uma correlação direta dessa espessura com o número médio de camadas celulares na matriz. Com esses resultados, podemos sugerir que as características clínicas diferenciadas dos colesteatomas pediátricos poderiam estar relacionadas à intensidade do processo inflamatório na sua estrutura. Além dos indícios de um maior grau de inflamação nos colesteatomas pediátricos, já havíamos encontrado correlação direta entre o número médio de camadas de células epiteliais na matriz com a espessura da perimatriz. Esse fato poderia indicar que não só a perimatriz encontra-se mais ativa nos colesteatomas pediátricos, mas também a matriz teria um estado proliferativo, atual ou passado, mais acentuado. Esses achados corroboram a hipótese de Bujia *et al.* (1996) os quais sugeriram que os colesteatomas pediátricos apresentariam um estado acelerado de proliferação. No entanto, a técnica utilizada naquele momento não era capaz de responder se a espessura da perimatriz estava relacionada ao seu grau inflamatório ou à quantidade de fibras de colágeno em sua estrutura.

Responder esta questão é de fundamental importância visto que as fibras de colágeno são material amorfo, bioquimicamente inerte, ao contrário do processo inflamatório, que quando ativo, poderá ter repercussões clínicas.

Considerando-se que a perimatriz é formada por fibras de colágeno e células inflamatórias, elaboramos duas hipóteses para as diferenças de espessura da perimatriz, em colesteatomas adquiridos:

1. uma perimatriz mais espessa poderia ser consequência de uma maior quantidade de fibras colágenas (achado, possivelmente, acompanhado de uma menor ação das enzimas colagenases);
2. o aumento da espessura da perimatriz dever-se-ia ao processo inflamatório acentuado.

No presente estudo, pudemos demonstrar, através da quantificação do processo de angiogênese e das metaloproteinases, que a espessura da perimatriz está correlacionada com o grau inflamatório e não com a quantidade de colágeno, visto que encontramos correlação direta e forte entre a espessura da perimatriz, o grau de angiogênese e a expressão das metaloproteinases.

Os presentes achados confirmaram a existência de correlação entre o tamanho da perimatriz e seu grau histológico de inflamação, pois encontramos correlação importante e direta entre essas variáveis, ou seja, quanto maior a perimatriz maior o grau de angiogênese encontrado nos colesteatomas. Também encontramos correlação, igualmente importante e direta da angiogênese com a expressão das metaloproteinases estudadas, portanto, quanto maior a produção de metaloproteinases maior o grau de angiogênese nos colesteatomas estudados.

Além desse achado, também através do anticorpo anti-CD31, encontramos diferença da angiogênese entre as classes etárias (grupos pediátrico e adulto) e pudemos observar que, no grupo pediátrico, o número médio de vasos sanguíneos na perimatriz é bem maior do que no adulto. Esse achado sugere que o processo inflamatório é definitivamente mais exacerbado nas crianças o que poderia traduzir-se em uma agressividade maior nos colesteatomas pediátricos.

Nesse ponto, ainda resta-nos a questão da quantidade de fibras de colágeno na perimatriz, dado que estudamos através das enzimas que degradam essa proteína, as metaloproteinases.

Nossos resultados demonstraram que as metaloproteinases (MMP2 citoplasmática, MMP2 nuclear e MMP9) estão com expressão aumentada em colesteatomas pediátricos. Cabe, neste momento, ressaltar que a MMP2 citoplasmática também estava correlacionada, inversamente, com a idade do paciente à data da cirurgia, ou seja, quanto menor a idade do paciente maior é a expressão desta proteína.

Sabemos que a MMP2 é uma enzima proteolítica capaz de degradar componentes de ligação celular, característica essa que está associada com a capacidade de infiltração e invasão em tecidos adjacentes. Em processos biológicos normais, a MMP2 é uma das responsáveis pela homeostase da estrutura óssea, apresentando-se expressa em maior quantidade em doenças inflamatórias osteolíticas. Através dos resultados por nós encontrados, podemos sugerir que os colesteatomas pediátricos possuam um maior poder de invasão e erosão, em consequência da maior expressão de MMP2, do que os colesteatomas em pacientes adultos. A maior expressão de MMP2 pode dever-se ao fato de haver um processo inflamatório mais exacerbado no colesteatoma quando em crianças, pois os mediadores inflamatório estimulam a produção de metaloproteinases.

A inflamação crônica e a angiogênese são dois processos que decorrem juntos, sendo ambos estimulados por hipóxia, o que acarretará o acúmulo de macrófagos e outras células imunológicas (Murdoch *et al.*, 2005), assim como, em produção aumentada de fatores de crescimento (Folkman, 1995b; Carmeliet, 2000; Yancopoulos *et al.*, 2000; Ferrara *et al.*, 2003; Carmeliet, 2005; Semenza *et al.*, 2006).

A angiogênese apóia a inflamação, por fornecer oxigênio e nutrientes para as necessidades metabólicas das células presentes em locais inflamados (Costa *et al.*, 2007). Essa interação complexa entre inflamação crônica e angiogênese é desencadeada pela produção de óxido nítrico (NO), sendo a síntese desse ativada por agentes inflamatórios. O óxido nítrico estimula a dilatação e a permeabilidade dos vasos sanguíneos, uma característica exigida para o extravazamento de células do sistema imune. Um dos passos cruciais envolvidos nesse processo é a adesão de células imunológicas às células endoteliais da parede vascular (Kreis e Vale, 1999). As moléculas de metaloproteinases têm um papel relevante nessa etapa do processo inflamatório, e são regulados por uma variedade de mediadores inflamatórios liberados por diferentes tipos de células (Kreis e Vale, 1999; Ley, 2001; Bujia *et al.*, 1994).

A hipóxia é característica na inflamação, induzindo o aumento da expressão de fatores indutores dessa, os quais promovem a transcrição de vários genes angiogênicos (Coussens e Werb, 2004; Naldine e Carraro, 2005). A ativação do Fator Nuclear Kappa-B (NF- κ B), um fator de transcrição, é um acontecimento primário na inflamação. O NF- κ B é um molécula regulatória da expressão e da função de um grande espectro de genes, incluindo as metaloproteinases, envolvidos na sobrevivência, crescimento e migração celular (Charo e Ransohoff, 2006; Charo e Taubman, 2004; Maxwell *et al.*, 1999; Karin *et al.*, 2002; Karin, 2006). Ao todo, o apoio de vários tipos distintos de células capacita à produção contínua de

moléculas inflamatórias e de angiogênese, tais como, a ativação de metaloproteinases que degradam a matriz extracelular (Ley, 2001).

Vários trabalhos estudaram a relação da inflamação com a otite média crônica colesteatomatosa: Sudhoff *et al.* (2004), Hamzei *et al.* (2003), Dazert *et al.* (2003), Schilling *et al.* (1991), Dornelles *et al.* (2006), Dornelles (2004b), dentre outros.

Sudhoff *et al.* (2004), em modelo experimental com ratos, usaram os marcadores imunoistoquímicos CD11a, CD11b, CD14, CD51 e CD68. Os autores encontraram uma expressão aumentada das citocinas investigadas: fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), osteoprotegerina (OPG) e o ligante de osteoprotegerina (OPGL). Sugerem que esses resultados revelam os eventos básicos da biologia inflamatória na reabsorção óssea realizada por osteoclastos e fornecem novas introspecções na compreensão da erosão óssea induzida por colesteatoma.

Hamzei *et al.* (2003) investigaram a expressão de fatores de ativação e diferenciação de osteoclastos e estudaram a ocorrência de células precursoras de osteoclastos no tecido de colesteatoma adquirido humano, através de análise imunoistoquímica com uma família de CD (CD4, CD11a, CD11b, CD14, CD51, CD68). Esse estudo revelou que o número de células precursoras de osteoclastos estava aumentada na perimatriz. Esses resultados apoiam um conceito descrito para a artrite inflamatória: a inflamação relacionada ao colesteatoma induz a reabsorção do osso pela liberação de OPGL das células-T ativadas e provoca a osteoclastogênese.

Dazert *et al.* (2003) realizaram estudo para a avaliarem as taxas de proliferação e expressão das moléculas de adesão celular para analisar o papel patogenético da matriz no colesteatoma. Os parâmetros celulares-biológicos foram comparados aos achados clínicos. As taxas de proliferação da matriz foram aumentadas na comparação ao epitélio normal. As moléculas de adesão celular para junções intercelulares estavam expressas similarmente no

teste padrão nos colesteatomas e no epitélio normal. As moléculas de adesão celular para junção das células matriz mostraram expressão aumentada nos colesteatomas. Esse estudo confirma hipóteses precedentes que o crescimento dos colesteatomas não é estimulado pela matriz, mas sim que a proliferação aumentada dessa é estimulada pelo processo inflamatório na perimatriz no colesteatoma.

Schilling *et al.* (1991) caracterizaram as células que infiltraram o estroma de colesteatomas adquiridos, usando um painel dos anticorpos monoclonais (anti-CD45, anti-CD3, anti-CD22, anti-CD19). Demonstraram que os infiltrados celulares no estroma do colesteatoma são compostos principalmente de células T com os macrófagos dispersos entre eles. A expressão de HLA-DR, molécula do complexo de histocompatibilidade, era quase tão elevada quanto que a de CD45, antígeno comum leucocitário, visto que as células de CD25-positivo foram detectadas em quantidades mais baixas. Também encontraram que a maioria de células T e os macrófagos no estroma do colesteatoma estão em um estado imunologicamente ativado.

Aspectos celulares da angiogênese, ou seja, os vários níveis do processo envolvido no crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, incluem migração e proliferação de células bem como remodelação da matriz extracelular, tendo como fator chave desse processo as metaloproteinases (Bogaczewicz *et al.* 2006). A degradação dos componentes da matriz extracelular vascular é um evento significativo durante a angiogênese, sendo crucial para a formação de novos vasos sanguíneos.

Como já mencionamos, as metaloproteinases são uma classe de enzimas relacionadas com a estrutura celular, as quais são responsáveis pelo metabolismo da matriz extracelular do tecido conectivo (Visse e Nagase, 2003).

Morales *et al.* (2007) relacionaram a expressão da MMP 2 com complicações clínicas - erosão óssea da cadeia ossicular ou das proteções ósseas da orelha interna, do nervo facial e

das meninges - causadas por colesteatomas adquiridos, tendo encontrado que os colesteatomas provenientes de pacientes que apresentavam complicações clínicas tinham uma expressão imunohistoquímica de MMP2 mais intensa, quando comparados aos colesteatomas de pacientes sem complicações. Os autores sugerem que o envolvimento das metaloproteinases poderia ser fundamental no processo de erosão óssea; sendo assim sugeriram que se um colesteatoma produzir mais metaloproteinase poderá provocar erosão óssea mais intensa e, conseqüentemente, incidirá em mais complicações clínicas. Ao nosso ver essa hipótese proposta por Morales *et al.* (2007) aproxima-se de uma explicação bastante plausível para o poder de erosão óssea dos colesteatomas.

Há uma estreita relação entre os processos inflamatórios e as metaloproteinases, um *feedback* de auto-alimentação, ou seja, a inflamação provoca o aumento da produção de metaloproteinases, sendo essas fundamentais para a angiogênese que é um fenômeno indispensável da resposta inflamatória.

O fato das metaloproteinases serem enzimas associadas com a absorção patológica da matriz extracelular em processos inflamatórios crônicos (Wilmoth *et al.*, 2003), o que, portanto, as coloca como parte necessária nos processos de erosão e reabsorção óssea, foi o que nos levou a estudá-las.

Segundo Olszewska *et al.* (2004) os colesteatomas possuem a capacidade de dissolução da matriz extracelular, através de proteólise, o que lhe possibilita a invasão do estroma de tecidos adjacentes, inclusive do tecido ósseo. Em 1998, Banerjee *et al.*, demonstraram que as MMP 2 e 9 encontravam-se presentes no colesteatoma. Nossos resultados mostram imunexpressão dessas duas metaloproteinases na matriz dos colesteatomas adquiridos, sendo que a MMP 2 no núcleo e no citoplasma das células do epitélio e a MMP 9 no citoplasma.

Em 2001, Bernal-Sprekelsen *et al.* perceberam que as metaloproteinases e o fator de crescimento básico de fibroblastos poderiam explicar atividades destrutivas e proliferativas do colesteatoma. Laeeq e Faust (2007) sugerem que o estroma dos fibroblastos poderia estimular o fenótipo invasivo dos queratinócitos, inclusive a proteólise da matriz extracelular.

Zhu *et al.* (2001), em estudo experimental, demonstraram que a desordem entre metaloproteinases e seus inibidores foi uma das razões pela absorção óssea causada por colesteatoma de orelha média. Em 2003, Wilmoth *et al.* observaram, também em estudo experimental, que membranas timpânicas colocadas em cultura com toxinas de bactérias expressaram maior quantidade de metaloproteinases. Parece-nos, portanto que colesteatomas, estimulados por fatores infecciosos, produzem mais metaloproteinases. No entanto, no presente estudo, não tínhamos o objetivo de correlacionar os achados histológicos e imunoistoquímicos com os achados do estado da cadeia ossicular, bem como com possíveis agentes infecciosos.

Considerando-se os resultados apresentados nessa tese podemos sugerir que a agressividade dos colesteatomas reside nos processos bioquímicos que ocorrem na perimatriz e que é nessa estrutura do colesteatoma onde são desencadeados os gatilhos da erosão óssea, marca registrada da otite média crônica colesteatomatosa. Ainda, podemos inferir que os colesteatomas pediátricos são mais agressivos que os de adultos, visto que apresentam um grau inflamatório mais exacerbado e uma maior produção de metaloproteinases.

Todavia, as metaloproteinases estão envolvidas no processo de remodelação óssea, que apesar de ocorrer durante a vida toda, apresenta-se em escala exponencial durante a infância. Apesar de não termos esse dado, pois não era o foco de nossa tese, parece-nos provável que nessa faixa etária haja uma maior produção de metaloproteinases. Entretanto, como nossos resultados apontam uma forte correlação direta entre o processo inflamatório e a produção de metaloproteinases na perimatriz de colesteatomas adquiridos, podemos sugerir

que a produção das metaloproteinases nos colesteatomas estudados está mais relacionada ao processo inflamatório do que ao *background* dessas enzimas no grupo pediátrico.

Costa, em comunicação pessoal, fez uma analogia da perimatriz com um “campo de batalha”, sugerindo que seria nessa região histológica do colesteatoma onde ocorreria a disputa, com os tecidos adjacentes da mucosa da caixa timpânica, pelo território da orelha média. Com a expansão do colesteatoma, a inflamação aumentaria produzindo mais elementos da cascata inflamatória. De um lado, no ataque, encontra-se o colesteatoma; de outro, os tecidos adjacentes da mucosa da caixa timpânica. Com a expansão do colesteatoma, a reação inflamatória aumentaria, conseqüentemente produziria mais elementos da cascata inflamatória. Sendo assim, baseados em nossos achados, podemos sugerir que as características clínicas diferenciadas dos colesteatomas pediátricos estariam relacionadas à exuberância da sua inflamação.

No entanto, a grande discussão da patogênese da otite média crônica colesteatomatosa leva-nos sempre ao um grande elo perdido: qual o fator desencadeante desse processo? Tentando ilustrar nossa contribuição sobre a patogênese da otite média crônica, apresentamos uma representação esquemática (Figura 16) de possíveis eventos decorrentes de uma retração timpânica que culmine com seu toque na cadeia ossicular.

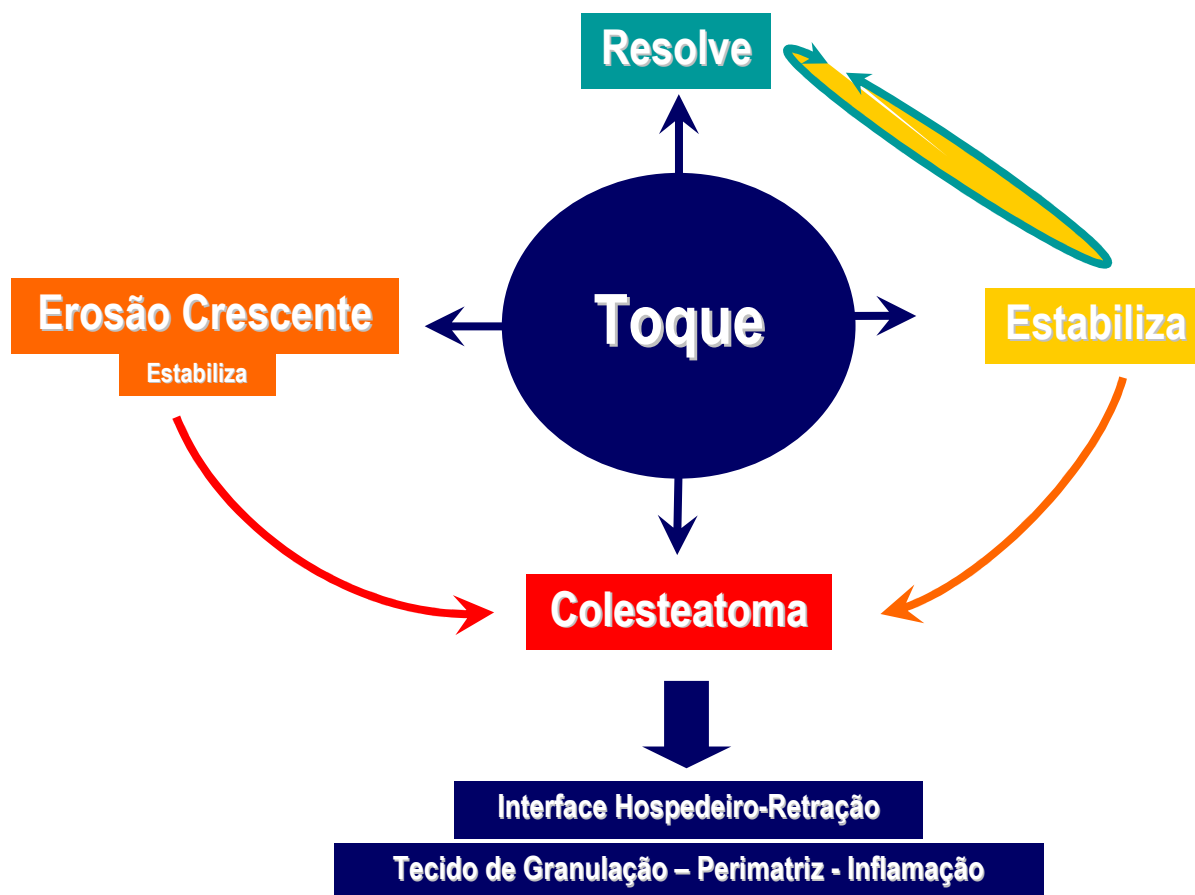


Figura 16: Representação esquemática de possíveis eventos decorrentes de uma retração timpânica, com o toque dessa na cadeia ossicular

Considerando-se que o primeiro evento desse processo seja o toque da membrana timpânica na cadeia ossicular, os próximos passos seguirão um dos quatro caminhos de uma encruzilhada:

1 – Resolução: formas incipientes que reverterem à normalidade por atuação terapêutica ou espontaneamente;

2 – Estabilização sem erosão (aparente) da cadeia ossicular (não se descarta microerosões): casos, não raros na clínica, em que estas retrações permanecem sem processo inflamatório ativo, por anos sem qualquer complicação;

3 – Erosão grosseira da cadeia ossicular e posterior estabilização: as chamadas “retrações secas”.

4 – Formação do colesteatoma: desestabilização da retração, com inflamação ativa e recorrente e possível colesteatomatização, o ápice dessa pirâmide.

O aparecimento e a evolução do colesteatoma parecem ser multifatoriais e, provavelmente, relacionados às características genéticas e ambientais, envolvendo aspectos de biologia molecular, com marcada ação de citoqueratinas presentes em células epiteliais, com características latentes de proliferação e migração, assim como da atuação em cascata de citocinas, proteínas produzidas pelas células em resposta ao processo inflamatório, que atuam modificando as características das próprias células e as de tecidos próximos (Liang *et al*, 2003). Esta interação entre as citocinas acaba sendo, ao mesmo tempo, causa e efeito da características dos colesteatomas (Ribeiro e Pereira, 2003).

Em nossa visão sobre a patogênese dos colesteatomas adquiridos o fator desencadeante de todo processo de colesteatomatização reside na diminuição de pressão dentro da orelha média (Figura 17). A redução pressórica na orelha média poderá levar à retração progressiva da membrana timpânica, com formação de bolsa de retração, a qual, após perder seu poder de auto-limpeza, acumularia epitélio descamado.

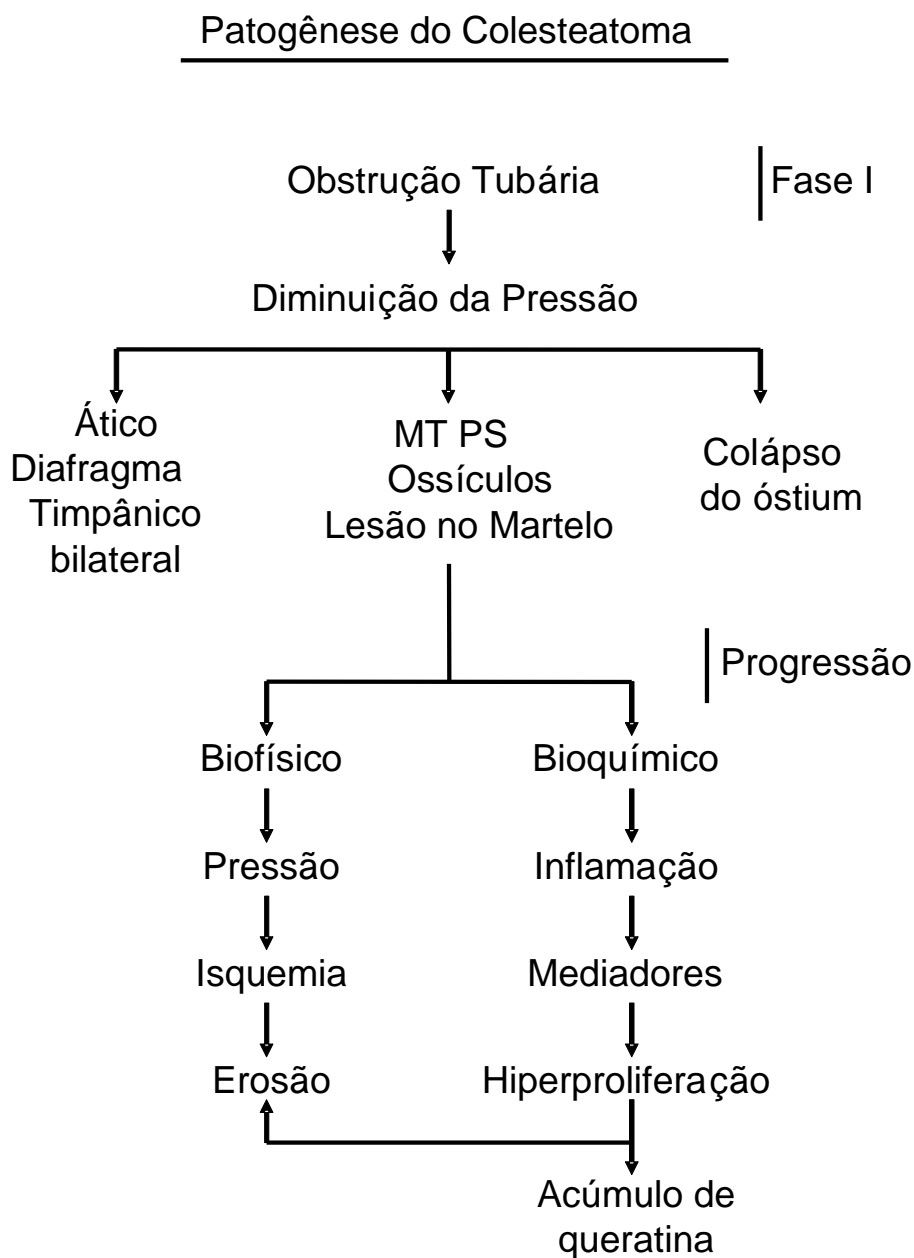


Figura 17: Hipótese de patogênese dos colesteatomas adquiridos

Partindo-se de uma orelha normal, um fator desencadeante inicial em um primeiro momento (infecções de vias aéreas superiores, alergias, barotraumas, entre outros), ou seja, na fase reversível de todo este processo, seria a disfunção tubária funcional ou mecânica. Uma vez que a tuba auditiva fosse incompetente para equilibrar as pressões atmosféricas e intratimpânicas, mesmo com o auxílio de manobras voluntárias, a entrada de ar na orelha média diminuiria e a aeração dependeria exclusivamente do estabelecimento de um gradiente

pressórico, entre as extremidades nasofaríngeas e timpânicas da tuba; esse mecanismo de regulação pressórica parece ser muito comum nas crianças (Bluestone, 1981).

A membrana timpânica com suas duas porções (flácida e tensa), por ser a única parede distensível da orelha média é a mais delicada. A parte tensa poderia sofrer processos de atrofia localizados ou difusos; a atrofia difusa poderia também levar à retração timpânica total, com a membrana praticamente recobrando as estruturas da orelha média, sem entretanto fixar-se a elas. Uma outra situação surgiria caso a retração se limitasse à região pósterosuperior; a progressão dessa retração seria acompanhada da erosão da apófise longa da bigorna e desse segmento timpânico alterado com a cabeça do estribo, independentemente da formação de colesteatomas.

Em relação à parte flácida da membrana timpânica, é mais comum a formação de bolsas de retrações aticais, inicialmente com propriedades de auto-limpeza dessas, porém, na evolução desse quadro, essas propriedades seriam perdidas, sendo que o epitélio pavimentoso estratificado queratinizado do canal auditivo externo migraria para o interior da orelha média e acumular-se-ia na região retraída, posteriormente encistando-se e dando origem ao colesteatoma.

Esse mesmo processo poderia ocorrer nas retrações timpânicas pósterosuperiores. Nessas situações, entretanto, parece que um segundo fator poderia somar-se na gênese do colesteatoma. A infecção dessa área e a conseqüente irritação e hiperplasia de células da camada basal acrescentaria correntes de células escamosas em direção à orelha média.

Essa série de eventos não evoluiria necessariamente em um sentido uni-direcional. Na verdade, a evolução do processo poderia ser modificada por vários fatores extrínsecos e intrínsecos à orelha com desaceleração da reação inflamatória; podendo o processo inflamatório apresentar-se com graus variados de evolução e com aspectos heterogêneos dentro de uma mesma orelha.

A presença de colesteatoma na fenda auditiva de pacientes com otite média crônica, indubitavelmente, resulta em maior morbi-mortalidade decorrente do grande poder de erosão óssea destes acúmulos epiteliais (Sadé, Halevy, 1974; Bretlau *et al*, 1982).

A absorção óssea é estimulada por uma variedade de fatores, incluindo a inflamação, a pressão local e citoqueratinas específicas (Olszewska *et al*, 2004). O conceito enzimático, no qual enzimas de origem epitelial são consideradas as responsáveis pela destruição óssea, foi definido por Abramson e Huang (1976), o qual demonstrou a presença de collagenases e hidrolases no colesteatoma, hipótese posteriormente confirmada por Thompsen (1977). Ferlito *et al* (1997) sugeriram que a propriedade destrutiva dos colesteatomas, a erosão óssea, é causada pela produção de collagenase pelos componentes dos tecidos epitelial escamoso e fibroso. À hipótese de reabsorção óssea por ação bioquímica, exclusivamente exercida por enzimas collagenolíticas, foram incorporados, posteriormente, outros agentes, como o fator de necrose tumoral (TNF), as interleucinas (IL-1 α) e as prostaglandinas (PGE₂) (Minotti *et al*, 1996; Kurihara *et al*, 1991; Hansen *et al*, 2001).

Apesar de haver erosão óssea na otite média crônica não colesteatomatosa, em aproximadamente 40% dos casos por nós estudados, o colesteatoma traz consigo um aumento significativo dessa prevalência (90% em adultos e 100% em crianças de nossa amostra), tornando-se um evento quase que universal. Acreditamos que a destruição óssea seja decorrente da interação dos mecanismos biofísicos e bioquímicos.

No processo biofísico a pressão exercida pela massa do colesteatoma levaria à isquemia, seguida de necrose óssea, até esse momento sem envolvimento de nenhum mediador químico. No entanto, no processo bioquímico temos como fator principal a inflamação, tanto a que ocorre na orelha média quanto na perimatriz do colesteatoma. Seja por um agente externo (infecção no canal auditivo externo) seja por força interna (inflamação na orelha média) as reações desencadeiam um sistema de retroalimentação que poderá levar à

hiperproliferação da matriz do colesteatoma, quando serão produzidas mais metaloproteinases. Sabemos que os mediadores inflamatórios são fatores cruciais no estímulo à produção de metaloproteinases pela matriz, e que essas enzimas agirão na remodelação da matriz extracelular provocando a erosão ossicular.

No entanto, as duas grandes incógnitas desse processo são como ele se inicia e qual o ponto de passagem entre a retração e o colesteatoma.

Ao lembrarmos-nos da hipótese do *continuum* (Paparella, 1970) e ao analisarmos a seqüência de eventos desde a retração da membrana timpânica até a colesteatomatização da orelha média, podemos considerar que o colesteatoma seria o ápice de uma única doença, a otite média crônica, e não um evento isolado. Além de outras características intrínsecas do paciente, parece-nos que o envolvimento da resposta inflamatória na patogênese dos colesteatomas deva ser fundamental (Dornelles *et al.*, 2006).

Ao final desse trabalho podemos concluir que o processo inflamatório no grupo pediátrico é mais acentuado (maior angiogênese nesse grupo). Porém, a diferença encontrada entre os colesteatomas pediátricos e adultos talvez possa dever-se ao meio onde eles se desenvolvem, ou seja, talvez o colesteatoma na criança repercurta a maior instabilidade da orelha média nessa faixa etária. Estruturalmente os colesteatomas em crianças e adultos são semelhantes, com exceção da espessura da perimatriz, os demais componentes histológicos assemelham-se. A desestabilização da orelha média poderia acontecer por dois processos distintos, chamados por Costa (1997) de *inside-out* ou *outside-in*.

Na situação *inside-out* ocorreria algum processo intratimpânico, possivelmente inflamatório-infeccioso, com repercussão sobre a perimatriz, a qual se desestabilizaria, ou seja, haveria exacerbação da inflamação, com conseqüente aumento da produção de mediadores bioquímicos (produtos da cascata inflamatória e metaloproteinases). Toda essa aceleração bioquímica na perimatriz estimulará a hiperproliferação da matriz, descamação e

acúmulo de epitélio, em outras palavras, a formação de colesteatoma. No processo *outside-in*, onde encontramos uma membrana timpânica retraída, debilmente estabilizada, um irritante externo, por exemplo, uma contaminação por água, estimularia a camada mais externa, ou seja, a matriz, que desencadeará a mesma seqüência de eventos até a formação do colesteatoma. Sendo assim, podemos sugerir que a matriz e a perimatriz estimulam-se mutuamente, num sistema de retro alimentação, a atividade da perimatriz estimula a proliferação da matriz, essa por sua vez, envia mensageiros para a perimatriz que provocaram o aumento da produção de metaloproteinases e inflamação, o que levará a mais proliferação do epitélio. Na criança, tanto nos casos *inside-out* ou *outside-in* a desestabilização da orelha média seria mais acentuada.

Conjugando a hipótese de que a orelha média em crianças seria mais instável com os nossos achados nessa tese, podemos vislumbrar algumas implicações clínicas no tratamento da otite média crônica no grupo pediátrico. Levando em consideração uma possível atividade bioquímica maior dos colesteatomas na criança, devemos pensar em duas situações especiais nessa faixa etária: a prevenção precoce e o tratamento cirúrgico mais agressivo.

Desde o primeiro relato da técnica de mastoidectomia, em 1649, por Riolanus, até os dias atuais, essa cirurgia passou por uma evolução gradual, auxiliada por pesquisas nesse campo e pelo desenvolvimento tecnológico. No entanto, problemas tal como morbidez operatória, recorrência de doença, e gerência de candidatos de alto-risco cirúrgico ainda apresentam obstáculos desafiantes para o otologista superar (Minotti *et al*, 1996). Ainda estamos em estágios muito iniciais nas pesquisas para tratamentos clínicos e profiláticos para os colesteatomas, porém algumas substâncias já foram testadas para avaliar sua ação na inibição dos colesteatomas, tais como: ácido trans-retinóico, inibidores de metaloproteinases, de citoqueratinas e da reabsorção óssea. Como nessa tese trabalhamos com as

metaloproteinases, discorreremos, nessa discussão, sobre uma alternativa terapêutica com o emprego dessas enzimas.

Em processos fisiológicos normais, a liberação de enzimas proteolíticas, dentre elas as metaloproteinases, é controlada por inibidores enzimáticos, através de um equilíbrio dinâmico, fato que é necessário para que ocorram os reparos em tecidos lesados (Kraien e Korem, 2000). Contudo, quando há um desequilíbrio dessa homeostase orgânica, os inibidores enzimáticos teciduais serão pouco eficazes em decorrência de a balança tender para a produção descontrolada das enzimas proteolíticas. Além desse desequilíbrio entre as enzimas proteolíticas e seus inibidores, substâncias anti-angiogênicas, tal como a angiostatina, parecem, igualmente, desempenhar papel ineficaz quando a homeostase é perdida (Pastor e Giorgi, 2002).

A inibição das formas ativas de metaloproteinases pode dar-se pela ação de seus inibidores teciduais (TIMP). A aplicação de TIMP como ferramenta terapêutica através de terapia gênica ou aplicação direta de proteína está em fase inicial de desenvolvimento (Baker *et al.*, 2002). No entanto, há um claro potencial para a aplicação de TIMP como inibidores endógenos (Zucker *et al.*, 2000), provavelmente o caminho para o êxito será o desenvolvimento de TIMP com especificidade alterada, as quais permitam um direcionamento para proteinases específicas (Nagase *et al.*, 2006).

O distúrbio no balanço das MMP e das TIMP pode ser encontrado em várias doenças, tais como câncer, artrite reumatóide e periodontite (Verstappen *et al.*, 2006) tendo um importante papel na patofisiologia de diversas condições inflamatórias (Medina e Radomski, 2006).

Segundo Schonemark *et al.* (1996) as TIMP puderam ser localizadas, em seu estudo, em poucas áreas restritas ao tecido de granulação nos colesteatomas. Uma desregulação do

equilíbrio MMP-TIMP, nos colesteatomas, poderia causar o aumento da ação proteolítica dos mecanismos de degradação óssea (Yang *et al.*, 2002).

Diferentes MMP e TIMP são expressas em células ósseas, sendo sua biosíntese regulada por fatores hormonais locais e sistêmicos (Varghese, 2006). As funções das MMP e das TIMP, no osso, incluem a degradação do colágeno e de outros componentes da matriz óssea; a migração e a sobrevivência de células ósseas; a formação e a reabsorção óssea. A expressão anormal das MMP, ou seja, a desregulação do complexo inibitório MMP-TIMP, pode levar a condições patológicas que afetam ossos e cartilagens.

A possibilidade do envolvimento da metaloproteinases na patogênese e, principalmente, atividade dos colesteatomas, coloca-nos o desafio de buscarmos alternativas terapêuticas, possivelmente com os inibidores sintéticos de metaloproteinases. Estudos experimentais, tanto em laboratório quanto em humanos, deverá ser o próximo passo em nossa linha de pesquisa.

Ao final dessa tese e em conjunto com os estudos anteriormente realizados por nosso grupo (Dornelles *et al.*, 2005, Dornelles *et al.*, 2006) podemos perceber a sobreposição de evidências que indicam uma maior agressividade da otite média crônica colesteatomatosa em crianças, visto que nesses pacientes os colesteatomas adquiridos apresentam uma perimatriz mais espessa, possuem um processo inflamatório mais exacerbado, um maior grau de angiogênese e produzem mais metaloproteinases que os colesteatomas de pacientes adultos. Sendo assim, podemos sugerir, que esses fatores conjugados, levam a otite média crônica colesteatomatosa a ser mais agressiva em crianças do que em adultos.

7. Conclusões

7.1 A expressão dos anticorpos anti-CD31, anti-MMP2 (citoplasmática e nuclear) e anti-MMP9 é maior no grupo pediátrico.

7.2 O número médio de vasos sanguíneos está fortemente correlacionado com a quantidade de metaloproteinases, com o número médio de camadas celulares da matriz, com a espessura da perimatriz, com o grau histológico de inflamação.

7.3 A expressão da metaloproteinase 2, tanto citoplasmática quanto nuclear, estava fortemente correlacionada com a espessura da perimatriz, com o grau histológico de inflamação e o com número médio de camadas celulares da matriz.

7.4 A expressão da metaloproteinase 2 citoplasmática estava correlacionada, inversamente, com a idade do paciente à data da cirurgia.

7.5 A expressão da metaloproteinase 9 estava fortemente correlacionada com a espessura da perimatriz, com o grau histológico de inflamação e com o número médio de camadas celulares da matriz.

8. Referências

- Abramson M. Collagenolytic activity in middle ear cholesteatoma. *Ann Otol.* 1969; 78:112-25.
- Abramson M. Collagenase in the mechanisms of action of cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1971(a); 80(3):414.
- Abramson M, Asarch RG, Litton WB. Experimental aural cholesteatoma causing bone resorption. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1975; 84:425-32.
- Abramson M, Gross J. Further studies on a collagenase in middle ear cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1971(b); 80:177-85.
- Abramson M, Huang CC. Localization of collagenase in human middle ear cholesteatoma. *Laryngoscope* 1976; 86:771-91.
- Albino AP, Kimmelman CP, Parisier SC. Cholesteatoma: a molecular and cellular puzzle. *Am j Otol.* 1998(a); 19:7-19.
- Albino AP, Reed JA, Bogdany JK, Sassoon J, Desloge RB, Parisier SC. Expression of p53 protein in human middle ear cholesteatomas: pathogenetic implications. *Am J Otol.* 1998(b); 19(1):30-6.
- Allaire E, Forough R, Clowes M, Starcher B, Clowes AW. Local overexpression of timp-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J Clin Invest.* 1998; 102:1413–20.
- Aumente PO, Bujia J, Kim C, Jimenez-Gimenez J, Lopez-Villarejo P. Estudio cuantitativo de la presencia de interleucina-1 e interleucina-6 en el colesteatoma de oído medio. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 1996; 47(4):259-62.
- Axon PR, Fergie N, Saeed SR, Temple RH, Ramsden RT. Petrosal cholesteatoma: management considerations for minimizing morbidity. *The Am J Otol.* 1999; 20(4):505-10.
- Baak JPA. *Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis.* Springer-Verlag, 1991.
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002;115:3719–27.
- Banerjee AR, James R, Narula AA. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in cholesteatoma and deep meatal skin. *Clin Otolaryngol,* 1998 aug; 23(4):345-7.
- Berisio R, Vitagliano L, Mazzarella L, Zagari A. Crystal structure of the collagen triple helix model [(pro-pro-gly)₁₀]₃. *Protein Science* 2002; 11: 262-70.
- Bernal-Sprenkelsen M, Ebmeyer J, Anonopoulos A, Borkowski G, Sudhoff H. Alteraciones de la membrana basal en el colesteatoma de oído medio. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2001 may; 52(4):330-5.
- Bluestone CD. Recent advances in the pathogenesis, diagnosis and management of otitis media. *Pediatr. Clin. North. Am.,* 28(4):727-55, 1981.
- Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 55:639–52.

- Bode W, Gomis-Rüth FX, Stöckler W. Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (hexxhxxgxxh and met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins.” *Febs Lett.* 1993; 331:134–40.
- Bogaczewicz J, Dudek W, Zubilewicz T, Wronski J, Przywara S, Chodorowska G, Krasowska D. The role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in angiogenesis. *Pol Merkur Lekarski* 2006 jul; 21(121):80-5.
- Bollmann R, Kopp U, Tolsdorff P. DNA cytometric studies of cholesteatoma of the middle ear. *HNO* 1991, 39: 313-14.
- Bretlau P, Jorgensens MB, Sorensens CH, Dabelsteen E. Bone resorption in human cholesteatomas. *Ann Otol.* 1982; 91:131-5.
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1477:267–83.
- Broekaert D, Coucke P, Lepercque S, Ramaekers F, van Muijen G, Boedts D, Leigh I, Lane B. Immunohistochemical analysis of the cytokeratin expression in middle ear cholesteatoma and related epithelial tissues. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1992; 101:931-8.
- Bujia J, Holly A, Kim C, Scanady N, Kastenbauer E. Expression of human intercellular adhesion molecules in middle ear cholesteatoma. *Am J Otolaryngol.* 1994 jul-aug;15(4):271-5.
- Bujia J, Holly A, Antoli-Candela F, Tapia MP. Immunobiological peculiarities of cholesteatoma in children: quantification of epithelial proliferation by mib1. *Laryngoscope* 1996(a); 106(7):865-8.
- Bujia J, Kim C, Ostos P, Kastenbauer E, Hultner L. Role of interleukin 6 in epithelial hyper proliferation and bone resorption in middle ear cholesteatomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1996(b); 253(3):152-7.
- Bujia J, Schiling V, Holly A, Stammberger M, Kastenbauer E. Hyperproliferation-associated keratin expression in human middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 1993; 113:364-8.
- Butler GS, Will H, Atkinson SJ, Murphy G. Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase a and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Eur J Biochem.* 1997; 244:653–7.
- Cao Y, Linden P, Shima D, Browne F, Folkman J. *In vivo* angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest* 1996; 98(11):2507-11.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000, 407:249–57.
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005, 438:932–6.
- Cawston T. Matrix metalloproteinases and timp: properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today* 1998; 4:130-7.
- Champe PC, Harvey RA. *Bioquímica ilustrada*. 2ª ed. editora Artes Médicas, 1996.
- Chao WY, Shen CL. Ultrastructure of the middle ear mucosa in patients with chronic otitis media with cholesteatoma. *Arch Otorhinolaryngol.* 1996, 253(1-2):56-61.
- Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006, 354:610–21

- Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 2004, 95:858–66
- Chole RA. The molecular biology of bone resorption due to chronic otitis media. *Ann New York Acad Sci.* 1997, 830:95-109.
- Chole RA, Faddis BT. Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002, 128:1129-33.
- Chole RA, Faddis BT, Chamberlain S, Magilke D. Invasiveness of fibroblasts from experimental cholesteatomas. *Otol Neurotol.* 2001(b), 22(1):15-7.
- Chole RA, Hughes RM, Faddis BT. Keratin particle-induced osteolysis: a mouse model of inflammatory bone remodeling related to cholesteatoma. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2001(a), 2(1):65-71.
- Costa C, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 2007, 10(3):149-66.
- Costa SS. Contribuição ao estudo das otites médias crônicas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 1991.
- Costa SS, de Souza LCA, Andrade MI. Procedimentos sobre o temporal – revisando a nomenclatura. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1991, 57(4):170-9.
- Costa SS, Rosito LPS, Dornelles C. The Contralateral Ear in Chronic Otitis Media: A Series of 500 Patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008, 134(3):290-2.
- Costa SS, Dornelles C. Otite média crônica colesteatomatosa. In: Costa SS, Cruz OLM, de Oliveira JAA e colaboradores. *Otorrinolaringologia Princípios e Práticas*, 2ª edição. Editora Artmed 2006 p. 309-33.
- Costa SS, Roithmann R, Matheus MC. A patogênese dos colesteatomas. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 1992, 57(4):30-5.
- Coussens L, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2004, 420:860–867
- Cruz OLM, Costa SS. *Otologia clínica e cirúrgica*. Ed. Revinter, 1999.
- Cruz OL, Kasse CA, Leonhart FD. Efficacy of surgical treatment of chronic otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003, 1:263-6.
- Cureoglu S. Immunohistochemistry and histopathological assessment of the cholesteatoma of the ear. *Otol Neurotol.* 2004, 25(3):416-7.
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *science* 1994; 265(5178):1582-4.
- Darrouzet V, Duclos JY, Portmann D, Bebear JP. Preference for the closed technique in the management of cholesteatoma of the middle ear in children: a retrospective study of 215 consecutive patients treated over 10 years. *Am J Otol.* 2000, 21(4): 474-81.
- Dazert S, Aletsee C, Brors D, Sudhoff H, Ryan AF, Muller AM. Regeneration of inner ear cells from stem cell precursors--a future concept of hearing rehabilitation? *DNA Cell Biol.* 2003; 22(9):565-70
- de Jove MA, Vassalli L, Raslan W, Applebaum EL. The effect of isotretinoin on propylene glycol-induced cholesteatoma in chinchilla middle ears. *Am J Otolaryngol.* 1990; 11:5-9.

Derlacki EL, Clemis JD. Congenital cholesteatoma of the middle ear and mastoid. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1965, 74:706-27. Cruz OLM, Costa SS. *Otologia clínica e cirúrgica.* Ed. Revinter, 1999.

Desloge RB, Carew JF, Finstad CL, Steiner MG, Sassoon J, Levenson MJ, Staiano-Coico L, Parisier SC, Albino AP. DNA analysis of human cholesteatomas. *Am J Otol.* 1997(a), 18(2):155-9.

Desloge RB, Finstad CL, Sassoon J, Han JC, Parisier SC, Albino AP. Altered regulation of cell surface peptidases in human cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997(b), 116(1):58-63.

Djonov V, Högger K, Sedlacek R, Laissue J, Draeger A. MMP9: cellular localization of a novel metalloproteinase within normal breast tissue and mammary gland tumors. *J Pathol.* 2001, 195:135-7.

Dornelles C, Costa SS, Meurer L, Schweiger C. Comparação da espessura da perimatriz, de colesteatomas adquiridos, entre pacientes pediátricos e adultos. *Rev Bras ORL* 2005a; 71(6):792-7.

Dornelles C, Schimdt LP, Meurer L, Costa SS, Oliveira M, da Silva AR. Correlação da cadeia ossicular no trans-operatório com achados histológicos de colesteatomas. *Rev Bras ORL IV Congresso Triológico de Otorrinolaringologia* 2005b; p 74.

Dornelles C, Costa SS, Meurer L, Schweiger C. Descrição histológica de colesteatomas adquiridos: comparação entre amostras de crianças e de adultos. *Rev Bras ORL* 2006; 72(5):641-8.

Dornelles C, Costa SS, Laux M, Weber R. Estudo comparativo da dissolução de três diferentes marcas de colágeno utilizadas em técnicas cirúrgicas otológicas. *Rev Bras ORL* 2003, 69(6):744-51.

Dornelles C, Costa SS, Meurer L, Coelho A, Cursino A. Correlação entre a inflamação clínica e a espessura da perimatriz de colesteatomas adquiridos. *Revista on-line do HCPA, www.hcpa.ufrgs.br*, 2004b.

Dornelles C, Hemb L, Schweiger C, Matter R, Smith M, Schimdt L, Costa SS. Epidemiologia dos pacientes pediátricos do ambulatório de otite média crônica no hospital de clínicas de porto alegre (AOMC-HCPA). *Anais do Congresso Brasileiro de Otorrinolaringologia*, 2004(a).

Dornelles C, Weber R, Schimdt VB, Schimdt L, Dall'igna D, Carvalhal L, Kruse L, Costa SS. Descrição da cadeia ossicular no trans-operatório de pacientes com otite média crônica. *Pesquisa: logos e práxis. Unidade de Pesquisa do Instituto de Cardiologia*, 2002:221.

Durko M, Kaczmarczyk D. Proliferation activity and apoptosis in granulation tissue and cholesteatomain middle ear reoperations. *Folia Morphol* 2004, 63(1):119-21.

Edelstein DR. Acquired cholesteatoma in pediatric age group. *The Otol Clin North Am.* 1989, 22(5):955-64.

Edelstein DR, Parisier SC, Ahuja GS. Cholesteatoma in the pediatric age group. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1988, 97:23-9.

English WR, Puente XS, Freije JM, Knäuper V, Amour A, Merryweather A, López-Otín C, Murphy G. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (mmp17) has tumor necrosis factor- α convertase activity but does not activate pro-mmp2. *J Biol Chem.* 2000; 275:14046-55.

- Ergun S, Zheng X, Carlsoo B. Antigen expression of epithelial markers, collagen iv and ki-67 in middle ear cholesteatoma. an imunohistochemical study. *Acta Otolaryngol.* 1994; 114(3):295-302.
- Fedak PW, Altamentova SM, Weisel RD, Nili N Ohno N, Verma S, Lee TY, Kiani C, Mickle DA, Strauss BH, Li RK. Matrix remodeling in experimental and human heart failure: a possible regulatory role for timp-3. *Am J Physiol.* 2003; 284:h626–34.
- Ferlito O, Devaney KO, Rinaldo A, Milroy C, Wenig B, Iurato S, McCabe BF. Clinicopathological consultation ear cholesteatoma versus cholesterol granuloma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1997, 106:79-85.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003, 9:669–76.
- Fisch U. Intracranial complications of cholesteatoma. in: swartz, j. d. colesteatomas of the middle ear. diagnosis, etiology and complications. *Radiol Clin North Am.* 1984, 22:15-34.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285(21):1182-6.
- Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 1986; 46(2):467-73.
- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990, 82:4-6.
- Folkman J. Seminars in medicine of the beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995a; 333(26):1757-63.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995b, 1:27–31.
- Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Mendelson JHP, Israel MA, Liotta LA, editor. *The molecular basis of cancer.* Philadelphia: WB Saunders, 1996; p 206-32.
- Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995; 177(3):275-83.
- Friedmann I. Epidermoid cholesteatoma and granuloma. *Ann Otol Rhin Laryngol.* 1959, 68:57-59.
- Gantz BF, Maynard J, Bumstead RM, Huang CC, Abramson M. Bone resorption in chronic otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1979, 88:639-700.
- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science.* 1997; 277:225–8.
- Glasscock ME, Dickins JFE, Wiet R. Cholesteatoma in children. *Laryngoscope* 1981, 91:1743-53.
- Goycoolea MV, Hueb MM, Muchow D, Paparella MM. The theory of trigger, the bridge and the transmigration in the pathogenesis of acquired cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 1999, 119(2):244-8.
- Hamzei M, Ventriglia G, Hagnia M, Antonopolous A, Bernal-Sprekelson M, Dazert S, Hildmann H, Sudhoff H. Osteoclast stimulating and differentiating factors in human cholesteatoma. *Laryngoscope* 2003; 113(3):436-42.

- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3):353-64.
- Hansen T, Unger RE, Gaumann A, Hundorf I, Maurer J, Kirkpatrick J, Kriegsmann J. Expression of matrix-degrading cysteine proteinase cathepsin k in cholesteatoma. *The USA and Canadian Academy of Pathology* 2001; 14(12):1226-31.
- Hassmann-Poznanska E, Skotnicka B, Dzieciol J. Markers of epidermal proliferation in middle ear cholesteatoma. *Otolaryngol Pol.* 2003; 57(4):505-11.
- Hemb L, Schweiger C, Matter R, Dornelles C, Smith M, Schmidt L, Costa SS. Papel da via de formação do colesteatoma na orelha contralateral em pacientes pediátricos do AOMC-HCPA. *Revista on-line do HCPA, www.hcpa.ufrgs.br*, 2003.
- Hildmann H, Sudhoff H. Cholesteatoma in children. *Int J Ped Otor.* 1999, 49(1):s81-3.
- Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, Veith GM, Jeffrey JJ, Gluck SL. Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem.* 1997; 272:22053-8.
- Huang CC, Yi ZX, Chao WY. Effects of granulation tissue conditioned medium on the in-vitro differentiation of keratinocytes. *Arch Otorhinolaryngol.* 1988; 245:325-9.
- Hueb MM. Colesteatoma adquirido: avanços experimentais na compreensão de sua patogênese. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1997.
- Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG Jr., Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von hippel-lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(20):10595-9.
- Iwanaga M, Yamamoto E. Collagenase activity in cholesteatoma. *othorhinolaryngology (basel)*, 1983, 45:166-75. In Quaranta A, Ressa L, Santangelo A. Otomastoid cholesteatoma in children: histopathological findings. *Int J Ped Otorhinolaryngol.* 1986; 12(2):121-6.
- Jacob R, Welkoborsky HJ, Mann W. Epithelium-stroma interaction in cholesteatoma of the middle ear. *Laryngorhinootologie* 2001; 80(1):11-7.
- Jahnke V, Falk W. Clinical, pathological and therapeutic aspects of cholesteatoma in children. *Laryngol Rhinol Otol* 1976; 55(7):556-60.
- Jansen C. Cholesteatoma in children. *Clin Otolaryngol.* 1978, 3:249-352.
- Jasielski P, Mosiewicz A, Trojanowski T, Suchozebrska-Jesionek D, Stryjecka-Zimmer M. The role of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in invasion of tumours of neuroepithelial tissue. *Neurol Neurochir Pol.* 2006 sep-oct; 40(5):404-12.
- Jung J, Chole R. Bone resorption in chronic otitis media: the role of the osteoclast. *ORL* 2002, 64:95-107.
- Junh sk, Paparella MM. Pathogenesis of otitis media. *Ann Rhinol Otol Laryngol* 1976, 85(25):8-11.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 1985.
- Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves cd44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 2001; 153:893-904.
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:301-310
- Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006, 441:431-436

- Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, Brew K. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (adam-ts4) and aggrecanase 2 (adam-ts5). *J Biol Chem.* 2001; 276:12501–4.
- Kemppainen HO, Puhakka HJ, Laippala PJ, Sipila MM, Manninen MP, Karma PH. Epidemiology and aetiology of middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 1999; 119: 568–72.
- Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *carcinogenesis* 2000; 21(3):505-15.
- Kim CS, Chung JW. Morphologic and biologic changes of experimentally induced cholesteatoma in mongolian gerbils with anticytokeratin and lectin study. *Am J Otol.* 1999, 20(1):13-8.
- Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloprotease mt1-mmp in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol.* 2000; 148:615–24.
- Kraiem Z, Korem S. Matrix metalloproteinases and the thyroid. *Thyroid.* 2000; 10:1061-9.
- Kramer RZ, Bella J, Brodsky B, Berman HM. The crystal and molecular structure of a collagen-like peptide with a biologically relevant sequence. *J Mol Biol.* 2001; 311:131-47.
- Krekoski CA, Neubauer D, Graham JB, Muir D. Metalloproteinase-dependent predegeneration *in vitro* enhances axonal regeneration within acellular peripheral nerve grafts. *J Neurosci.* 2002; 22:10408–5.
- Kuczkowski J, Bakowska A, Mikaszewski B. Immunomorphological evaluation of cholesteatoma. *Otolaryngol Pol.* 2004; 58(2):289-95.
- Kuijpers W, Vernix PP, Peters TA, Ramaekers FC. Squamous metaplasia of the middle ear epithelium. *Acta Otolaryngol* 1996; 116:293-8.
- Kurihara A, Toshima M, Yuasa R, Takasaka T. Bone destruction mechanisms in chronic otitis media with cholesteatoma: specific production by cholesteatoma tissue in culture of bone-resorbing activity attributable to interleukin-1 alpha. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991; 100(12):989-98.
- Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, Leon H, Sariahmetoglu M, Sung M. Matrix metalloproteinase-2 (mmp-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (adp-ribose) polymerase (parp) *in vitro*. *Faseb J* 2004; 18:690–2.
- Laeq S, Faust R. Modeling the cholesteatoma microenvironment: coculture of hacat keratinocytes with ws1 fibroblasts induces mmp-2 activation, invasive phenotype and proteolysis of the extracellular matrix. *Laryngoscope*, 2007; 117:313-8.
- Lepercque S, Broekaert D, van Cowwenberge P. Cytokeratin expression patterns in the human tympanic membrane and external ear canal. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1993, 250:78-81.
- Ley K. Pathways and bottlenecks in the web of inflammatory adhesion molecules and chemoattractants. *Immunol Res* 2001, 24:87–95.
- Lim DJ, Saunders WE. Acquired cholesteatoma: light and electron microscopic observations. *Ann Otol.* 1972, 81:2-12.

- Limb GA, Matter K, Murphy G, Cambrey AD, Bishop PN, Morris GE. Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin a/c degradation during apoptosis. *Am J Pathol* 2005; 166:1555–63.
- Lino Y, Imamura Y, Kojima C, Takegoshi S, Suzuki JI. Risk factors for recurrent and residual cholesteatoma in children determined by second stage operation. *Int J Ped Otorhinolaryngol.* 1998, 46(1-2):57-65.
- Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, Knäuper V, Murphy G, López-Otín C. Identification and characterization of human mt5-mmp, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res.* 1999; 59:2570–6.
- Luo D, Mari B, Stoll I, Anglard P. Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 2002; 277:25527–36.
- Mafee M. MRI and CT in the evaluation of acquired and congenital cholesteatomas of temporal bone. *J Otolaryngol.* 1993; 22:239-48. In Tessa JRG, Vivente AO, Abreu CEC, Bendassat SF, Antunes ML, Barros FA. Colesteatoma causando paralisia facial. *Rev Bras ORL* 2003, 69(5):657–62.
- Marcato P, Giuritti P, Pozzo T, Vitiello R, Valente G, Giordano C, Sartoris A. Chronic cholesteatomatous otitis media: the histopathological and clinical aspects. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 1991; 11(5):465-70.
- Marenda BA, Audfemorte TB. Localization of cytokines in cholesteatoma tissue. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995; 112 (3):359-68.
- Matrisian LM Quick guide. Matrix metalloproteinases. *Curr Biol.* 2000; 10(19):R692.
- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet* 1990; 6:121-5.
- Matter R, Schweiger C, Hemb L, Smith M, Schmidt L, Dornelles C, Costa SS. Estudo da orelha contralateral na otite média crônica, em pacientes pediátricos. *Revista on-line do HCPA, www.hcpa.ufrgs.br,* 2003.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999, 399:271–275
- Mayot D, Bénè MC, Faure GC, Wayoff M, Perrin C. Immunohistologic analysis of the cholesteatoma matrix in children. *Int J Ped Otorhinolaryngol.* 1991, 22(2):115-24.
- McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 2000; 6:149-56.
- McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:534–40.
- Medina C, Radomski MW. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Sep;318(3):933-8.
- Meurer L. Densidade microvascular e expressão imunoistoquímica de p21: associação com sobrevida em pacientes submetidos à cirurgia por carcinoma epidermóide de esôfago [tese]. Porto Alegre, UFRGS, 2003.
- Meyerhoff WL, Wright CG, Gerken GM. Effects of middle ear ventilation on cholesteatoma development in experimental animals. *Acta Otolaryngol.* 1990; 110(3-4):279-85.

- Michaels L. Biology of cholesteatoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 1989; 22(5):869-81.
- Milewski C. Role of perimatrix fibroblast in development of acquired middle ear cholesteatoma. A hypothesis. *HNO* 1998(a); 46(5):494-501.
- Milewski C, Fedorowski A, Stan AC, Walter GF. Basic fibroblast growth factor (b-fgf) in the perimatrix of cholesteatoma. *HNO*, 1998(b), 46(9):804-8.
- Minotti AM, Kountakis SE, Leighton WR, Cabral FR. Effects of extracellular calcium on cholesteatoma migration and adhesion *in vitro*. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996, 115(5):458-63.
- Mitrovic M, Haralampiev K, Dcinic M. Problems in diagnosis and treatment of cholesteatoma in children. *Int J Ped. Otor.* 1991, 21(2):149-53.
- Moll R, Franke VW, Schiller DL. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982, 31:11-24.
- Morales DSR, Penido NO, da Silva IDCG, Stávale JN, Guilherme A, Fukuda Y. Matriz metaloproteinase 2: um importante marcador genético para colesteatomas. *Rev Bras ORL* 2007, 73(1):55-61.
- Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol* 2005, 175: 6257–63.
- Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bfgf-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol.* 1993; 157:351–8.
- Naldini A, Carraro F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005, 4:3–8.
- Nagase H, Enghild JJ, Suzuki K, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl) mercuric acetate. *Biochemistry.* 1990; 29:5783–9.
- Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.* 1997; 378:151–60.
- Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274:21491–4.
- Nagase H. Substrate specificity of mmps. in: clendenninn nj, appelt k, eds. matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2003:39–66.
- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and timp. *Card Res.* 2006, 66:562-73.
- Naim R, Sadick H, Schafer C, Hormann K. External auditory canal cholesteatoma: analysis of the integrity of the tissue structure. *Int J Mol Med.* 2004; 14(4):601-4.
- Naim R, Sadick H, Bayerl C, Bran G, Hormann K. Angiogenic factors in external auditory canal cholesteatoma fibroblast cell culture. *HNO* 2005; 53:952–6.
- Nair, S, Watts, S, Flood, L. Fibroblast growth factor receptor expression in aural polyps: predictor of cholesteatoma? *J Laryngol Otol.* 2004, 118(5):338-42.
- Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 960-70.
- Okuyama, K.K, Okuyama, S, Arnott, M, Takayanagi, M, Kakudo. Crystal structure of the collagen-like polypeptide (pro-pro-gly)₁₀. *J Mol Biol.* 1981, 152(2):427-43.

- Olszewska, E, Wagner, M, Bernal-Sprekelsen, M, Ebmeyer, J, Dazert, S, Hildmann, H, Sudhoff, H. Etiopathogenesis of cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2004, 261(1):6-24.
- Olszewska E, Chodynicky S, Chyczewski L. Role of angiogenesis in the pathogenesis of cholesteatoma in adults. *Otolaryngol Pol*. 2004b;58(3):559-63
- Paludetti G, Alamadori G, Ottaviani F, Rosignoli M, Rossodivita M, D'Alatri L. Ultrastructural aspects of cholesteatoma of the middle ear. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 1989; 9(2):169-80.
- Palva A, Karma P, Kärjä J. Cholesteatoma in children. *Arch Otolaryngol*. 1997; 103(2):74-77.
- Palva T, Northrop C, Ramsay H. Effect of amniotic fluid cellular content on attic aeration pathways. histologic observations on infants aged 2 to 4 months. *Am J Otol*. 2000; 21(1):62-70.
- Paparella MM, Hidaide F, Juhn SK, Kaneco J. Cellular events involved in middle ear fluid production. *Ann Rhinol Otol Laryngol*. 1970, 79(4):389-97.
- Pastor EMH, Giorgio RON. Osteoartrose: conceito e diagnóstico. *Lemos editorial* 2002, 1:1-12.
- Peek FA, Huisman MA, Berckmans RJ, Sturk A, van Loon J, Grote JJ. Lipopolysaccharide concentration and bone resorption in cholesteatoma. *Otol Neurotol*. 2003, 24(5):709-13.
- Pereira CSB. Análise de estudos da expressão das citoqueratinas no colesteatoma adquirido. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 1997.
- Pereira CSB, Almeida CIR, Vianna MR. Imunoexpressão da citoqueratina 16 e do antígeno nuclear ki-67 no colesteatoma adquirido da orelha média. *Rev Bras ORL* 2002, 68(4):453-60.
- Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol*. 1997; 137:1445-57.
- Piltcher O. um novo modelo experimental para investigação da otite média com efusão e sua aplicação no estudo das citocinas durante as diferentes fases dessa doença. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 2000.
- Plester D. Hereditary factors in chronic otitis with cholesteatoma. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 1980, 34(1):51-5. In: Morales DSR, Penido NO, da Silva IDCG, Stávale JN, Guilherme A, Fukuda Y. Matriz metaloproteinase 2: um importante marcador genético para colesteatomas. *Rev Bras ORL* 2007, 73(1):55-61.
- Potsic WP, Wetmore RF, March RR. Congenital cholesteatoma: 15 years experience at the childrens hospital of Philadelphia. In: Fifth International Conference on Cholesteatoma and Mastoid Surgery. CIC Edizioni Internazionali, Rome 1997; 422-31.
- Pownell PH, Wright CG, Robinson KS, Meyerhoff WL. The effect of cyclophosphamide on development of experimental cholesteatoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1994;120(10):1114-6.
- Prescott CAJ. Cholesteatoma in children – the experience at the red cross war memorial childrens hospital in South Africa 1988-1996. *Int J Ped Otorhinolaryngol*. 1999, 49(1):15-9.

- Quantin L, Fernández SC, Moretti J. Congenital cholesteatoma of external auditory canal. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2002; 62:175–9.
- Quaranta A, Ressa L, Santangelo A. Otomastoid cholesteatoma in children: histopathological findings. *Int J Ped Otorhinolaryngol.* 1986, 12(2):121-6.
- Ramsden JD. Angiogenesis in the thyroid gland. *J. Endocrinol* 2000, 166:475-80.
- Ratnesar P. Aeration: a factor in the sequels of chronic ear disease along the Labrador and northern Newfoundland coast, 1977. In Olszewska E, Wagner M, Bernal-Sprekelsen M, Ebmeyer J, Dazert S, Hildmann H, Sudhoff H. Etiopathogenesis of cholesteatoma. *Otology* 2004; 261(1):6-24.
- Rignér P, Renvall U, Tjellstrom A. Late results after cholesteatoma surgery in early childhood. *Int J Ped Otorhinolaryngol.* 1991; 22(2):213-8.
- Rouis M, Adamy C, Duverger N, Lesnik P, Horellou P, Moreau M, Emmanuel F, Caillaud JM, Laplaud PM, Dachet C, Chapman MJ. Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation.* 1999; 100:533–540.
- Sadé J, Berco E. Bone destruction in chronic otitis media. a histopathological study. *J Laryngol Otol.* 1974; 88(5):413-22.
- Sadé J, Fuchs C. Cholesteatoma: ossicular destruction in adults and children. *J Laryngol Otol.* 1994; 108(7):541-4.
- Sadé J, Halevy A. The aetiology of bone destruction in chronic otitis media. *J Laryngol Otol.* 1974; 88(2):139-43.
- Saleh HA, Mills RP. Classification and staging of cholesteatoma. *Clin Otolaryngol.* 1999; 24:355-9.
- Scheibe AB, Smith MM, Schmidt LP, Schmidt VB, Dornelles C, Carvalhal L, Kruse L, Costa SS. Estudo da orelha contralateral na otite média crônica: “efeito orloff”. *Rev Bras ORL* 2002; 68(2):245–9.
- Schilling V, Bujia J, Negri B, Schulz P, Kastenbauer E. Immunologically activated cells in aural cholesteatoma. *Am J Otolaryngol.* 1991 Sep-Oct; 12(5):249-53.
- Schmidt SH, Hellstrom S. Experimental cholesteatoma in the rat. *Acta Otolaryngol.* (Stockh), 1994, 114: 430-434.
- Schmidt V, Dornelles C, Weber R, Schimdt L, Dall’Igna D, Carvalhal L, Kruse L, Costa SS. Perda auditiva condutiva na otite média crônica com perfuração central ou marginal. *Pesquisa: Logos e Praxis. Unidade de Pesquisa do Instituto de Cardiologia* 2002; p. 220.
- Schonermark M, Mester B, Kempf HG, Blaser J, Tschesche H, Lenarz T. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in human cholesteatomas. *Acta Otolaryngol.* 1996 may; 116(3):451-6.
- Schorder NW, Heine H, Alexander C, Manukyan M, Eckert J, Hamann L. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. *J Immunol.* 2004; 173(4):2683-91.
- Schuknecht HF. Myringoplasty. *Clin Otolaryngol.* 1976; 1(1):53-65.
- Schuknecht HF. The pathology of the ear. Cambridge: Harvard University, 1974.

- Schweiger C, Hemb L, Matter R, Schmidt L, Smith M, Dornelles C, Costa SS. Perda auditiva sensorioneural em crianças com otite média crônica. Revista on-line do HCPA. www.hcpa.ufrgs.br, 2003.
- Sculerati N, Bluestone C. Pathogenesis of cholesteatoma. *Otol Clin North Am.* 1989; 22(5):859-68.
- Semenza GL, Shimoda LA, Prabhakar NR. Regulation of gene expression by HIF-1. *Novartis Found Symp* 2006, 272:2-8.
- Sheehy JL. Management of cholesteatoma in children. *Adv Oto-Rinolaryng.* 1978, 23:58-64.
- Sheehy JL. Management of cholesteatoma in children. *Am J Otol.* 1985; 6:170-2.
- Shinoda H, Huang CC. Expressions of c-jun and p53 proteins in human middle ear cholesteatoma: relationship to keratinocyte proliferation, differentiation and programmed cell death. *Laryngoscope* 1995; 105(11):1232-7.
- Sien KCY. Cholesteatoma in children. *Pediatric Clin North Am.* 1996; 43(6):1245-52.
- Sobol SM. Intramembranous and mesotympanic cholesteatomas associated with an intact tympanic membrane in children. *Ann Otol.* 1980, 98:312-17. In Cruz OL, Costa SS. *Otologia clínica e cirúrgica.* Ed Revinter, 1999.
- Sprekelsen BM, Ebmeyer J, Anonopoulos A, Sudhoff H. Alteraciones de la membrana basal en el colesteatoma de oído medio. *Acta Otor. Esp.* 2001; 52:330-5.
- Stankovic M. Results of cholesteatoma surgery: the influence of age. *Int Congress Series,* 2003; 1240:133-7.
- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17:463-516.
- Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999; 103:1237-41.
- Stryer, L. *Bioquímica.* 4ª Ed. Rio De Janeiro. Editora Guanabara, 1996.
- Sudhoff H, Borkowski G, Bujia J, Hildmann H. Immunhistochemische untersuchungen von mittelohrschleimhautresten im cholesteatom. *HNO* 1997; 45(8):630-5.
- Sudhoff H, Bujia J, Borkowski G, Koc C, Holly A, Hildmann H, Fisseler-Eckhoff A. Basement membrane in middle ear cholesteatoma. imunohistochemical and ultrastructural observations. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1996; 105: 804-10.
- Sudhoff H, Dazert S, Gonzales AM, Borkowski G, Park SY, Baird A, Hildmann H, Ryan AF. Angiogenesis and angiogenic growth factors in middle ear cholesteatoma. *Am J Otol.* 2000; 21:793-8.
- Sudhoff H, Liebehenz Y, Aschenbrenner J, Euteneurer S, Ebmeyer J, Bernal-Sprekelsen M, Stark T, Dazert S. Expression of osteoclast stimulating and differentiating factors in a murine model of localized inflammatory bone resorption. *Laryngorhinootologie* 2004; 83(1):14-9.
- Sudhoff H, Tos M. Pathogenesis of attic cholesteatoma: clinical and imunohistochemical support for combination of retraction theory and proliferation theory. *Am J Otol.* 2000; 21:786-92.
- Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry.* 1990; 29:10261-70.

Swartz JD. Cholesteatomas of the middle ear. Diagnosis, etiology and complications. *Radiol Clin North Am.* 1984; 22:15-34.

Tanaka Y, Shiwa M, Kojima H, Miyazaki H, Kamide Y, Moriyama H. A study on epidermal proliferation ability in cholesteatoma. *Am Laryngol Rhinol Otol Society* 1998; 4: 537-42.

Thompson J. Bone resorption in chronic otitis media. In: McCabe BF, Sade JE, Abramson M. Eds. *Cholesteatoma: First International Conference.* Aescupulus Publishing Co.: Birmingham Ala 1977; p 136.

Tomita S. Aspectos moleculares do colesteatoma – imunoexpressão das proteínas controladas do ciclo celular: p53, bax e bcl-2. SP Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina, 2000.

Toner JG, Smyth GDL. Surgical treatment of cholesteatoma: a comparison of three techniques. *Am J Otol.* 1990; 11(4):247-9.

Tos M. Recurrence and the condition of the cavity after surgery for cholesteatoma using various techniques. Kugler and Ghedini, 1989. In Olszewska E, Wagner M, Bernal-Sprekelsen M, Ebmeyer J, Dazert S, Hildmann H, Sudhoff H. Etiopathogenesis of cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004; 261(1):6-24.

Tos M. Treatment of cholesteatoma in children: a long-term study of results. *J. Otol.,* 1983, 4: 189-197.

Valvassori GE. Benign tumors of the temporal bone. *Radiol Clin North Am.* 1974; 12:533-42. In Cruz OL, Costa SS. *Otologia Clínica e Cirúrgica.* Ed. Revinter, 1999.

Varghese S. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in bone: an overview of regulation and functions. *Front Biosci.* 2006 Sep 1; 11:2949-66.

Vartiainen E. Fate of patients with bilateral cholesteatoma. *Am J Otolaryngol.* 1993; 14(1):49-52.

Vassalli L, Harris DM, Gradini R, Applebaum EL. Propylene glycol-induced cholesteatoma in chinchilla middle ears. *Am J Otolaryngol.* 1988; 9(4):180-8.

Velasco G, Cal S, Merlos-Suárez A, Ferrando Aa, Alvarez S, Nakano A, Arribas J, López-Otín C. Human mt6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res.* 2000; 60:877– 82.

Vennix PP, Kuijpers W, Peters TA, Tonnaer EL, Ramaekers FC. Keratinocyte differentiation in acquired cholesteatoma and perforated tympanic membranes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996; 122:825-32.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32a(14):2474-84.

Verstappen J, von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (timp)s: their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res.* 2006 Dec;85(12):1074-84.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res.* 2003, May 2: 827-39.

Volpert Ov, Stellmach V, Bouck N. The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36(2):119-26.

- von Bulow C, Hayen W, Hartmann A, Mueller-Klieser W, Allolio B, Nehls V. Endothelial capillaries chemotactically attract tumour cells. *J Pathol* 2001; 193(3):367-76.
- Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 *in vivo*. *J Biol Chem*. 2000;275:26411-5.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324(1):1-8.
- White SJ, Wright CG, Robinson KS, Meyerhoff WL. Effect of topical hyaluronic acid on experimental cholesteatoma. *Am J Otolaryngol*. 1995; 16:312-8.
- Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase a and initiates autoproteolytic activation: regulation by timp-2 and timp-3. *J Biol Chem*. 1996; 271:17119-23.
- Wilmoth JG, Schultz GS, Antonelli PJ. Tympanic membrane metalloproteinase inflammatory response. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003; 129(6):647-54.
- Wolfman DE, Chole RA. Experimental retraction pocket cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1986; 95:639-44.
- Wright CG, Meyerhoff WL, Burns DK. Middle ear cholesteatoma: an animal model. *Am J Otolaryngol*. 1985; 6:327-41.
- Wysocki A, Schultz G, Parks WC. Proteinases e feridas: vantagens e desvantagens. *Revista Pelle Sana Soc Bras de Enfermagem em Dermatologia* 1998; 1(1):27-8.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000, 407:242-8.
- Yang X, Li X, Ma M, Zhang L, Zhang Q, Wang J, Wang B. Expression of transforming growth factor-beta 1 matrix metalloproteinase-1 and its inhibitor in human middle ear cholesteatoma. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2002 Apr; 37(2):121-3
- Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*. 2003; 36:128-37.
- Yu Wh, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF Jr. TIMP-3 Binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 2000; 275:31226-32.
- Zhu W, Xie Y, Wang P. Expression of matrix metalloproteinase 2, 9 in cholesteatoma and middle ear cancer. *Er Bi Yan Hou Ke Xue Hui Beijing* 2001; 36(2):119-22.
- Zucker S, Cao J, Chen WT. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene*. 2000; 19:6642-50.

PARTE III – ANEXOS

HOSPITAL HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
SERVIÇO DE OTORRINOLARINGOLOGIA
PROTOCOLO DE PRIMEIRA CONSULTA

IDENTIFICAÇÃO

Fita: _____

Nº Seleção: _____

Nº da

Nome: _____

Telefone para contato: _____

Prontuário: _____

1. Idade: _____ 2. Sexo: 1. F 2. M 3. Raça: 1. branca 2. negra 3. mulata

4. Início dos sintomas: Desde _____ anos

QUEIXA PRINCIPAL

5. Hipoacusia OD 1. SIM 2. NÃO 6. Hipoacusia OE 1. SIM 2. NÃO
7. Otorréia OD 1. SIM 2. NÃO 8. Otorréia OE 1. SIM 2. NÃO
9. Otaglia OD 1. SIM 2. NÃO 10. Otaglia OE 1. SIM 2. NÃO

11. Outros:

ANAMNESE DIRIGIDA

	Ouvido direito	Ouvido esquerdo
Otorréia	12. 1. sim 2. não	13. 1. sim 2. não
Otaglia	14. 1. sim 2. não	15. 1. sim 2. não
Intensidade	16. 1. leve 2. moder 3. Intens	17. 1. leve 2. moder 3. intens
Perda Auditiva % subjetiva	18. 1. sim 2. não 20. 1) 0-25 2) 25-40 3) 40-60 4) 60-80 5) 80-100	19. 1. sim 2. não 21. 1) 0-25 2) 25-40 3) 40-60 4) 60-80 5) 80-100
Acúfenos	22. 1. sim 2. não	23. 1. sim 2. não
Intensidade	24. 1. leve 2. moder 3. Intens	25. 1. leve 2. moder 3. intens
Sangramento	26. 1. sim 2. não	27. 1. sim 2. não
28. Cefaléia	1. sim 2. não	
29. Vertigem	1. sim 2. não	

REVISÃO DE SISTEMAS

30. HAS 1. sim 2. não 31. DM 1. sim 2. não
32. CARDIOPATIA 1. sim 2. não 33. PNEUMOPATIA 1. sim 2. não
34. FUMO 1. sim 2. não 35. Se sim: 1. ativo 2. passivo
36. ALCOOL 1. sim 2. não

HMP

37. Alergias. 1. sim 2. não 38. Cirurgia otológica: 1. sim 2. não
39. Outras cirurgias por complicação de otite: 1. sim 2. não

HISTÓRIA FAMILIAR

40. Surdez 1. sim 2. não 41. Infecção otológica: 1. sim 2. não

EXAME FÍSICO

I. CAVIDADE ORAL E NASO FARINGE
42. Amígdalas hipertróficas 1. sim 2. não
43. MFC pálate 1. sim 2. não
44. Pálato Ogival 1. sim 2. não

II. RINOSCOPIA ANTERIOR

45. Cornetos Hipertróficos 1. sim 2. não
46. Desvio do Septo 1. sim 2. não

ACUMETRIA

47. VIA AÉREA
1. VAD =VAE 2. VAD> VAE 3. VAE>VAD

48. WEBER

1. Indiferente 2. lateraliza D 3. Lateraliza E

49. Rinne OD

1. + 2. - 3. nada

51. Rinne OE

1. + 2. - 3. nada

DIAGNÓSTICO/ PATOGÊNESE ORELHA DIREITA

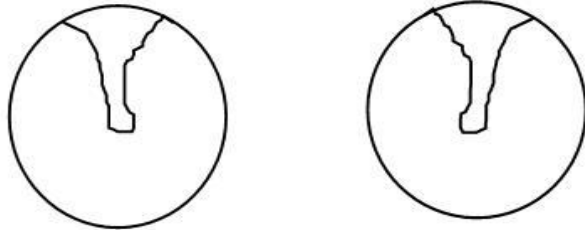
52. Colesteatoma via eotimpânica anterior 1. sim 2. não
53. Colesteatoma via epitimpânica posterior 1. sim 2. não
54. Colesteatoma mesotimpânica posterior 1. sim 2. não
55. Perfuração Timpânica central INSIDE OUT 1. sim 2. não
56. Perfuração Timpânica central OUTSIDE IN 1. sim 2. não
57. Perfuração timpânica marginal INSIDE OUT 1. sim 2. não
58. Perfuração Timpânica central OUTSIDE IN 1. sim 2. não

DIAGNÓSTICO/ PATOGÊNESE ORELHA ESQUERDA

- 59. Colesteatoma via epítimpânica anterior 1. sim 2. não
- 60. Colesteatoma via epítimpânica posterior 1. sim 2. não
- 61. Colesteatoma mesotimpânica posterior 1. sim 2. não
- 62. Perfuração Timpânica central INSIDE OUT 1. sim 2. não
- 63. Perfuração Timpânica central OUTSIDE IN 1. sim 2. não
- 64. Perfuração timpânica marginal INSIDE OUT 1. sim 2. não
- 65. Perfuração Timpânica central OUTSIDE IN 1. sim 2. não

CONDUTA

- 66. Cirúrgica – timpanoplastia 1. OD 2. OE 3. BILATERAL
- 67. Cirúrgica – timpanomastoidectomia 1. OD 2. OE 3. BILATERAL
- 68. Cirúrgica - timpanotomia exploradora 1. OD 2. OE 3. BILATERAL
- 69. Tubo de ventilação 1. OD 2. OE 3. BILATERAL
- 70. Expectante 1. OD 2. OE 3. BILATERAL



LIMIARES	250 HZ	500 HZ	1 KHZ	2 KHZ	3 KHz	4 KHZ	6 KHZ	8 KHZ
VA OD	71	72	73	74	75	76	77	78
VO OD	79	80	81	82	83	84	85	86
VA OE	87	88	89	90	91	92	93	94
VO OE	95	96	97	98	99	100	101	102

- 103. Imitância: 1 () sim 2 () não
- 104. Curvas: OD 1. Curva: A 2. Curva B 3. Curva C 4. Curva As 5. Curva Ad OE 1. Curva: A 2. Curva B 3. Curva C 4. Curva As 5. Curva Ad
- 105. Reflexos: 1. () presentes 2. () ausentes

OTOSCOPIA DIRETA

DIREITO

- Orelha Externa**
- PIN 106. 1. normal 2. MFC leve 3. MFC grave 4. Ausência
- Implantação CAE 108. 1. normal 2. baixa 110. 1. normal 2. filiforme 3. fundo de saco 4. ausente
- Orelha Média**
- Membr Timpânica**
- Integridade 112. 1. sim 2. não
- Cor 114. 1. sim 2. não
- Transparência 116. 1. sim 2. não
- Mobilidade 118. 1. sim 2. não
- Líquido 120. Abaulada 1. sim 2. Não 122. 1. difusa 2. localizada 124. 1. AS 2. AI 3. PS 4. PI 126. Retraída 1. sim 2. não 128. Retração 1. leve 2. moder 3. import. 130. Localização: 1. difusa 2. localizada 132. 1. AS 2. AI 3. PS 4. PI 5. atical
- Posição 134. 1. sim 2. não 136. 1. central 2. marginal 138. 1. AS 2. AI 3. PS 4. PI 5. total 6. atical
- Perturação 140. 1. primário 2. Secundário 3. Congênito
- Colesteatoma
- Provável via de formação 142. 1. epítimpânica anterior 2. epítimpânica posterior 3. mesotimpânica posterior
- Complicações outras 144. 1. paresia 2. Paralisia 3. abscesso 4. Outras
- Timpanoesclerose 146. 1. sim 2. não 148. Membrana Timpânica 1. S 2. N 150. Orelha Média 1. S 2. N 152. Ossículos 1. S 2. N
- Granuloma de Colesterol 154. 1. sim 2. não
- Estado da Mucosa 156. 1. normal 2. epitelizada 3. hiperplásica 4. infectada

ESQUERDO

- 107. 1. normal 2. MFC leve 3. MFC grave 4. ausência
- 109. 1. normal 2. baixa
- 111. 1. normal 2. filiforme 3. fundo de saco 4. ausente
- 113. 1. sim 2. não
- 115. 1. sim 2. não
- 117. 1. sim 2. não
- 119. 1. sim 2. não
- 121. Abaulada 1. sim 2. não
- 123. 1. difusa 2. localizada
- 125. 1. AS 2. AI 3. PS 4. PI
- 127. Retraída 1. sim 2. não
- 129. Retração 1. leve 2. moder 3. import.
- 131. Localização: 1. difusa 2. Localizada
- 133. 1. AS 2. AI 3. PS 4. PI 5. atical
- 135. 1. sim 2. não
- 137. 1. central 2. marginal
- 139. 1. AS 2. AI 3. PS 4. PI 5. total 6. atical
- 141. 1. primário 2. Secundário 3. congênito
- 143. 1. epítimpânica anterior 2. epítimpânica posterior 3. mesotimpânica posterior
- 145. 1. paresia 2. Paralisia 3. abscesso 4.
- 147. 1. sim 2. não
- 149. Membrana Timpânica 1. S 2. N
- 151. Orelha Média 1. S 2. N
- 153. Ossículos 1. S 2. N
- 155. 1. sim 2. não
- 157. 1. normal 2. epitelizada 3. hiperplásica 4. infectada

Termo de Consentimento Informado

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Prezado Paciente:

O Ambulatório de Otite Média Crônica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (AOMC-HCPA) destina-se ao estudo da Otite Média Crônica. Na rotina deste ambulatório são realizados um questionário padrão, exame otorrinolaringológico, filmagem das orelhas e exames de avaliação da audição. Todas estas avaliações seguem a normalidade de atendimento do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

No caso da Otite Média Colesteatomatosa (OMCC) existem diferenças na evolução e agressividade desta doença, quando comparadas em adultos e crianças. Com o intuito de estudar esta diferença, estamos testando, comparativamente, colesteatomas coletados de 20 crianças e 20 adultos.

Convidamos o senhor(a) para participar do estudo da Otite Média Crônica Colesteatomatosa. A participação deste estudo não interfere na rotina de avaliação e acompanhamento.

Durante o procedimento cirúrgico, único tratamento conhecido para esta patologia, será coletada uma amostra da pele da orelha operada, evento que não faz parte da rotina assistencial, mas que não acarretará nenhum desconforto ou risco adicional e, também, não interferirá em seu tratamento.

Os dados coletados nas avaliações podem ser usados de forma anônima em trabalhos científicos.

O paciente, ou responsável, tem a liberdade de retirar seu consentimento em participar da pesquisa a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência recebida.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo, voluntariamente, em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
Carimbo ou nome Legível

Pesquisadores responsáveis: Sady Selaimen da Costa e Cristina Dornelles

Endereço: Av. Ramiro Barcelos, 2350, Serviço de Otorrinolaringologia – HCPA – Zona 19
Telefone para contato (em horário comercial): 051 – 3316-8249 ou 33168164

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
23 / 10 / 02

Carta de Aprovação do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 04-416

Pesquisadores:

SADY SELAIMEN DA COSTA

LUISE MEURER

CRISTINA DE CARVALHO DORNELLES

Título: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA PERIMATRIZ DE COLESTEATOMAS ADQUIRIDOS

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Porto Alegre, 02 de dezembro de 2004.


Prof. Themis Reverbet da Silveira
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

Descrição demográfica da amostra

Número	Iniciais	Idade	Gênero
1	F.P.R.S.	15	Masculino
2	C.L.	14	Feminino
4	M.R.C.	5	Masculino
5	O.B.F.	53	Feminino
6	L.V.	16	Masculino
7	N.L.R.	36	Feminino
8	R.A.R.	31	Feminino
9	S.W.	18	Masculino
10d	J.C.S.D.	35	Feminino
10e	J.C.S.D.	35	Feminino
11	J.F.	11	Masculino
13	D.S.	27	Feminino
15	A.B.T.	18	Feminino
18	C.O.G.	21	Feminino
19	B.L.S.	12	Feminino
20	G.B.	12	Feminino
21	P.R.S.	40	Feminino
22	A.K.O.	10	Masculino
24	E.M.S.	25	Masculino
25	F.H.P.	37	Masculino
26d	V.S.M.	9	Feminino
26e	V.S.M.	9	Feminino
27	C.S.	40	Feminino
28	C.R.	37	Feminino
29	D.K.	18	Feminino
31	E.K.	53	Feminino
32	A.K.O.	10	Feminino
33	T.R.X.	23	Feminino
36	V.M.M.	37	Masculino
37	E.A.N.	10	Feminino

Número	Iniciais	Idade	Gênero
38	D.L.R.	9	Masculino
39	R.M.	13	Masculino
42	A.C.	22	Masculino
43	L.M.S.S.	22	Feminino
44	M.R.O	18	Masculino
45	M.B.	39	Masculino
47	F.M.A.P.	20	Feminino
48	A.R.L.	12	Masculino
50	S.W.	21	Feminino
52	B.M.D.	8	Feminino
53	J.C.S.	12	Feminino
55	S.S.	7	Masculino
57	E.Z.S.	17	Masculino
63	M.W.	25	Masculino
65	R.S.A.	25	Feminino
68	J.P.W.	35	Masculino
69	M.X.F.	43	Feminino
70	D.S.S.	11	Masculino
71	G.V.I.	17	Feminino
72	M.D.A.	9	Feminino
73	M.M.S.	51	Feminino
74	J.L.	78	Masculino
75	D.R.S.	14	Masculino
77	F.J.R.	13	Masculino
79	C.C.O.	20	Masculino
81	P.J.S.M.	16	Masculino
82	J.C.R.	35	Masculino
83	M.C.	37	Masculino
84	E.S.J.J.	31	Masculino
85	A.O.	15	Masculino

Número	Iniciais	Idade	Gênero
86	L.B.M.	11	Masculino
89	B.S.	11	Feminino
90	A.R.	59	Masculino
91	P.H.S.	66	Feminino
92	N.D.	44	Masculino
94	N.D.	69	Feminino
97	M.R.	10	Masculino
98	G.M.	38	Masculino
99	M.S.	24	Feminino
101	R.F.	14	Feminino
103	M.M.S.M	67	Masculino
104	L.F.G.	24	Masculino
106	J.P.T.	29	Feminino
107	N.C.O.S.	38	Feminino
108	D.G.	38	Masculino
110	R.A.D.	38	Masculino
112	C.M.V.	11	Feminino
115	M.L.T.	70	Feminino
116	L.E.	58	Masculino
119	S.O.L.	11	Feminino
120	R.D.	6	Masculino
121	J.F.	14	Feminino
127	I.S.S.	40	Feminino
128	W.J.S.J.	8	Feminino
131	V.L.B.	48	Feminino
140	W.G.L.	14	Masculino
142	J.C.S.	14	Masculino
143	C.B.	42	Masculino
146	L.R.S.P	18	Masculino
147	P.J.S.	11	Feminino

Número	Iniciais	Idade	Gênero
150	W.S.F.	30	Masculino
151	P.H.S.	33	Masculino
153	F.R.H.	10	Feminino
153	F.R.H.	10	Feminino
160	T.R.S.	7	Masculino
161	T.M.S.	3	Masculino
162	T.M.S.	3	Masculino
164	R.R.F.	69	Feminino
165	B.L.S.	28	Masculino
166	D.S.S.	13	Masculino
167	E.A.D.N.	12	Masculino
168	J.B.G.	29	Masculino
171	D.L.V.	11	Masculino
172	A.S.C.	11	Masculino
175	J.B.	13	Feminino
175	J.B.	13	Feminino
176	G.B.	14	Masculino
179	A.K.	18	Masculino
183	D.B.B.	14	Feminino
184	T.M.A.	8	Feminino
185	R.A.R.	12	Masculino
186	T.M.P	45	Feminino
187	M.B.	40	Feminino
188	V.P.G	38	Feminino
193	A.T.	45	Masculino
194	R.S.S.	23	Masculino
197	F.S.	22	Feminino
198	M.M.L	23	Masculino
199	A.T.	7	Masculino
200	M.N.A.	35	Feminino

Anexo 5

Comparison of acquired cholesteatomas in adult and pediatric patients using MMP2 and MMP9 markers for immunohistochemistry analysis

Cristina Dornelles: MS in Health Sciences – Pediatrics; Doctoral Candidate in Health Sciences – Pediatrics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Biologist, Brazilian Center for Otitis Media

Luíse Meurer: MD, PhD in Gastroenterology – Adjunct Professor, Pathology Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sady Selaimen da Costa: MD, PhD in Surgery – Associate Professor, Department of Ophthalmology and Ear, Nose and Throat, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Letícia Petersen Schmidt Rosito: MD, MS in Surgery, ENT Department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Sabrina Lima Alves: Medical student – Universidade Federal do Rio Grande do Sul School of Medicine

Andréia Argenta: Medical student – Universidade Federal do Rio Grande do Sul School of Medicine. Research Assistant, Brazilian Center for Otitis Media

Andrei Roberto da Silva: Resident ENT Physician, Universidade de São Paulo

Centro de Otite Média do Brasil – ComBr

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria

Serviço de Otorrinolaringologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Serviço de Patologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA

Send correspondence to Cristina Dornelles: Rua Cangussu, 1343 - Porto Alegre - RS – 90830-010 - (55-51) 84136773, cristinadornelles@yahoo.com.br

ABSTRACT:

The quantification of angiogenesis and metalloproteinases may be useful in cholesteatoma behavior assessment as markers of its aggressiveness. Objective: Compare markers CD31, MMP2 and MMP9 in pediatric and adult patients. Method: Cross-sectional study. Pediatric (18 years old or below) and adult groups (19 years old or above). Sample: 120 cholesteatomas, fixed in 10% formol, prepared on five blades of each sample through habitual histological techniques, observing: number of blood vessels (CD 31), marking with MMP2 and MMP9, number of matrix cells and thickness at perimatrix cell. Data were analyzed through SPSS using Spearman and Mann-Whitney coefficients. Results: Cholesteatomas equally distributed: 60 in pediatric patients (11.77±3.57 years); 60 in adult patients (38.29±14.51 years). Pediatric CD31: 7 (4-11), adult CD31: 4 (0-10) (P=0.044). Pediatric cytoplasmatic MMP2: 1 (0-3), adult cytoplasmatic MMP2: 0 (0-1) (P=0.006). Pediatric nuclear MMP2: 0 (0-1), adult nuclear MMP2: 0 (0-1) (P=0.056). Pediatric MMP9: 2 (0-4), adult MMP9: 0 (0-4) (P=0.049), when correlating the number of blood vessels and metalloproteinases with perimatrix thickness. Conclusions: Pediatric cholesteatomas present a more exacerbated inflammatory degree, produce more metalloproteinases, factors that, when combined, could characterize pediatric cholesteatomas as more aggressive than adult cholesteatomas.

KEY WORDS:

Perimatrix; Inflammation; Cholesteatoma; Angiogenesis; Collagenases

Introduction

Cholesteatomas were defined by Schuknecht¹ as the accumulation of scaled keratin inside the middle ear or any pneumatized area in the temporal bone deriving from a keratinized squamous epithelium. The annual incidence of cholesteatoma was found to be about 3 per 100,000 in children and 9.2 per 100,000 in adult. There is male predominance, approximately 1.4 times more high in men than in women^{2,3,4}.

Acquired cholesteatoma presented three histological components: matrix, perimatrix and cystic content⁵ (Figure 1). The matrix is a keratinized stratified squamous epithelium, with four layers that are identical to the. The perimatrix is a loose connective tissue, containing collagen fibers, fibrocytes and inflammatory cells. And the cystic content, by his time, is constituted for keratin lamellae and epithelium remands⁵.

Controversies exist as to whether cholesteatomas behave differently in children than in adults. Of a side, Sheehy⁶, Tos⁷ and Edelstein⁸ believe that pediatric cholesteatomas are less expansive, leading to a lower rate of complications. On the other hand, Glasscock⁹, Ruah¹⁰, Bujia¹¹, Palva¹² and Sudhoff¹³ hold that cholesteatomas originating in childhood are more aggressive and have more extensive growth patterns. Smythe¹⁴ consider pediatric cholesteatomas to be so different from adult cholesteatomas that they should be considered different diseases.

In this sense, Quaranta *et al.*¹⁵ observed that the perimatrix of pediatric cholesteatomas is richer in mononuclear inflammatory elements than that of adults. Based on this finding, they suggest that the characteristics of the perimatrix exert an important role in the pathogenesis of cholesteatomas, which could explain differences in the behavior of pediatric and adult cholesteatomas¹⁵.

Histological studies conducted by Dornelles et al.^{16,17,18} identified an inverse correlation between the cholesteatoma perimatrix thickness and the patient's age on the surgery date, as well as a direct correlation between the thickness and the histological degree of the inflammation at the perimatrix. These findings suggest that the perimatrix is thicker and has a more exacerbated inflammatory process in pediatric cholesteatomas. It is known that the cholesteatoma growth requires angiogenesis in the perimatrix conjunctive tissue¹⁹. In these studies^{16,17,18}, the inflammatory activity degree of the perimatrix was calculated through semi-quantitative measurements²⁰. A more precise measurement of the inflammatory activity is the angiogenesis quantification, which can be performed immunohistochemically by counting the blood vessels in the perimatrix, through immunohistochemistry with marker CD 31^{21,22}.

The exacerbated inflammatory process in cholesteatoma perimatrix adds more complexity to the chronic otitis media with cholesteatoma (COMC), with the bone erosion power, a characteristic that is almost universal of the COMC, one of the parameters employed to assess its aggressiveness. Bernal-Sprekelsen et al.²³ suggested that metalloproteinases (MMP) could explain part of the invasive and destructive activities (destruction of ossicles and other parts of the temporal bone) of the ear cholesteatoma. MMPs are related to several aspects of tissue growth and invasion and the stimulation of angiogenesis.

The quantification of angiogenesis and metalloproteinases as markers of aggressiveness may be useful in cholesteatoma behavior assessment. Thus, the purpose of this study is to analyze immunohistochemically both matrix and perimatrix of acquired cholesteatomas in children and adults, with markers CD31, MMP2 and MMP9, and

correlate such findings with their histological components and the patient's age on the surgery date.

Method

This study was a comparative and contemporaneous cross-sectional analysis, approved by the institution in 2003. All patients signed the Consent Term for the anonymous utilization of data in scientific publications.

Patients were include according to the following criteria: 1) diagnosis of chronic otitis media with cholesteatoma; and 2) presence of matrix (keratinized stratified squamous epithelium) and perimatrix (loose connective tissue) in the cholesteatoma sample collected (In Figure 1 is a representative cholesteatoma, showing histological components). Exclusion criteria were: 1) diagnosis of congenital cholesteatoma; and 2) sample inadequate for immunohistochemistry processing. The patients were divided in two groups, according to their age at the time of surgery (adults if above 18 years old and children until that age). Sixty cholesteatomas were include in each group.

Tissue samples were collected, between May of 2003 and March of 2007, by the operating ENT surgeon, in specifics sites of the middle ear and mastoid: mesotympanum (over of the bulging of the promontory); the wall of the anterior epytympanum around middle wall of the attic, the proeminence of the lateral semicircular canal. These areas were chosen due the smoothness of the surface making possible the removal of big pieces of well conserved matrix and perimatrix. Samples of these sites were thought to probably contain matrix and perimatrix, and have to measure at least 5 mm. The material was immediately fixed in 10% formol and processed by usual histological techniques with inclusion in paraffin.

Five slides of each sample were prepared for morphological and immunohistochemistry analyses. The slides were analyzed using a light microscope at 200 powers by two independent observers (one, a faculty member of the Pathology Department of the Federal University of Rio Grande do Sul Medical School, and the other, the primary author). The slides were “blinded” prior to interpretation.

The first slide was stained with hematoxylin-eosine (HE) (Figure 2A) with the which were evaluated the histological integrity of the colesteatoma (presence of matrix and perimatrix), beyond the observation of the following components: average number of epithelial cell layers of matrix, presence or not of delimiting epithelium, hyperplasia, fibrosis and granuloma.

Mean number of matrix cells layers was obtained by counting cells layers in five different fields of slides, carrying out on average of those for obtain to statistical it to be tested. The other aspects (delimiting epithelium, hyperplasia, fibrosis and granuloma) were analyzed only qualitatively ("present" or "absent").

After the blade evaluation in HE, with the histological integrity confirmation of the samples, the second blade was stained with Picrosyrius (Figure 2B), for the perimatrix thickness measurement. This stain was used for allowing a better differentiation of the perimatrix than with the HE stain (3A), as Picrosyrius stains the collagen fibers in dark red, making it easier to delimit the thickness to be measured. The perimatrix thickness was obtained through analyses of computerized images using ImagePro Plus Media Cybernetics software (Figure 3). Laminas were examined on all their extension and it was obtained 20 measurements of perimatrix by each cholesteatoma, in order to denote the intrapatient variability. Using the 20 measures of each perimatrix, we obtained the median, which are the summarizing measures for the analysis of perimatrix's thickness. In the cases in that to

perimatrix was extremely thin, not permitting to his measurement by the software, the thickness was considered as like zero.

The same cholesteatomas used in the cuts with Picrosyrus stain were submitted to the immunohistochemistry technique employed in the Pathology Service routine, which consists in deparaffinization, rehydration, antigen retrieval, endogenous peroxidase inactivation, and blocking of non-specific background staining.

The third blade was prepared for counting the mean number of blood vessels, using the primary anti-CD31 antibody (clone JC70A, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA). The material was incubated for 12 hours, at 4°C and 1:40 dilution, followed by the application of streptavidin-biotin-peroxidase complex (LSAB, Dako) and print processing with diaminobenzidine tetrahydrochloride (Kit DAB, Dako).

The mean number of blood vessels in the perimatrix (stained by the anti-CD31 antibody reaction) was collected continuously, through the Chalkley count, where a 25-point grid of is placed onto a scanned image and all points that coincide with the marked vessels are counted (Figure 4). Two to five images were used, depending on the size of the cholesteatomas, and the mean value was obtained with the number of counted vessels in each image. The perimatrix areas with evident granulation tissue were avoided in image capture. Reading of blades was performed by two independent observers (one was a student at the Pathology Department and one was the main researcher), the final variable was the mean value of all readings performed with each blade.

In order to evaluate the production of metalloproteinases, the two last blades were prepared using anti-MMP2 (72kDa Collagenase IV, Chemicon International, USA) and anti-MMP9 (clone 9D4.2, Chemicon International, USA) antibodies. Cuts of cholesteatomas were incubated for 72 hours, at 4°C and 1:40 dilution, followed by the

application of biotin-streptavidin peroxidase complex (LSAB, Dako) and print processing with diaminobenzidine tetrahydrochloride (Kit DAB, Dako). Immunoreactivity of metalloproteinases was observed in the matrix of cholesteatomas, being MMP9 in the cytoplasm of epithelium cells and MMP2 in the cytoplasm and nucleus.

The intensity of MMP2 and MMP9 colorings was observed and the results were expressed as 0, 1, 2 and 3, according to the metalloproteinase coloring intensity (absent, mild, moderate and accentuated, respectively). Besides the coloring evaluation, the percentage of stained material was also estimated, using a scale ranging from zero (no immunoreactivity) to 100% (all material was stained). Such percentage was dichotomized as follows: 1 - percentages ranging from 0 to 50% and 2 - from 51 to 100%. The final variable to be statistically analyzed was the product result of the coloring intensity (zero to three) using the multiplying factor (1 or 2) resulting from the percentage of stained material.

Frequency tables were used for descriptive data. Spearman's coefficient was used in the statistical analysis, in the correlation of the mean number of blood vessels and the quantification of metalloproteinases with the mean number of cells in the matrix, the perimatrix thickness and the patient's age on the surgery date. The Mann-Whitney test was used to compare the perimatrix thickness, the mean number of blood vessels and the quantification of metalloproteinases between the groups. Fisher's exact test was used to compare the presence of delimitating epithelium, hyperplasia, fibrosis and granuloma between the groups. The analysis was performed through software application SPSS 13.0 for Windows. Values of $P \leq 0.05$ were considered as statistically significant.

Results

1 - Demographic data

The sample was composed of 120 cholesteatomas, which were equally distributed in the pediatric and adult groups. The sample was equally divided also in terms of genre.

The mean±standard deviation values of patient's age on the surgery date was 24.99±16.80 years. The pediatric group presented mean age of 11.75±3.48 years and the adult group presented mean age of 38.02±14.31.

As the dates didn't present normal distribution, from this point, will be presented by his median and interquartil interval. By the same fact, all the statistical analysis will be carried out with nonparametric tests.

2 – Histological findings

The mean number of cell layers in the matrix ranged from 2 to 23, with median value of 6 (5 to 9). Hyperplasia in the matrix was identified in 35% of the cholesteatomas, 14% presented granuloma and 67% presented fibrosis. The presence of simple cuboidal epithelium, delimitating the perimatrix in its depth plane, occurred in 20% of the cases.

The variable perimatrix thickness appeared in cholesteatomas from different patients, as well as in the material from the same individual. One species in particular presented areas from very delicate thickness to thick parts. The thickness was of 78 micrometers (34 to 217), considering the minimum value of zero and the maximum value of 1269. In seven cases - six adults and one pediatric case – the perimatrix was extremely thin that it could not be measured, and was considered as zero. Figure 5 shows some very representative examples of the variation in the histological composition found in this sample of acquired cholesteatomas.

When stratified in age groups, the histological components analyzed in this study presented a similar distribution in both groups, except for the perimatrix thickness and the presence of delimitating epithelium (Table 1).

3 – Immunohistochemical findings

The mean number of blood vessels (Figure 6) was 6 (0 to 11). In the pediatric group, this number was 7 (4 to 11) and 4 (0 to 10) in the adult group.

Cytoplasmatic MMP 2 median value (Figure 7) was 0 (0 to 1). In the pediatric group, this value was 1 (0 to 3) and 0 (0 a 1) in the adult group.

The results of nuclear MMP2 (Figure 8) were similar. Median value for the general group: 0 (0 to 1); in the pediatric group, it was 1 (0 to 1) and 0 (0 a 1) in the adult group.

MMP 9 median value (Figure 9) was 1 (0 to 4). In the pediatric group, this value was 2 (0 to 4) and 0 (0 a 4) in the adult group.

When comparing the mean value of blood vessels, the quantity of cytoplasmatic MMP2, nuclear MMP2 and MMP9 between the groups using the Mann-Whitney test, all variables analyzed showed a statistically significant difference.

Table 1 shows the comparison of histological and immunohistochemical variables between the pediatric and adult groups, using Mann-Whitney and Fisher's exact tests:

When correlating the mean number of blood vessels with the mean number of metalloproteinases, with the mean number of cell layers of the matrix and with the perimatrix thickness, strong correlations are found. Besides, an inverse correlation was found, of cytoplasmatic MMP2 with the patient's age on the surgery date (Table 2).

Discussion

In a series of studies conducted by our group^{16,17,18} we analyzed the histological inflammation degree in the perimatrix of acquired cholesteatomas, using a semi-quantitative variable. We found in these studies^{16,17,18} a strong and inverse correlation the patient's age on the surgery date with the inflammatory process, i.e., the younger the patient, the larger the inflammation. In this study, we attempted to enhance the precision of this analysis using a quantitative variable resulting from the measurement through immunohistochemistry, anti-CD 31 antibody (marker of angiogenesis). With this variable, we found a statistical difference of the angiogenesis between the age groups (pediatric and adult groups) and we realized that the mean number of blood vessels in the perimatrix is much higher in the pediatric group than it is in the adult group, a fact that leads us to suggest that the inflammatory process is more exacerbated in children, a characteristic that could involve a higher aggressiveness degree of the cholesteatomas presented by the pediatric group.

Besides the angiogenesis measurement, we also studied the metalloproteinases for being enzymes associated with the pathological absorption of the extracell matrix in chronic inflammatory processes²⁴, which, therefore, considers it as a required part in bone erosion and reabsorption processes. MMP activity is regulated by Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) and the interruption of such combination may lead to a pathological process. Figure 10 shows the sites of MMP production, expression and activity in the cholesteatomas (adapted from Medina and Radomski²⁵).

We know metalloproteinases are proteolytic enzymes that can degrade components of the connective tissue²⁴. In addition, the production of metalloproteinases is encouraged by the inflammatory process. Thus, we suggest that the cholesteatomas, when stimulated by infectious factors, can produce more of these enzymes that degrade collagen fibers²⁵.

Our results indicated that the metalloproteinases (cytoplasmatic MMP2, nuclear MMP2 and MMP9) showed increased expression in pediatric cholesteatomas. In other words, younger patients have higher expression of metalloproteinases. It should be noted that cytoplasmatic MMP2 was also inversely correlated with the patient's age on the surgery date, i.e., the younger the patient, the higher this protein expression.

We know that MMP2 is a proteolytic enzyme associated with the ability to penetrate into and invade adjacent tissues²⁶. In normal biological processes, the metalloproteinases are responsible for the bone tissue homeostase, with higher expression in inflammatory osteolytic diseases. Based on our results, we can suggest the pediatric cholesteatomas present a greater potential for bone invasion and erosion, as a result of the higher expression of metalloproteinases than of cholesteatomas in adult patients.

Based on the results obtained in this study, we can suggest the aggressiveness of cholesteatomas resides in biochemical processes that occur in the perimatrix, and that the bone erosion initiates in such cholesteatoma structure, a typical characteristic of the chronic otitis media with cholesteatoma.

When concluding this study and combining it with the studies previously conducted by our group^{16,17,18}, we can realize increased number of evidences indicating greater aggressiveness of chronic otitis media with cholesteatoma in children, as follows: the pediatric cholesteatomas present a thicker perimatrix, a more exacerbated inflammatory process, a higher degree of angiogenesis and produce more metalloproteinases than cholesteatomas of adult patients. Thus, we can suggest that these combined factors make chronic otitis media with cholesteatoma more aggressive in children than in adults.

Conclusions

The expressions of CD31, cytoplasmatic MMP2, nuclear MMP2 and MMP9 are higher in the pediatric group.

The mean number of blood vessels is strongly correlated with the quantity of metalloproteinases, the mean number of cell layers in the matrix, the perimatrix thickness and the histological inflammation degree.

Acknowledgements

We would like to thank the Pathology and Ear, Nose and Throat Departments of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, for the permission to use their facilities and enable the development of this project.

The Research and Post Graduation Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA) and the Post Graduation Program in Medical Sciences: Pediatrics Department of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, for their technical support.

The Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), for the research financing.

Conflict of interest

The authors haven't a financial relationship with the organization that sponsored the research.

References

1. Schuknecht HF. The pathology of the ear. Cambridge: Harvard University, 1974.
2. Tos M. Incidence, etiology and pathogenesis of cholesteatoma in children: a long-term study of results. *Otol Rhinol Laryngol.* 1988; 40:110-7.

3. Kemppainen HO, Puhakka HJ, Laippala PJ, Sipila MM, Manninen MP, Karma PH. Epidemiology and etiology of middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol.* 1999; 119:568–72.
4. Quantin L, Fernández SC, Moretti J. Congenital cholesteatoma of external auditory canal. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2002; 62:175–9.
5. Lim DJ e Saunders WE. Acquired cholesteatoma: light and electron microscopic observations. *Ann Otol.* 1972; 81:2-12.
6. Sheehy JL. Management of cholesteatoma in children. *Adv. Oto-Rinolaryng* 1978; 23:58-64.
7. Tos M. Treatment of cholesteatoma in children: A long-term study of results. *J Otol.* 1983; 4:189-97.
8. Edelstein DR. Acquired Cholesteatoma in Pediatric Age Group. *The Otolaryngol Clin North Am.* 1989; 22(5):955-64.
9. Glasscock ME, Dickins JFE, Wiet R. Cholesteatoma in children. *Laryngoscope* 1981; 91:1743-53.
10. Ruah CB, Schachem PA, Paparella MM, Zeltermann D. Mechanisms of retraction pocket formation in the pediatric tympanic membrane. *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992; 118(12):1298-305.
11. Bujia J, Holly A, Antoli-Candela F, Tapia MG. Immunobiological peculiarities of cholesteatoma in children: quantification of epithelial proliferation by MIB1. *Laryngoscope* 1996; 106(7):865-8.
12. Palva A, Karma P, Kärjä J. Cholesteatoma in children. *Arch Otolaryngol.* 1997; 103(2):74-7.

13. Sudhoff H, Dazert S, Gonzales AM, Borkowski G, Park SY, Baird A, *et al.*
Angiogenesis and angiogenic growth factors in middle ear cholesteatoma. *The Am. J. of Otol.* 2000; 21:793-8.
14. Smythe JL, Brachman D, Grahm M. Complications of cholesteatoma: A report on 1.024 cases. In: Swartz J D. *Cholesteatomas of the middle ear. Diagnosis, Etiology and Complications.* Radiol Clin North Am 1984; 22:15-34.
15. Quaranta A, Resta L, Santangelo A. Otomastoid cholesteatoma in children: histopathological findings. *Int J. Pediatric Otorhinolaryngol.* 1986; 12(2):121-6.
16. Dornelles CD. *Colesteatomas Adquiridos: Análise Comparativa da Perimatriz entre Pacientes Pediátricos e Adultos [dissertação].* Porto Alegre, UFRGS, 2004.
17. Dornelles CD, Costa SS, Meurer L, Schweiger C. Comparação da espessura da perimatriz, de colesteatomas adquiridos, entre pacientes pediátricos e adultos. *Rev. Bras. de ORL* 2005; 71(6):792-7.
18. Dornelles CD, Costa SS, Meurer L, Schweiger C. Descrição histológica de colesteatomas adquiridos: comparação entre amostras de crianças e de adultos. *Rev. Bras. de ORL* 2006; 72(5):641-8.
19. Milewski C. Role of perimatrix fibroblast in development of acquire middle ear cholesteatoma. A hypothesis. *HNO* 1998; 46(5):494-501.
20. Baak JPA. *Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis.* Springer-Verlag, 1991.
21. Meurer L. Densidade microvascular e expressão imunoistoquímica de p21: associação com sobrevida em pacientes submetidos à cirurgia por carcinoma epidermóide de esôfago [tese]. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

22. Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Mendelson JHP, Israel MA, Liotta LA, editor. The molecular basis of cancer. Philadelphia: WB Saunders, 1995; p 206-32.
23. Bernal-Sprekelsen M, Ebmeyer J, Anonopoulos A, Borkowiski G, Sudhoff H. Alteraciones de la membrana basal en el colesteatoma de oído medio.- Acta Otorrinolaringol Esp 2001; 52(4):330-5.
24. Wilmoth JG, Schultz GS, Antonelli PJ. Tympanic membrane metalloproteinase inflammatory response. Otolaryngol Head Neck Surg 2003; 129(6): 647- 54.
25. Medina C, Radomski MW. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. J Pharmacol Exp Ther. 2006 Sep;318(3):933-8.
26. Banerjee AR, James R, Narula AA. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in cholesteatoma and deep meatal skin. Clin Otolaryngol 1998; 23(4):345-7.

Tables:

Table 1: Comparison of variables studied between the Pediatric and Adult Groups

Variable	General (n=120)	Pediatric Group (n=60)	Adult Group (n=60)	P Value
Perimatrix Thickness	78 (34 to 217)	104 (48 to 245)	49 (15 to 176)	0.014 ¹
Matrix	6 (5 to 9)	6 (5 to 9)	6 (5 to 9.5)	0.813 ¹
Number of Vessels: CD31	6 (0 to 11)	7 (4 to 11)	4 (0 to 10)	0.044 ¹
Cytoplasmatic MMP2	0 (0 to 2)	1 (0 to 3)	0 (0 to 1)	0.006 ¹
Nuclear MMP2	0 (0 to 1)	0 (0 to 1)	0 (0 to 1)	0.054 ¹
MMP9	1 (0 to 4)	2 (0 to 4)	0 (0 to 4)	0.049 ¹
Delimitating Epithelium	24 (20.2%)	17 (28.1%)	7 (12.3%)	0.036 ²
Hyperplasia	42 (35.1%)	21 (35.1%)	21 (35.1%)	0.999 ²
Fibrosis	80 (66.7%)	42 (70.2%)	38 (63.2%)	0.551 ²
Granuloma	17 (14.2%)	9 (15.0%)	8 (14.0%)	0.999 ²

Mann-Whitney Test¹, Fisher's Exact Test²

Table 2: Correlations found when comparing the studied variables

	Age	Thickness	Matrix	CD31	c MMP2	n MMP2	MMP9
Age	_____	-0.256 (0.008)	-0.010 (0.919)	-0.164 (0.160)	-0.248 (0.027)	-0.139 (0.180)	-0.154 (0.173)
Thickness	-0.256 (0.008)	_____	0.479 (<0.0001)	0.742 (<0.0001)	0.465 (<0.0001)	0.414 (<0.0001)	0.643 (<0.0001)
Matrix	-0.010 (0.919)	0.439 (<0.0001)	_____	0.473 (<0.0001)	0.302 (<0.0001)	0.183 (0.077)	0.300 (0.007)
CD31	-0.164 (0.160)	0.742 (<0.0001)	0.473 (<0.0001)	_____	0.539 (<0.0001)	0.515 (<0.0001)	0.850 (<0.0001)
MMP2 c	-0.248 (0.027)	0.465 (<0.0001)	0.302 (<0.0001)	0.539 (<0.0001)	_____	0.908 (<0.0001)	0.664 (<0.0001)
MMP2 n	-0.139 (0.180)	0.414 (<0.0001)	0.183 (0.077)	0.515 (<0.0001)	0.908 (<0.0001)	_____	0.548 (<0.0001)
MMP9	-0.154 (0.173)	0.643 (<0.0001)	0.300 (0.007)	0.850 (<0.0001)	0.664 (<0.0001)	0.548 (<0.0001)	_____

Age = patient's age on the surgery date (in years); Thickness = perimatrix thickness (in micrometers); Matrix= mean number of cell layers in the matrix; Inflammation = histological inflammation degree; CD31 = mean number of blood vessels in the perimatrix; c MMP2 = reactivity of metalloproteinase 2 in the matrix cell cytoplasm; n MMP2 = reactivity of metalloproteinase 2 in matrix cell nucleus; MMP9 = reactivity of metalloproteinase 9 in the matrix cell cytoplasm; Spearman's Correlation Coefficient (P Value).

Legends of Figures:

Figure 1: Summary of the different cell types that produce MMP and TIMP. The cholesteatoma matrix may initiate the immunological response with the activation of different cells in the perimatrix, such as: macrophages, fibroblasts and leucocytes, releasing cytokines, such as interleukin-1 (IL-1) and the Tumoral Necrosis Factor (TNF α). The activated immunological cells can also release both MMP and TIMP. Physiological conditions may cause unbalanced MMP/TIMP. Inflammatory reactions lead to unbalance of MMP in relation to TIMP, which may cause the extracell matrix remodeling. Model elaborated from authors adapted by Nagase *et al.* (2006).

Figure 2: Scanned image of the blade, cross-sectional cut of the cholesteatoma, stained with Hematoxylin-Eosin. We can see its three constituting parts: A – Perimatrix, B – Matrix, C – Cystic Content. Enlargement: 100x

Figure 3: Histological image of the cholesteatoma stained with Hematoxylin-Eosin (A) and Picrosyrus (B): 1 – Perimatrix, 2 – Matrix, 3 – Cystic Content. Enlargement: 100x

Figure 4: Image obtained with Image Pro-Plus through thickness measurement technique.

Figure 5: Image of ImagePro Plus Media Cybernetis software screen, showing Chalkley grid: 1 - Blood vessel marked that does not coincide with the grid point, 2 - Point that coincides with blood vessel.

Figure 6: Representative cholesteatomas of the sample, illustrating their histological components: 1 – Perimatrix, 2 – Matrix, 3 – Cystic Content. A – Epitympanic cholesteatoma from a female patient of 44 years old. In histological terms, it presents

stratified scaly keratinized epithelium, mean number of cell layers: three. Perimatrix is absent. Enlargement: 200x. B – Epitympanic cholesteatoma from a male patient of 37 years old. In histological terms, it presents stratified scaly keratinized epithelium, mean number of cell layers: six. Narrow and fibrotic perimatrix, with rare lymphocytes. Absence of granuloma. Enlargement: 200x. C – Mesotympanic cholesteatoma from a female patient of 35 years old. In histological terms, it presents stratified scaly keratinized epithelium, mean number of cell layers: four. Very narrow perimatrix, no fibrosis and no inflammatory infiltrate. Enlargement: 200x. D - Mesotympanic cholesteatoma from a male patient of 16 years old. In histological terms, it presents stratified scaly keratinized epithelium, mean number of cell layers: six. Narrow and delicate perimatrix, no fibrosis and with little inflammatory infiltrate. Enlargement: 200x. E - Epitympanic cholesteatoma from a female patient of 11 years old. In histological terms, it presents stratified scaly keratinized epithelium, mean number of epithelial cell layers: twelve. The perimatrix presents dense fibrosis, accentuated chronic inflammatory infiltrate and is delimited in its depth plane by simple cuboidal epithelium. Enlargement: 50x. F - Mesotympanic cholesteatoma from a female patient of seven years old. In histological terms, it presents stratified scaly keratinized epithelium, mean number of cell layers: thirteen. The perimatrix presents mild fibrosis with accentuated inflammatory infiltrate and neutrocytic exudation, being delimited in its depth plane by simple cuboidal epithelium. Absence of granuloma. Enlargement: 50x.

Figure7: Cholesteatoma marked with CD 31 (arrow). Enlargement: 200x

Figure 8: Cholesteatoma marked with cytoplasmatic MMP 2. Moderate immunoreactivity, 80% of cells were stained. Enlargement: 200x

Figure 9: Cholesteatoma marked with nuclear MMP 2. Moderate immunoreactivity, 70% of cells were stained. Enlargement: 200x

Figure 10: Cholesteatoma marked with MMP 9. Accentuated immunoreactivity, 100% of cells were stained. Enlargement: 200x

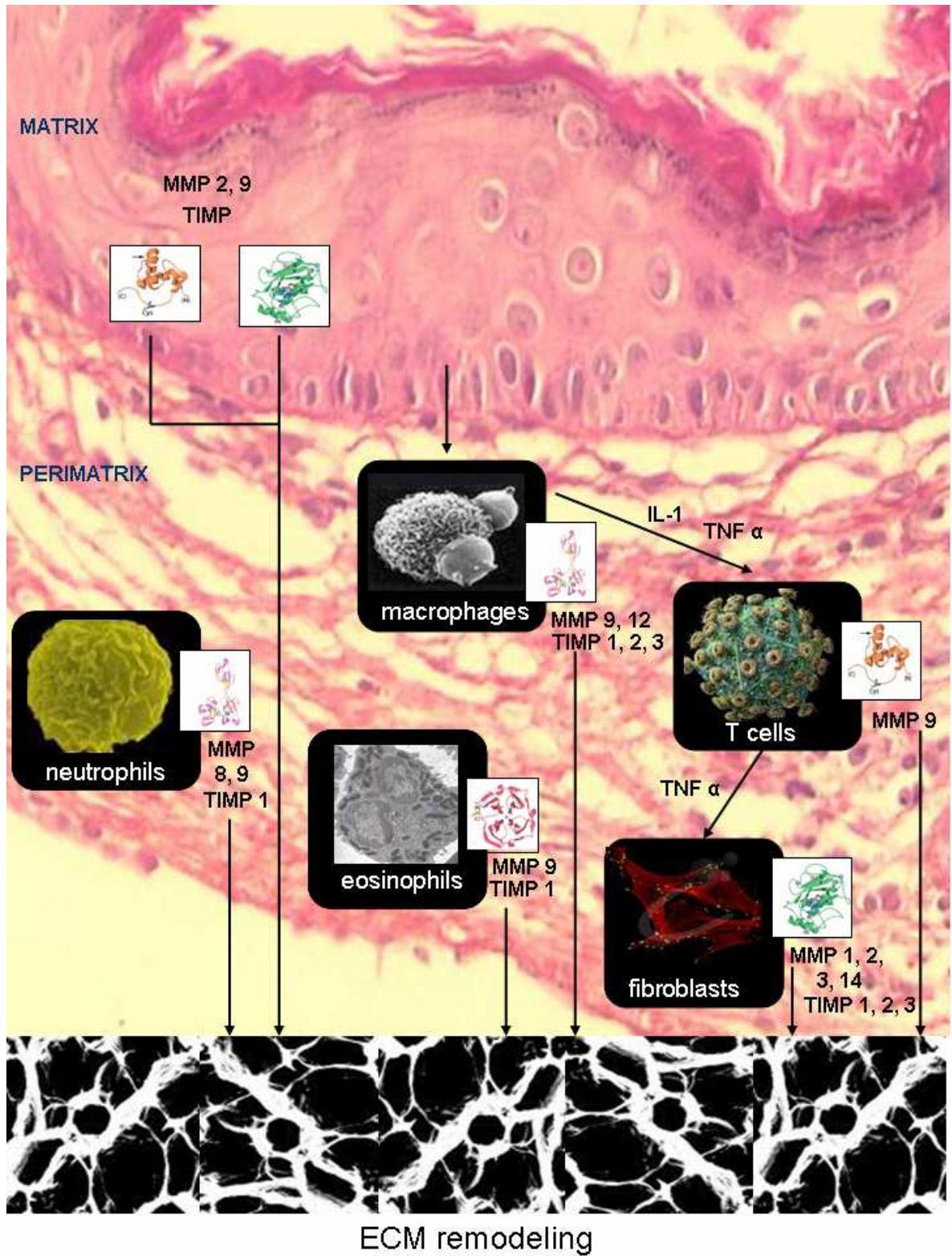


Figure 1

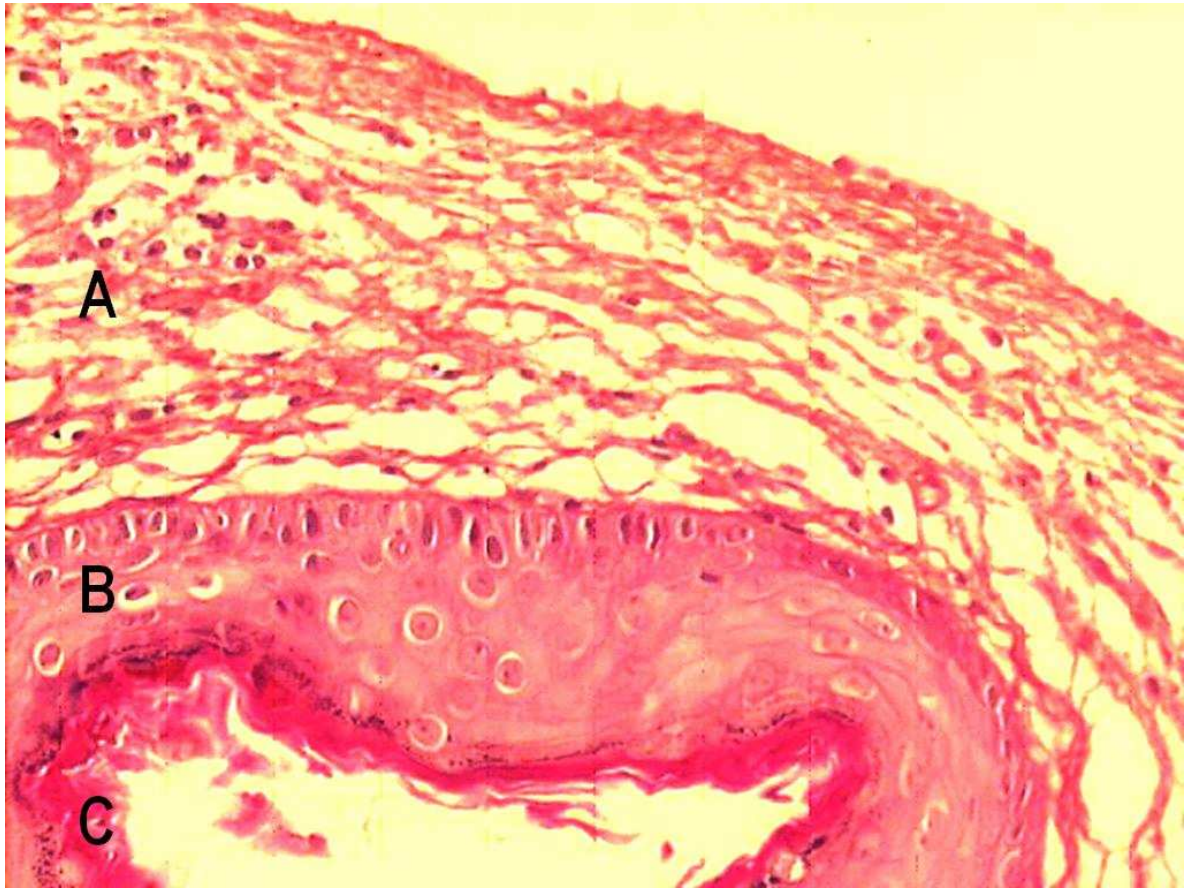


Figure 2

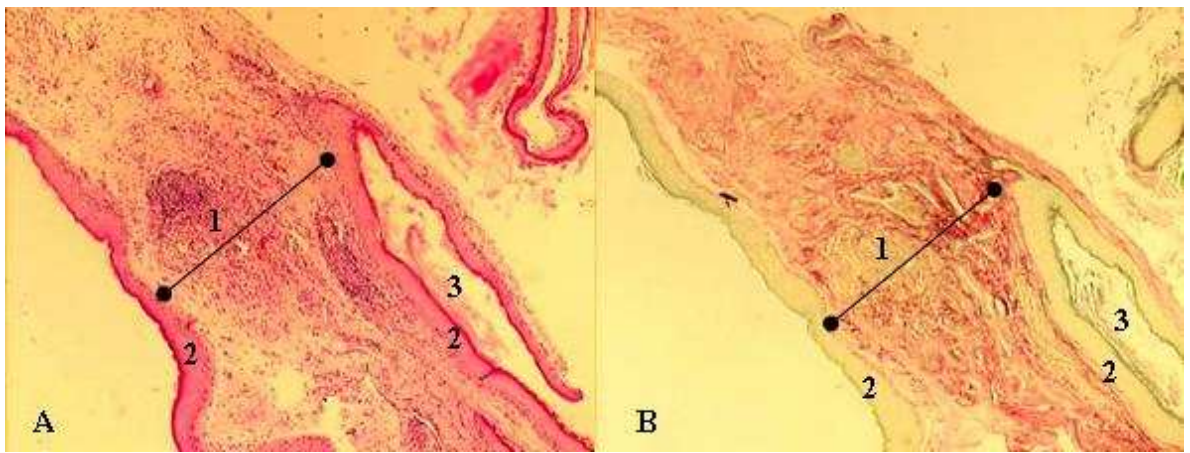


Figure 3

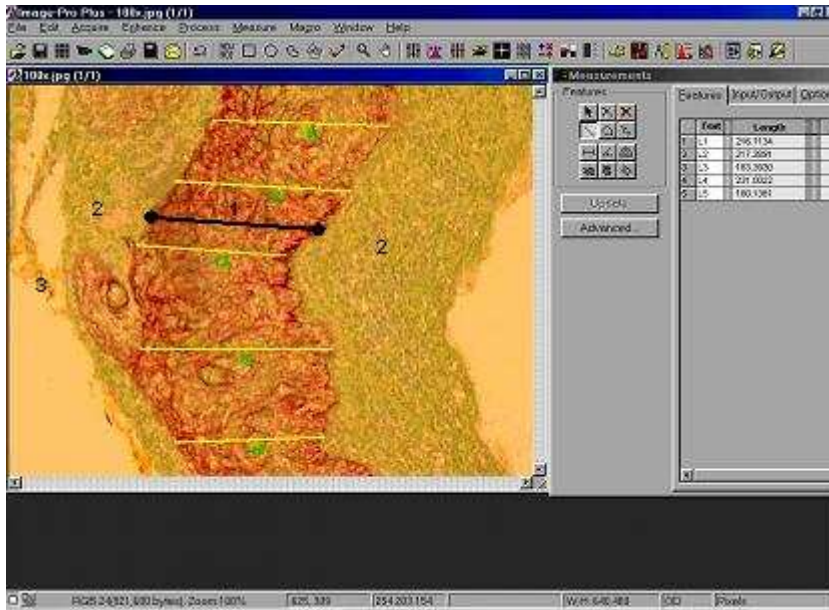


Figure 4

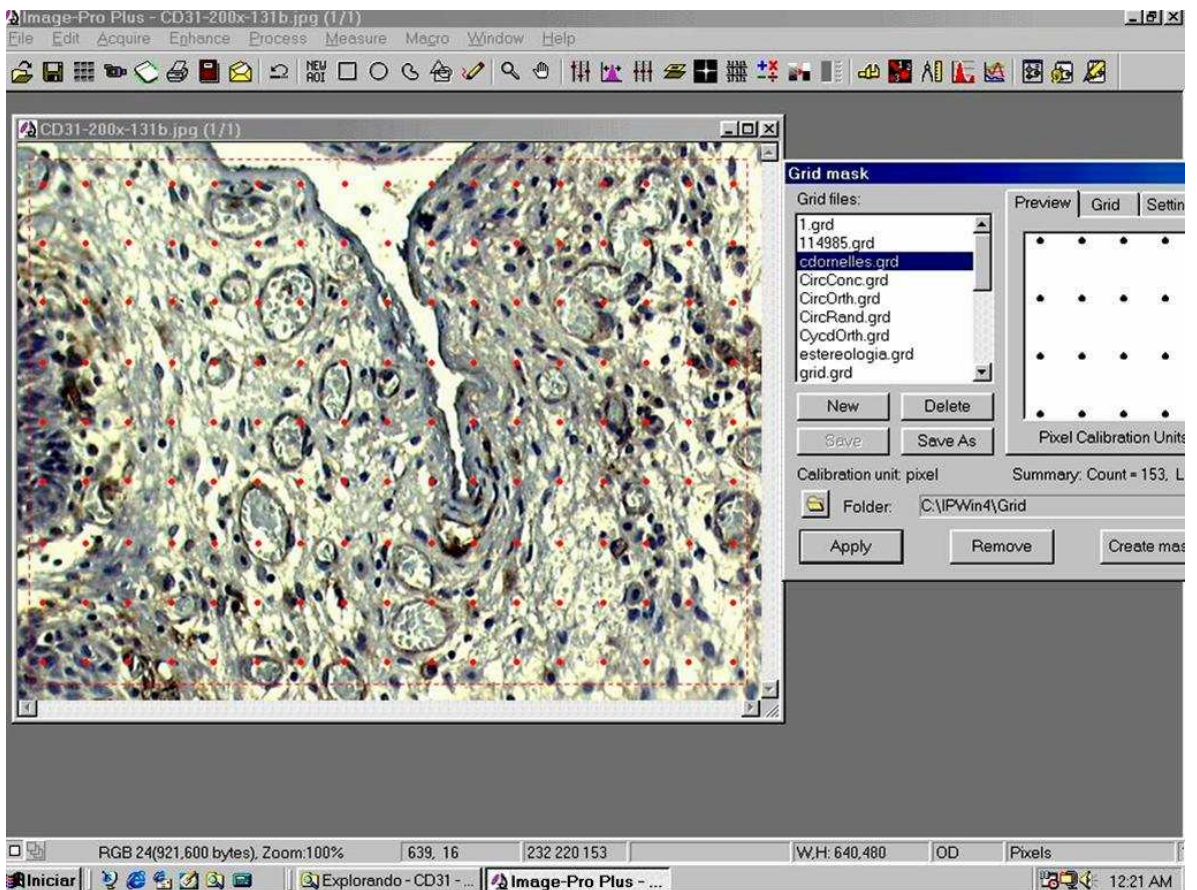


Figure 5

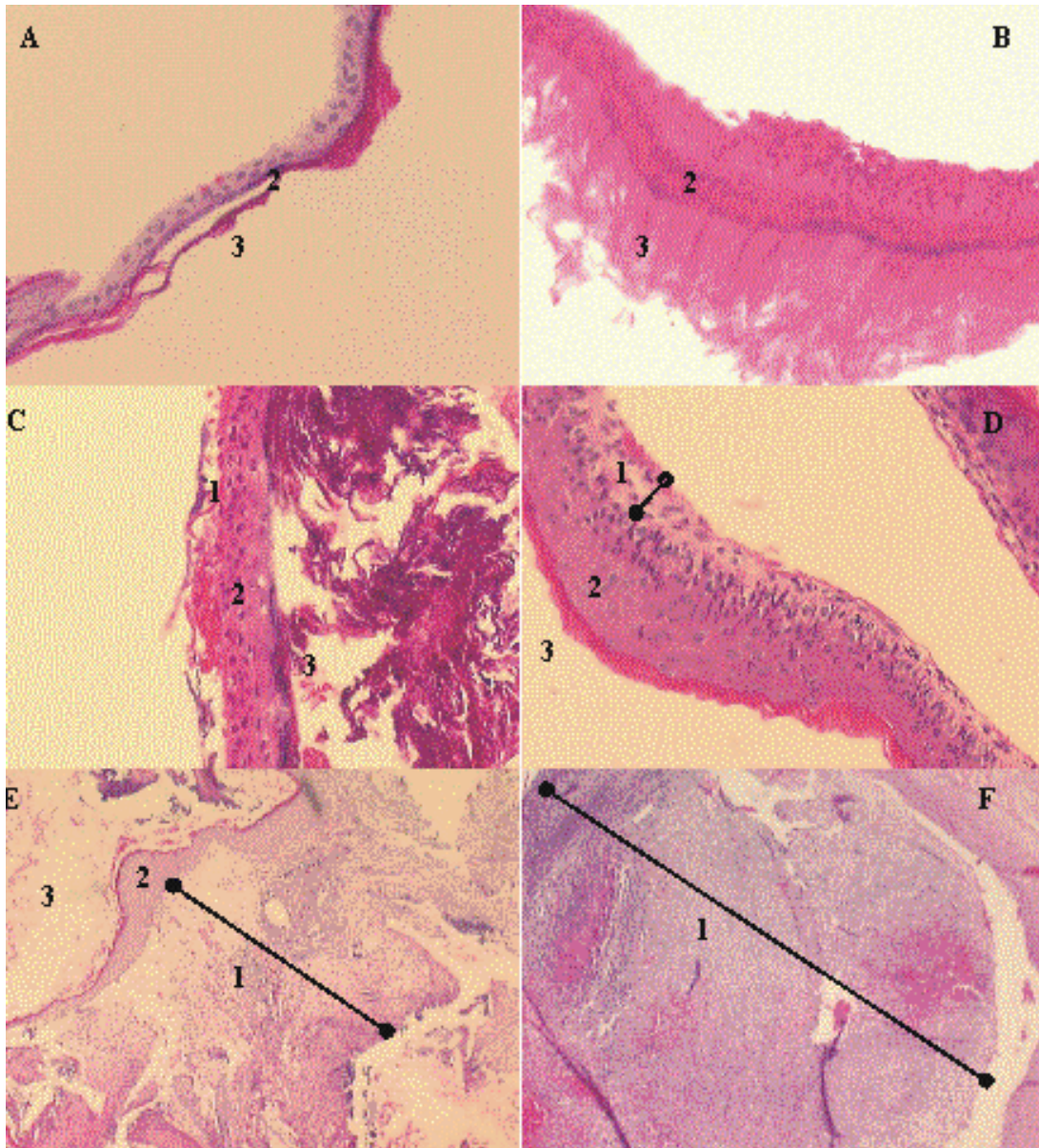


Figure 6

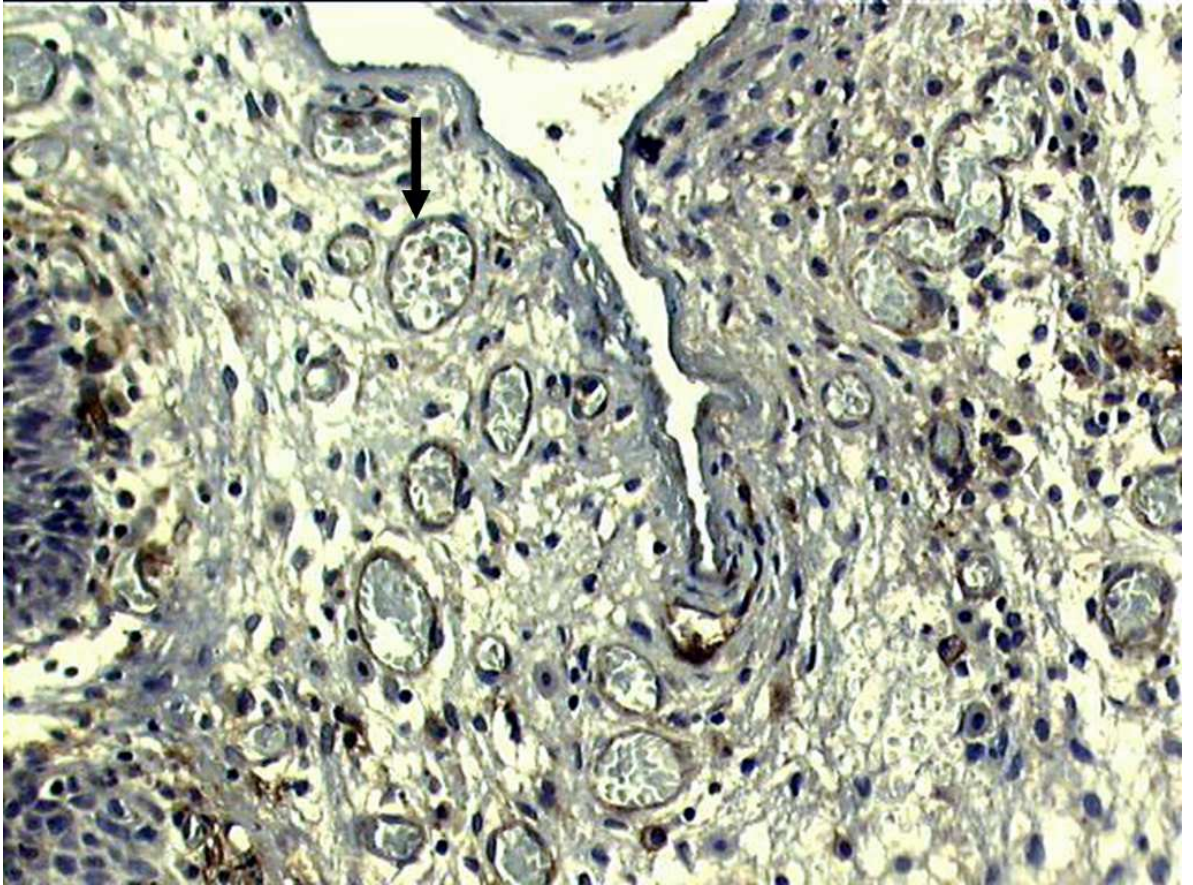


Figure 7

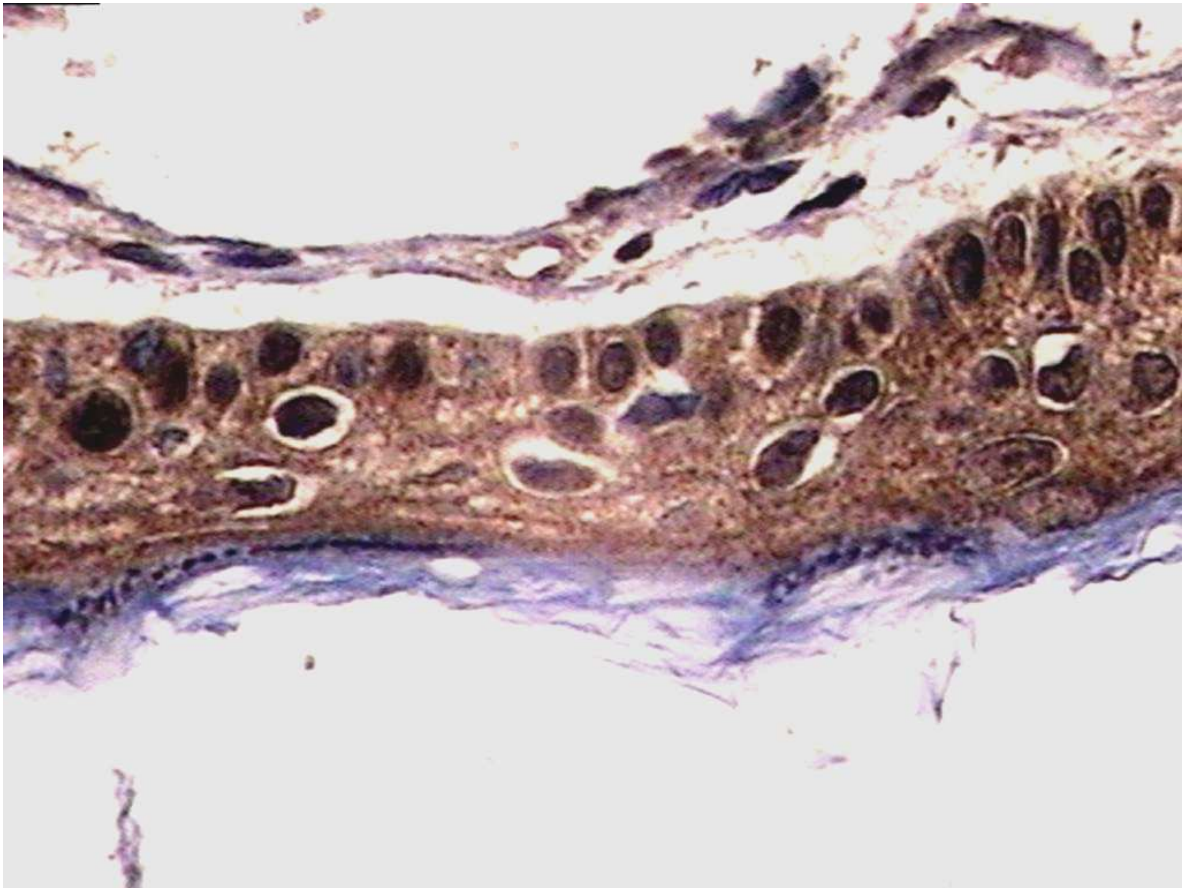


Figure 8

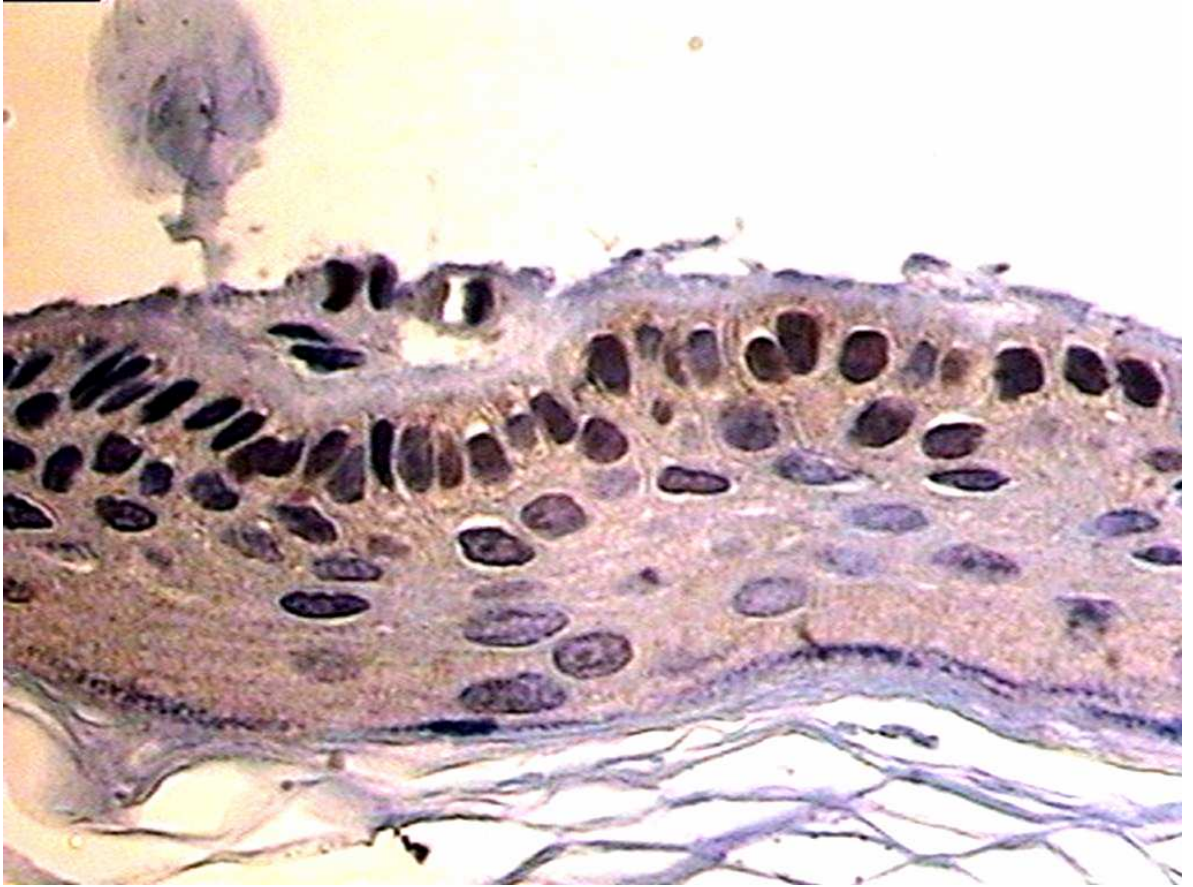


Figure 9

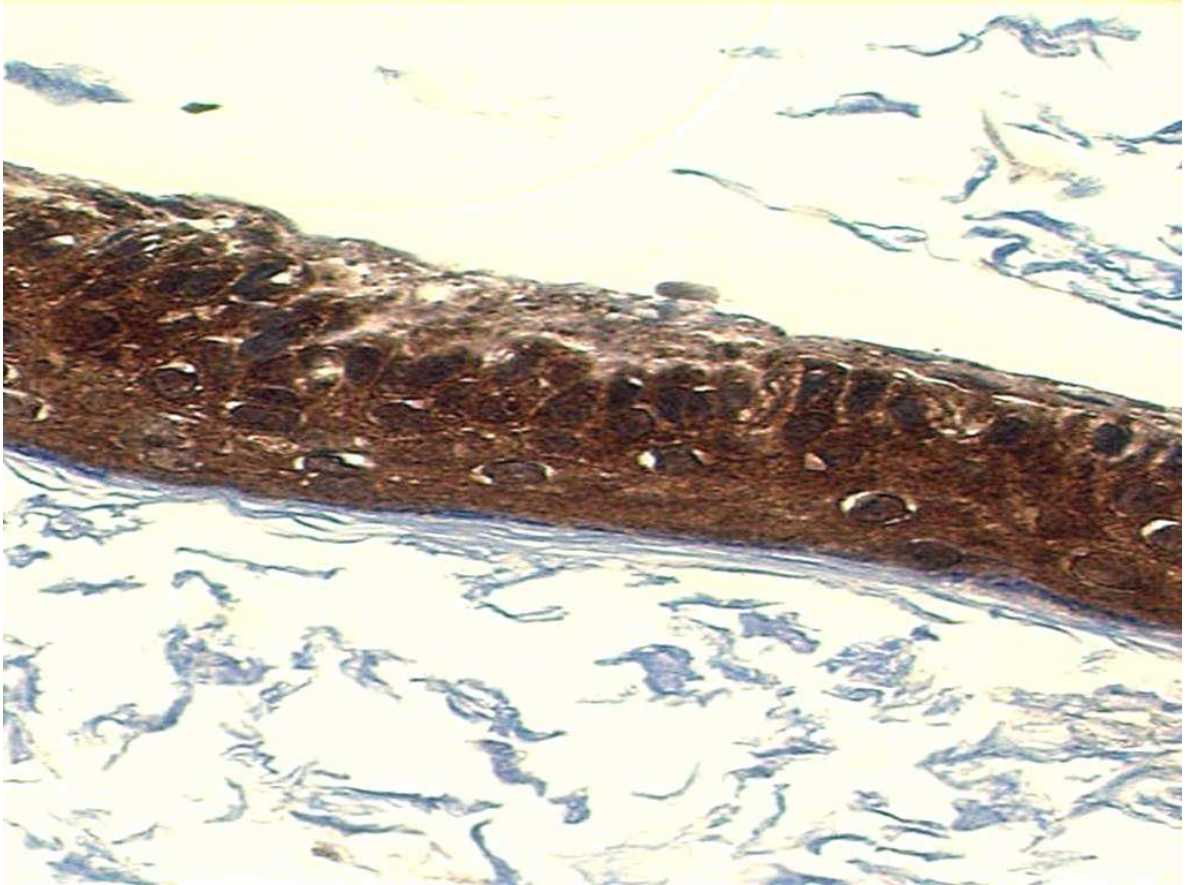


Figure 10

CD com a coleção histológica