

Imunohistoquímica da Epiderme do Meato Acústico Externo: Revisão Sistemática da Literatura

Immunohistochemistry of the External Auditory Canal: Systematic Review

*João Daniel Caliman e Gurgel**, *Fernando de Andrade Quintanilha Ribeiro***,
*Celina Siqueira Pereira****, *Adriana Leal Alves*****.

* Médico Otorrinolaringologista. Mestre em Medicina pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

** Doutor em Otorrinolaringologia pela UNIFESP. Professor Adjunto do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

*** Doutora em Medicina pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Professora Assistente do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Santa Casa de São Paulo.

**** Doutora em Medicina pela Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Professora Instrutora do Departamento de Morfologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. São Paulo / SP – Brasil.

Endereço para correspondência: João Daniel Caliman e Gurgel – Avenida João Felipe Calmon, 1115 - Centro – Linhares / ES CEP 29900-010 – Telefone: (27) 3371-6836 – Fax: (27) 3329-2202 – E-mail: contato@joaodaniel.com

Artigo recebido em 31 de janeiro de 2008. Artigo aceito em 3 de junho de 2008.

RESUMO

Introdução:

Vários estudos envolvendo métodos imunohistoquímicos para avaliação da epiderme do meato acústico externo já foram realizados com os mais diversos objetivos. Por meio deste método é possível avaliar a expressão de vários antígenos como as citoqueratinas, citocinas, marcadores de hiperproliferação entre outros.

Objetivo:

Revisar, descrever e analisar o conhecimento gerado pelos trabalhos identificáveis na literatura mundial sobre os padrões imunohistoquímicos da epiderme do meato acústico externo.

Método:

O método escolhido para alcançar os objetivos propostos foi a revisão sistemática da literatura, de artigos publicados até o ano de 2007 em periódicos internacionais indexados identificáveis. Vários antígenos foram pesquisados por meio de métodos imunohistoquímicos dentre os artigos analisados. Os mais estudados foram as citoqueratinas, Ki-67, beta-catenina, interleucinas e o PCNA.

Comentários Finais:

Após a revisão e análise dos trabalhos incluídos foi possível concluir que, além da maioria dos trabalhos ter utilizado a epiderme do meato acústico externo como amostra controle para estudo imunohistoquímico do colesteatoma, há uma concentração de antígenos de características hiperproliferativas, como a CK16, o Ki-67 e o PCNA no anel fibrocartilagíneo e nas regiões meatal e timpânica adjacentes, principalmente nas porções mais inferiores.

Palavras-chave:

meato acústico externo, imunohistoquímica, queratinas, citocinas, colesteatoma.

SUMMARY

Introduction:

Several studies involving immunohistochemical methods to examine external auditory canal epidermis have been performed for different purposes. Through this method it is possible to examine the expression of various antigens as cytokeratins, cytokines, hiperproliferation markers among others.

Objective:

To review, describe and analyze the knowledge generated by identifiable papers, published worldwide, about immunohistochemical patterns of the external auditory canal.

Method:

The chosen method was the systematic review of the papers published up to 2007 in international journal. Various antigens were investigated by immunohistochemical methods among the included papers, and the most studied ones were cytokeratins, Ki-67, beta-catenin, interleukins and PCNA.

Final Comments:

After reviewing and analysing the papers, it was possible to conclude that, besides most studies have used the external auditory canal epidermis as control sample to study the cholesteatoma with immunohistochemical methods, there is a hyperproliferative-characteristic antigens concentration as CK16, Ki-67 and PCNA on the annulus tympanicus, on adjacent meatal and tympanic areas, mainly on more inferior portions.

Key words:

external auditory canal, immunohistochemistry, keratins, cytokine, cholesteatoma.

INTRODUÇÃO

Indispensável à prática da histopatologia moderna, a tecnologia imunohistoquímica vem se desenvolvendo de forma considerável desde sua introdução no início da década de 1940. Este método baseia-se na demonstração da reação antígeno-anticorpo com a possibilidade de sua identificação à microscopia óptica, o que pode ser feito por meio da imunofluorescência ou por métodos imunoenzimáticos. Nos últimos anos, o papel da imunohistoquímica como método diagnóstico tem mudado daquele de técnica auxiliar para o de método principal, o qual pode determinar a melhor abordagem terapêutica e prognóstico.

Vários estudos envolvendo métodos imunohistoquímicos para avaliação da epiderme do meato acústico externo foram realizados com os mais diversos objetivos. Por meio da imunohistoquímica, inicialmente utilizada para diagnóstico de tumores, podem ser estudados também os mecanismos de migração epitelial da pele do meato, a resposta imune local, o padrão de expressão dos filamentos intermediários, a presença de citocinas e outros antígenos, avaliação da eficácia de novas propostas de tratamento para doenças que acometem o meato, assim como o colesteatoma, entre outros.

Com o conhecimento aprofundado dos padrões imunohistoquímicos da epiderme do meato acústico externo, pode haver uma maior compreensão de suas relações com a gênese das diversas doenças que o acometem, como por exemplo, o colesteatoma, além de contribuir para a escolha da melhor modalidade de tratamento e estabelecimento do prognóstico para cada doença.

Uma das teorias mais aceitas para a gênese do colesteatoma é a migração da epiderme do meato acústico externo para o interior da cavidade da orelha média por meio de uma perfuração na membrana timpânica. Entretanto, ainda permanecem várias dúvidas entre os autores como, por exemplo, por que ocorre esta migração, que normalmente tem sentido centrípeto na membrana timpânica e lateral no meato acústico externo, por que acontece somente em algumas pessoas, o que faz o colesteatoma ser mais ou menos agressivo entre outras dúvidas. Por estes motivos fez-se necessário a buscar de um maior entendimento das características imunohistoquímicas da epiderme do meato acústico externo na tentativa de compreender melhor o que de diferente acontece neste tecido.

O método escolhido para alcançar os objetivos propostos foi a revisão sistemática da literatura, importante recurso da medicina baseada em evidências que consiste em uma forma de síntese dos resultados de

pesquisas relacionados com um problema ou assunto específico.

Para a realização da análise dos estudos envolvendo os padrões imunohistoquímicos da epiderme do meato acústico externo, foi realizada uma revisão de todos os trabalhos identificáveis publicados até o ano de 2007 em periódicos nacionais e internacionais indexados, sobre os métodos imunohistoquímicos utilizados para pesquisa em amostras de pele do meato acústico externo (MAE), os padrões imunohistoquímicos da epiderme do meato normal e a aplicação destes métodos nas diversas doenças que o acometem.

Para o levantamento dos estudos, foram utilizadas as bases de dados eletrônicas PubMed (MEDLINE), OVID, Revisões Sistemáticas da Colaboração Cochrane (CCTR), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), além das publicações nacionais Revista Brasileira de Otorrinolaringologia (RBORL) e Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia (AIO) e do banco de teses da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Para a escolha precisa das palavras-chave, foram analisados os índices remissivos de três periódicos indexados na MEDLINE com fator de impacto maior que 1,0, que continham artigos relacionados ao assunto de estudo deste estudo. Foram eles: *The Laryngoscope* (Qualis A; fator de impacto em 2005: 1,617), com o artigo de VENNIX et al (1996), *International Journal of Molecular Medicine* (Qualis A; fator de impacto em 2005: 2,090), com o artigo de NAIM et al (2004) e *Microscopy Research and Technique* (Qualis A; fator de impacto em 2005: 2,323), com o artigo de SIRIGU et al (1997). Após a análise destes artigos, foram selecionados os termos descritores *immunohistochemistry* e *external auditory canal*, que correspondem a imunohistoquímica e meato acústico externo respectivamente segundo o MeSH (Medical Subject Headings) e DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) por serem estes os que mais tinham relação com os objetivos da pesquisa e os que mais identificavam estudos. Para a pesquisa na Revista Brasileira de Otorrinolaringologia e na Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia os termos foram utilizados em português (imunohistoquímica e meato acústico externo). Foram usados também para pesquisa de artigos os termos *immunocytochemistry*, *external acustic meatus* além da combinação de todos os já citados tendo sido encontrados um menor número de artigos.

Após esta pesquisa foram também avaliadas as referências bibliográficas dos artigos incluídos neste estudo, para inclusão de estudos que não foram identificados pela pesquisa nas bases de dados com as palavras-chave escolhidas.

Os critérios de inclusão desta revisão sistemática foram:

- Artigos publicados em periódicos indexados identificáveis na literatura mundial;
- Teses ou dissertações defendidas identificadas manualmente ou por pesquisa em bases de dados;
- Artigos com objetivos direta ou indiretamente relacionados com a avaliação imunohistoquímica da epiderme do meato acústico externo normal ou alterado;
- Artigos cujo método imunohistoquímico, bem como os anticorpos utilizados foram detalhadamente descritos.

Os critérios de exclusão foram:

- Artigos identificados, porém sem relação direta ou indireta com a avaliação imunohistoquímica da epiderme do meato acústico externo normal ou alterado;
- Artigos cujo método imunohistoquímico bem como os anticorpos utilizados não foram descritos em detalhes;
- Artigos sobre doenças incomuns ao meato acústico externo e sem nenhuma relação com o epitélio;
- Artigos cujos antígenos utilizados não tiveram relação direta com tecido epitelial ou com colesteatoma;
- Artigos publicados em idiomas de difícil tradução (japônês, chinês, alemão).

Entre os artigos incluídos no estudo, estes foram divididos e analisados por assunto:

- Estudos exclusivamente sobre o meato acústico externo normal;
- Estudos que correlacionam a epiderme do meato acústico externo com o colesteatoma;
- Estudos imunohistoquímicos sobre a epiderme do meato acústico externo alterado.

O objetivo deste estudo foi o de revisar, descrever e analisar o conhecimento gerado pelos trabalhos identificáveis na literatura mundial sobre a imunohistoquímica da epiderme do meato acústico externo.

REVISÃO DA LITERATURA

Estudos exclusivamente sobre o meato acústico externo normal

BROEKAERT, BOEDTS (1) (1993) realizaram estudo imunohistoquímico para pesquisa do padrão de expressão das citoqueratinas 4, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18 e 19 em fragmentos de pele do meato acústico externo, das porções epitelial e mucosa da membrana timpânica e da mucosa da orelha média. Os autores observaram expressão das CK 5 e 14 na camada basal e da CK10 nas camadas suprabasais na epiderme da membrana timpânica e do MAE. Na região do anel fibrocartilágneo, tanto na membrana timpânica quanto

na parte óssea do MAE foi encontrada expressão da CK19 na camada basal e da CK16 nas camadas suprabasais. Nas demais regiões do meato houve reação para CK16 apenas no epitélio de revestimento dos folículos pilosos.

LEPERCQUE et al (2) (1993), analisaram a distribuição das citoqueratinas 4, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18, 19 por meio de imunohistoquímica na epiderme do meato acústico externo e membrana timpânica. A parte externa da membrana timpânica, composta de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, mostrou um padrão semelhante ao da epiderme, com expressão da CK5, CK10 e CK14. Além disso, uma expressão focal da CK19 foi observada na região inferior do anel fibrocartilágneo, nos queratinócitos da camada basal. A CK16 foi encontrada e localizada predominantemente nas camadas suprabasais da epiderme da região da membrana timpânica próxima ao anel, com a intensidade de coloração diminuindo gradativamente em direção umbo. Nas amostras epiteliais removidas da porção cartilaginosa do meato acústico externo, observou-se também a expressão de CK5, CK10 e CK14, que sempre encontram-se presentes na epiderme. Não houve detecção das CK16 e CK19 nesta região do meato. Entretanto, na porção mais próxima do anel fibrocartilágneo, além das CK típicas do tecido epitelial encontrou-se também a expressão das CK16 e CK19, respectivamente nas camadas suprabasais e basal.

VENNIX et al (3) (1996) avaliaram a expressão das citoqueratinas nas diversas partes do meato acústico externo com o objetivo de utilizá-la como parâmetro de caracterização da diferenciação epitelial. Na parte cartilaginosa do MAE, todas as células basais foram coradas com os anticorpos para as citoqueratinas de células basais, CK5 e CK14. No meato ósseo estas citoqueratinas foram evidenciadas não só na camada basal como também nas camadas suprabasais na maioria das amostras. Tanto na parte cartilaginosa quanto na parte óssea do MAE e na membrana timpânica foi observada positividade em todas as células das camadas suprabasais para o marcador de queratinização, a CK10. Não houve reação na pele do meato cartilaginoso com os marcadores celulares associados à proliferação, CK6 e CK 16 nem com os anticorpos específicos para epitélios simples e estratificados, incluindo as CK7, CK8, CK17, CK18 e CK19. No meato ósseo foi detectada a expressão de CK6 em mais de duas camadas de células suprabasais com envolvimento das células basais em alguns locais e de CK16 e CK17 em uma ou duas camadas suprabasais e basais, respectivamente. A CK19 estava presente apenas em aglomerados celulares na camada basal, onde a CK6 não foi detectada. Na membrana timpânica, todas as células da camada basal foram coradas pelos anticorpos contra a CK5 e a CK14. Em todas as amostras de membrana timpânica, tanto a CK16 quanto a CK17 apresentaram um padrão de expressão homogêneo

em uma ou duas camadas celulares suprabasais do anel, da porção periférica da parte tensa, da parte flácida e da área do umbo, sendo que na região central da parte tensa houve variação da expressão desde um padrão focal a um homogêneo. A CK19 apresentou padrão de expressão irregular nas células basais na área do anel fibrocartilágneo, da parte flácida, da região do umbo e da porção periférica da parte tensa. Na porção central da parte tensa, a CK19 apresentou um padrão similar ao da CK16 e da CK17.

Com o intuito de avaliar a migração epitelial da epiderme do meato acústico externo, KAKOI et al (4) (1997) analisaram em amostras de pele de membrana timpânica e de meato acústico externo a expressão do Ki-67, antígeno nuclear e nucleolar fortemente associado à proliferação celular, e do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), antígeno encontrado em células que estão em divisão. Não houve diferença significativa nos padrões de distribuição dos núcleos marcados entre o PCNA e o Ki-67. Na parte tensa foi demonstrada imunorreatividade para ambos os antígenos no núcleo das células epidérmicas tanto próximo ao umbo, em sua maioria nas células basais, quanto na região do anel fibrocartilágneo. Ao contrário do umbo, nas diferentes áreas do anel houve uma significativa variação tanto no número dos núcleos imunorreativos quanto nos padrões de distribuição. Nos quadrantes inferiores da membrana timpânica, núcleos com positividade foram mais numerosos e difusos no anel, diminuindo cranialmente. Na epiderme do MAE foram encontradas várias células marcadas, tendo ocorrido em maior quantidade na parte inferior da região do anel.

SANJUAN et al (5) (2007), com o objetivo de analisar se as características dos queratinócitos da epiderme retroauricular e do meato acústico externo se mantêm antes e após sua cultura, pesquisaram por imunohistoquímica a expressão de várias citoqueratinas no epitélio do meato acústico externo normal, na pele retroauricular e nas células dessas regiões obtidas por cultura. A epiderme do MAE mostrou expressão homogênea da CK5 na camada basal e da CK10 nas camadas suprabasais. Não foi encontrada expressão da CK16 em nenhuma das amostras. As células obtidas por cultura apresentaram praticamente o mesmo padrão de expressão das citoqueratinas o que mostra que as características do citoesqueleto dos queratinócitos da pele do meato e retroauricular após cultura são mantidas.

Estudos que correlacionam a epiderme do meato acústico externo com o colesteatoma

Em todos os trabalhos nos quais foi realizada a análise imunohistoquímica do epitélio do meato acústico

externo como controle, a doença estudada foi o colesteatoma, tanto de orelha média como de orelha externa.

TAKAHASHI, NAKANO (6) (1989) pesquisaram a localização das células de Langerhans na epiderme do meato acústico externo, na membrana timpânica e no colesteatoma de orelha média com o uso de métodos imunohistoquímicos. Para esta pesquisa foi utilizado o anticorpo anti-S100, que identifica a proteína S-100, uma proteína presente nas células derivadas da crista neural que se revelou um importante marcador das células de Langerhans epidérmicas. Poucas células foram encontradas dispersas na epiderme normal do meato acústico externo e da membrana timpânica, apenas na camada espinhosa. Um número consideravelmente maior de células de Langerhans reativas para proteína S-100 foi identificado nas amostras de colesteatoma, principalmente nos casos com otorrêia. Elas estavam presentes não somente na camada espinhosa como também na região subepitelial.

VAN BLITTERSWIJK et al (7) (1989) estudaram por métodos imunohistoquímicos os padrões de expressão de citoqueratinas em cinco amostras de epitélio do meato acústico externo e da orelha média além de sete amostras de colesteatoma obtidas de pacientes submetidos a cirurgia de orelha média. Na epiderme do meato acústico externo foram encontradas reações positivas para CK10 nas camadas suprabasais. Ao contrário das amostras de colesteatoma, não foram observados focos de CK 4, 8, 18 e 19.

BROEKAERT et al (8) (1992) estudaram a expressão das citoqueratinas 4, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18 e 19 por meio da imunohistoquímica na epiderme do meato acústico externo, membrana timpânica, mucosa da orelha média e no epitélio de colesteatomas congênitos e adquiridos. Todas as amostras apresentam expressão das CK 5 e 14 na camada basal e da CK 10 nas camadas suprabasais. Na região do anel fibrocartilágneo, bem como na região justatimpânica do MAE, houve expressão da CK 16 nas camadas suprabasais e da CK 19 na camada basal sendo esta última mais observada mais inferiormente. O epitélio do colesteatoma, tanto adquirido quanto o congênito, apresentou localização semelhante das citoqueratinas, porém com maior positividade.

SCHILLING et al (9) (1992) investigaram por métodos imunohistoquímicos a distribuição de duas espécies moleculares da interleucina 1 (IL-1), a IL-1- α e a IL-1- β , na epiderme normal do meato acústico externo, no epitélio hiperproliferativo do colesteatoma da orelha média e na pele da região retroauricular. A IL-1 é uma citocina que age como fator de crescimento autócrino para queratinócitos normais e é capaz de produzir erosão óssea. Tanto a

epiderme do meato acústico externo quanto a epiderme retroauricular mostraram positividade para IL-1- α e IL-1- β em similar intensidade em todas as camadas da epiderme. Quando comparada a expressão das IL-1 no epitélio do MAE e do colesteatoma, observou-se uma intensidade mais forte de reação neste último, em todas as camadas do epitélio.

SASAKY, HUANG (10) (1994) examinaram a expressão das citoqueratinas 13 e 16 no epitélio da pele do meato acústico externo, da membrana timpânica e do colesteatoma de orelha média por meio de imunofluorescência. Para a realização da imunohistoquímica foram utilizados dois anticorpos monoclonais: o anticorpo K8.12 para identificar ambas as citoqueratinas e o KS-1A3 apenas para a CK13. Neste estudo, a epiderme do MAE e da membrana timpânica foram coradas pelo anticorpo K8.12 nas camadas suprabasais mas não pelo anticorpo KS-1A3, sugerindo a presença de CK16 nesta camada. No colesteatoma foi encontrado o mesmo padrão nas camadas suprabasais além da expressão da CK13 na camada basal.

LEE et al (11) (1994) estudaram os padrões de expressão das citoqueratinas em amostras de pele do meato acústico externo e de colesteatoma de orelha média obtidas por cultura de tecidos. Para a avaliação imunohistoquímica, as amostras foram avaliadas com o uso de anticorpos monoclonais para CK4, CK5 + CK8, CK7, CK8, CK10, CK13, CK14, CK18 e CK19. Os anticorpos específicos para as citoqueratinas 14 e 19 (presentes normalmente tanto em epitélios simples quanto em estratificados) coraram consistentemente e com a mesma intensidade ambos os tecidos, tendo o primeiro corado as células das camadas basal e suprabasal e o segundo apenas as da camada suprabasal. Já os anticorpos específicos para as citoqueratinas 4, 10 e 13 (presentes normalmente nas camadas suprabasais dos epitélios estratificados) coraram ambos os epitélios com reação mais consistente dos dois primeiros e mais fraca do último.

SCHILLING et al (12) (1996), com o objetivo de esclarecer os mecanismos de proliferação do epitélio do colesteatoma, estudaram a expressão de tenascina e do Ki-67 em amostras de pele do meato acústico externo e de colesteatoma de orelha média. A tenascina é uma glicoproteína adesiva da matriz extracelular expressa em interações epitélio-mesenquimais durante a embriogênese. Os padrões de coloração obtidos com os anticorpos monoclonais contra a tenascina foram correlacionados com o grau de proliferação celular, detectado pelo anticorpo monoclonal MIB-1 (Ki-67). Na epiderme do meato acústico externo houve expressão da tenascina e do MIB-1. Este último apresentou uma reação mais forte com padrão de coloração quase contínuo com a parte superior da derme, com reação positiva mais pronunciada nas camadas

epidérmicas. No colesteatoma uma intensa expressão da tenascina foi encontrada formando uma banda contínua na junção epitélio-subepitélio estendendo-se até as regiões mais profundas do tecido conjuntivo subepitelial. A reatividade ao MIB-1 foi observada não só nas camadas basal e suprabasal do epitélio do colesteatoma como também em alguns histiócitos e fibroblastos do estroma.

BUIJA et al (13) (1997) examinaram a expressão do receptor tipo II da Interleucina-1 (IL-1-R-II) em 10 amostras de pele normal do meato acústico externo e 20 de colesteatoma de orelha média obtidos durante cirurgia. Para sua identificação foram utilizados anticorpos monoclonais anti-IL-1-R-II humano. Na epiderme do meato acústico externo, o IL-1-R-II foi encontrado nos queratinócitos das camadas basal e suprabasal, com distribuição homogênea. Nas amostras de colesteatoma a localização epitelial do receptor foi similar à da pele do meato, porém com positividade três vezes maior. Os autores sugerem que a presença da IL-1- α no epitélio do colesteatoma associada à expressão do IL-1-R-II indica que existe um sistema de estimulação autócrina dos queratinócitos do colesteatoma pela IL-1.

CHUNG, YOON (14) (1998) pesquisaram a presença de citoqueratinas em cultura de amostras de epitélio normal do meato acústico externo e de colesteatoma de orelha média com uso de métodos imunohistoquímicos, e pesquisaram também a diferença da produção das IL-1- α , IL-1- β e IL-8 entre os dois tecidos por meio do método de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). As 14 amostras de pele de MAE e de colesteatoma utilizadas neste estudo foram obtidas durante cirurgia de orelha média. Para pesquisa das citoqueratinas foram usados anticorpos monoclonais anti-CK (AE1/AE3). Tanto o epitélio do MAE como o do colesteatoma foram imunorreativos ao AE1/AE3, mas não foi especificada a localização das camadas celulares positivas neste trabalho. Houve uma grande diferença na concentração das IL-1- α , IL-1- β e IL-8 em todos os cortes. A IL-1- α teve positividade aproximadamente 2,5 vezes maior no colesteatoma em relação à epiderme do meato acústico externo. A IL-1- β teve positividade aproximadamente duas vezes maior no colesteatoma. A IL-8 teve positividade aproximadamente três vezes maior no colesteatoma. Os autores sugeriram que a IL-1- α e a IL-8 presentes no epitélio do colesteatoma são responsáveis pela destruição óssea causada por essa doença, e que certas substâncias originadas do tecido de granulação subepitelial podem estimular a produção destas interleucinas pelo colesteatoma.

KOJIMA et al (15) (1998) utilizaram métodos imunohistoquímicos para comparar o padrão de proliferação e de morte das células apoptóticas da pele do meato acústico externo e do colesteatoma de orelha média. Um

sistema de detecção da apoptose *in situ* foi utilizado para detectar o DNA genômico marcado com digoxigenina nas células apoptóticas. Células positivas para o PCNA foram encontradas nas camadas espinhosa e granulosa em todas as amostras de colesteatoma. Entretanto, nas amostras de pele do MAE, as células positivas para o PCNA foram observadas apenas nas camadas basal e suprabasais. Além disto, a análise quantitativa demonstrou uma maior taxa de proliferação nas células epiteliais do colesteatoma. As análises mostraram diferença estatisticamente significativa no aumento da taxa de proliferação celular na matriz do colesteatoma quando comparada com a epiderme do meato acústico externo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no índice apoptótico entre a pele normal do meato acústico externo e o tecido do colesteatoma, tendo sido encontradas células apoptóticas nas camadas basal, espinhosa e granulosa em ambas regiões.

TANAKA et al (16) (1998), ainda com o objetivo de comparar a capacidade de proliferação epidérmica da epiderme normal do meato acústico externo e do epitélio do colesteatoma de orelha média, publicaram um estudo utilizando anticorpos anti-PCNA e investigaram também a localização do RNA mensageiro do fator transformador do crescimento alfa (TGF- α) pelo método da hibridização *in situ*. Para estimar o efeito do TGF- α na proliferação epidérmica, os autores compararam a localização deste fator e do PCNA na mesma amostra. As células positivas para o PCNA foram encontradas apenas em pequena quantidade, restritas às camadas basais da epiderme do meato. Já no colesteatoma, estas células positivas foram encontradas não só na camada basal como também nas camadas suprabasais mais superiores, com uma diferença estatisticamente significativa. No que diz respeito ao TGF- α , sua presença foi detectada em menor intensidade na epiderme do meato quando comparada ao colesteatoma, principalmente nas camadas granulosa e espinhosa. Algumas amostras de colesteatoma apresentaram expressão do TGF- α em todas as camadas epiteliais.

KIM, CHUNG (17) (1999) pesquisaram a distribuição de citoqueratinas e de padrões de ligação da lecitina em amostras de pele do meato acústico externo, mucosa da orelha média e de colesteatomas de MAE induzidos em gerbils (esquilos da Mongólia), com o objetivo de mostrar as mudanças biológicas e morfológicas que ocorrem nos colesteatomas. Lecitinas são glicoproteínas de origem não-imune que têm um importante papel na diferenciação e maturação celular, podendo aglutinar células e precipitar glicoconjugados. Para identificação das citoqueratinas, foram utilizados anticorpos anti-citoqueratina 4, 8, 10, 13, 17, 18, 19 e o K8.12 (anti-citoqueratina 13 e 16). Para identificação dos padrões de ligação da lecitina, foram usadas as lecitinas concanavalina A (ConA), aglutinina do germe do

trigo (WGA), aglutinina de *Ricinus communis* (RCA), aglutinina de soja (SBA), aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA), aglutinina de *Ulex europaeus* (UEA) e aglutinina do amendoim (PNA). Quanto às citoqueratinas, as células epidérmicas do MAE foram coradas positivamente apenas para CK4, CK10 e CK13/CK16 na camada suprabasal. A distribuição das citoqueratinas no colesteatoma do meato foi similar àquela na epiderme do meato acústico externo, mas diferente da distribuição na mucosa da orelha média. Quanto aos padrões de ligação das lecitinas, as células da epiderme do MAE foram coradas em todas as camadas fortemente com ConA e WGA e fracamente com RCA e DBA. A SBA corou fracamente a camada córnea e as lecitinas UEA e PNA coraram as camadas suprabasais da mesma forma. No colesteatoma houve algumas diferenças. UEA e PNA coraram as células basais e RCA e DBA, este último mais raramente, coraram apenas as células suprabasais. Os autores sugerem com este estudo que o colesteatoma de MAE pode se originar da pele do meato acústico externo e que o seu epitélio tem uma natureza biológica diferente daquela das células epiteliais normais, principalmente na camada basal.

TOMITA (18) (2000), em sua tese de doutorado, estudou a relação entre o p53 (supressor tumoral), bax (proteína que promove a morte celular) e bcl-2 (inibidor da apoptose), além da expressão do PCNA, em 19 amostras de colesteatoma e 5 amostras de epiderme de meato acústico externo e pele retroauricular com a utilização de métodos imunohistoquímicos. A análise dos resultados mostrou positividade para o p53 na camada basal e, raramente, na camada espinhosa nos fragmentos da matriz do colesteatoma. O PCNA foi encontrado nas camadas basal, espinhosa e granulosa. A proteína bax foi detectada nas camadas espinhosa e granulosa, porém a proteína bcl-2 não foi expressa pelos queratinócitos da matriz do colesteatoma. Na epiderme do MAE e pele retroauricular o PCNA foi detectado em algumas células da camada basal e, raramente, em alguns queratinócitos da camada espinhosa. Não foi observada reatividade para o p53 e bcl-2. A proteína bax foi observada em algumas células da camada espinhosa. A diferença entre o colesteatoma e a epiderme do meato acústico externo só foi estatisticamente significativa em relação ao p53, que mostrou-se elevado nos fragmentos de colesteatoma. Em relação ao PCNA não houve diferença estatisticamente significativa entre a matriz do colesteatoma e a epiderme do meato acústico externo.

BAYAZIT et al (19) (2001) investigaram a presença da proteína P27 em 18 amostras de pele do meato acústico externo e 15 amostras de colesteatoma de orelha média para verificar sua relação com o estado hiperproliferativo que acompanha esta doença. As proteínas quinases inibidoras dependentes da ciclina, como por exemplo a P27, têm a

propriedade de impedir o ciclo celular, agindo como um gene supressor tumoral ao regular a passagem da fase G1 para a fase S da divisão celular. Para esta investigação, as amostras foram avaliadas com anticorpos monoclonais para P27 (M 7203). Foi demonstrada a presença da P27 apenas na camada granulosa em 50% das amostras de pele do MAE e em 13,3% das amostras de colesteatoma. Os autores concluem com este estudo que a perda do controle do ciclo celular no colesteatoma, demonstrada pela diminuição da expressão da P27, pode estar relacionada ao estado hiperproliferativo desta doença.

ADAMCZYK et al (20) (2003) analisaram por meio de métodos imunohistoquímicos a presença de marcadores de proliferação tecidual em sete amostras de pele normal de meato acústico externo e 15 amostras de colesteatoma de meato obtidas durante cirurgia de orelha média, com o objetivo de analisar o seu comportamento biológico. Para esta pesquisa, foram utilizados anticorpos monoclonais contra partes recombinantes do Ki-67 (MIB 1), contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e contra o TGF- α . Nas amostras de pele de meato acústico externo normal, foi demonstrada reação positiva para o anticorpo monoclonal MIB 1, principalmente nos queratinócitos da camada basal. As amostras de colesteatoma do meato acústico externo também apresentaram reação positiva para este anticorpo, porém de forma heterogênea, demonstrando que na mesma amostra há áreas com padrões de proliferação epitelial diferentes. Houve reação nos queratinócitos da camada basal da epiderme do MAE tanto para o EGFR, na membrana plasmática, quanto para o TGF- α , no citoplasma. Nas amostras de colesteatoma a expressão destes antígenos foi observada nas camadas basal e suprabasais, com uma coloração mais forte do que nas amostras de pele do MAE normal. Os autores sugerem com estes resultados que, assim como no colesteatoma de orelha média, um processo inflamatório crônico ocorre no colesteatoma de meato acústico externo e este estímulo inflamatório pode alterar a proliferação dos queratinócitos.

NAIM et al (21) (2003) avaliaram a expressão de beta-catenina em amostras de pele normal de meato acústico externo e de colesteatoma de meato acústico externo. O complexo e-caderina beta-catenina participa da modulação das junções de adesão intercelular, cujos desarranjos e reformulações são essenciais para o mecanismo de migração epitelial da pele do meato acústico externo, contribuindo para a sua integridade. Foi identificada imunorreatividade para beta-catenina em todas as camadas epiteliais na pele normal do meato acústico externo enquanto no colesteatoma de meato acústico externo houve positividade apenas na camada basal da matriz do colesteatoma.

NAIM et al (22) (2004) analisaram a integridade da estrutura tecidual com a caracterização do equilíbrio entre

metaloproteinases da matriz (MMP-2 e MMP-9) e a beta-catenina em amostras de pele de meato acústico externo normal e de colesteatoma de meato acústico externo. As metaloproteinases da matriz funcionam como um aparato destrutivo ósseo na matriz extracelular do colesteatoma, promovendo uma remodelação dos tecidos adjacentes. Nas amostras de pele normal do MAE a beta-catenina apresentou um padrão de marcação homogêneo, com expressão em todas as camadas celulares deste epitélio. Em todas as amostras de colesteatoma de meato acústico externo foi observada expressão de beta-catenina nas membranas celulares, principalmente na camada basal. Os debris de queratina não mostraram expressão deste antígeno. Foi detectada a expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 nas camadas basal e suprabasal tanto nas amostras de pele normal do meato acústico externo quanto nas de colesteatoma de meato, com reação mais forte nestas últimas.

RAYNOV et al (23) (2005) estudaram os padrões de expressão de Ki-67 para compará-los em amostras de pele do meato acústico externo, pele retroauricular e em amostras de colesteatoma de orelha média. Foram utilizados anticorpos monoclonais MIB-1 contra Ki-67 e a análise foi feita por imunofluorescência. Na epiderme do MAE, a positividade nuclear ficou restrita às células da camada basal do epitélio escamoso. Escassa positividade foi observada também na camada epitelial basal da pele retroauricular. Foi demonstrada forte positividade nuclear para o MIB-1 nas camadas basais e suprabasais do colesteatoma. Com este estudo os autores sugerem que a utilização do anticorpo recombinante MIB-1 no diagnóstico histopatológico do colesteatoma de orelha média pode ser uma ferramenta confiável e de baixo custo para avaliação da sua capacidade de proliferação celular.

HWANG et al (24) (2006) avaliaram pela primeira vez a expressão do receptor gama ativado por proliferador da peroxissoma (PPAR gama) e de Ki-67. A pesquisa foi realizada por meio de métodos imunohistoquímicos e por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR). Os PPAR gama pertencem a uma subfamília de receptores nucleares de hormônios que estão relacionados com a limitação da proliferação e com a promoção da diferenciação de vários tipos celulares malignos e benignos. A proteína PPAR gama foi expressa no núcleo das células principalmente das camadas granulosa e espinhosa, tendo ocorrido de forma escassa nas amostras de pele do MAE e mais fortemente na amostras de colesteatoma. Houve expressão do Ki-67 no núcleo das células das camadas basal e suprabasal tanto na pele do meato acústico externo quanto no epitélio do colesteatoma, porém com maior positividade neste último. Com este estudo, os autores concluem que o PPAR gama pode ter um importante papel na patogênese do colesteatoma, demonstran-

do que suas células epiteliais retêm a capacidade de diferenciação e que a elevada expressão do Ki-67 reflete o estado hiperproliferativo do colesteatoma.

NAIM et al (25) (2006) investigaram pela primeira vez a expressão da proteína S100A1 em amostras de pele normal de meato acústico externo e de colesteatoma de meato acústico externo obtidas de 17 pacientes. O aumento da expressão desta proteína em diferentes tecidos está relacionado com a hiperplasia. Na epiderme normal do MAE foi observada a expressão da proteína S100A1 na camada basal do epitélio, predominantemente no citoplasma das células, com gradual diminuição da positividade em direção às camadas mais superficiais. No colesteatoma do meato acústico externo houve expressão mais homogênea da proteína S100A1 que foi detectada em todas as camadas epiteliais.

Estudos imunohistoquímicos sobre a epiderme do meato acústico externo alterado

KAMIYA et al (26) (1999) relataram um caso de carcinoma de células escamosas pigmentado com colonização de melanócitos dendríticos de meato acústico externo que foi diagnosticado por métodos imunohistoquímicos. Este tipo de carcinoma é uma neoplasia rara cuja localização já foi descrita nas tonsilas, mucosa oral e córnea. Para esta avaliação foram utilizados anticorpos contra citoqueratina (AE1/AE3), vimentina, proteína S100, HMB-45 (antígeno citoplasmático relacionado ao melanossoma) e CD-68 (clone Ki-M1P). Houve positividade apenas para citoqueratina nas células tumorais e para proteína S100 e HMB-45 nas células dendríticas pigmentadas.

KONISHI et al (27) (2003) relataram um caso de ceratose seborréica irritativa de meato acústico externo, doença que usualmente ocorre nesta região, e realizaram análise imunohistoquímica da amostra obtida por biópsia para pesquisa dos antígenos Ki-67 e p53, já que esta lesão pode mimetizar histologicamente um carcinoma de células escamosas. Foi pesquisada também a presença do papiloma vírus humano (HPV) nas amostras. Foram utilizados anticorpos contra oncoproteína p53 (DO-7), Ki-67 (MM1) e anticorpos policlonais contra antígenos estruturais específicos para genes do papilomavírus. Reatividade tanto para p53 quanto para Ki-67 foi evidenciada no núcleo das células da região parabasal. Não foram encontrados antígenos do HPV nas amostras estudadas.

RIBEIRO et al (28) (2004) realizaram um estudo comparativo da expressão da CK16 e do Ki-67 por métodos imunohistoquímicos em amostras de colesteatoma de meato acústico externo com amostras de colesteatoma de

orelha média já analisadas previamente. A imunexpressão destes antígenos foi similar entre as amostras estudadas. A CK16 foi observada com forte reação nas camadas suprabasais da matriz do colesteatoma, tanto da orelha média quanto do MAE. O Ki-67 foi demonstrado em quase todas as células basais e em várias células das camadas suprabasais, comportamento idêntico ao das amostras de colesteatoma de orelha média. Com esse estudo os autores concluem que o epitélio do colesteatoma do MAE apresenta as mesmas características imunohistoquímicas do colesteatoma adquirido da orelha média, com a presença da CK16 e do antígeno nuclear Ki-67 nas camadas suprabasais, achados típicos de epitélios hiperproliferativos.

THOMPSON et al (29) (2004) realizaram um estudo clínico-patológico de 41 casos de adenoma ceruminoso. As células ductais das glândulas ceruminosas foram forte e difusamente reativas para CK7 e fracamente reativas ao CD117. A maioria das células teve reatividade fraca com um padrão focal para o antígeno epitelial de membrana (EMA). As células mioepiteliais basais das glândulas ceruminosas foram forte e difusamente reativas à proteína S100 tanto no núcleo quanto no citoplasma, ao anticorpo para citoqueratinas 5/6 apenas no citoplasma e ao p63 apenas no núcleo. Ki-67 e p53 foram identificados no núcleo das células das amostras sendo o primeiro de identificação mais rara (5% dos núcleos). A CK20 não foi observada nas amostras pesquisadas.

NAIM et al (30) (2005) estudaram novamente o colesteatoma de meato acústico externo com o intuito de analisar a expressão da beta-catenina quando em associação com o fator transformador do crescimento beta 1 (TGF- β 1). Para isso, após a realização de cultura de células de amostras do colesteatoma de MAE obtidas de cinco pacientes, com e sem adição de TGF- β 1, foi pesquisada a expressão da beta-catenina com uso do anticorpo monoclonal anti-beta-catenina humana (C19220). A expressão da beta-catenina foi observada na membrana das células do colesteatoma de meato acústico externo que foram tratadas com TGF- β 1. Nas culturas onde não foi utilizado TGF- β 1 não foi encontrada expressão da beta-catenina. Não foi observada diferença de proliferação entre as células tratadas e as não tratadas.

SAUTER et al (31) (2007) pesquisaram a expressão da beta-catenina e do Ki-67 em culturas de células de colesteatoma de meato acústico externo como a adição de sulindaco sulfona em diferentes concentrações. O sulindaco sulfona é uma droga antineoplásica apoptótica seletiva e tem sido utilizada de forma promissora para o tratamento de doenças caracterizadas pelo crescimento tecidual descontrolado, como o câncer. No epitélio obtido após a cultura celular das amostras de colesteatoma do MAE foi observado que, com o aumento do tempo de exposição ao

sulindaco sulfona, a positividade tanto para beta-catenina quanto para Ki-67 diminuiu. Ou seja, segundo os autores, há uma diminuição da tanto integridade tecidual, pela diminuição da adesividade intercelular promovida pela beta-catenina, quanto do índice de proliferação celular, sugerido pela diminuição do Ki-67.

DISCUSSÃO

A tecnologia dos métodos imunohistoquímicos se desenvolveu de forma considerável desde sua introdução, no início da década de 1940. Atualmente, a imunohistoquímica tem se mostrado um método eficiente para diagnóstico e prognóstico de várias afecções que acometem os mais diversos órgãos e tecidos, incluindo a epiderme do meato acústico externo. Existem outros métodos que podem ser utilizados para pesquisa de antígenos epiteliais como ELISA, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e hibridização *in situ*, porém a imunohistoquímica foi escolhida devido a este ser o método mais eficaz para definir a localização exata dos antígenos nos tecidos, como pode ser comprovado por inúmeras publicações em periódicos de alto impacto.

Após a busca nas bases de dados eletrônicas com a combinação das palavras-chave escolhidas *immunohistochemistry* e *external auditory canal* (Quadro 1) e seus correspondentes em português (Quadro 2), foram identificados um total de 142 artigos.

Vários antígenos foram pesquisados por meio de métodos imunohistoquímicos dentre os artigos analisados. Os mais estudados foram as citoqueratinas (CK), Ki-67, beta-catenina, interleucinas e o PCNA.

Dentre todos os artigos incluídos neste estudo, poucos foram publicados com objetivo único de analisar por imunohistoquímica a epiderme do meato acústico externo normal. Em sua maioria, os estudos que pesquisaram o MAE normal, o utilizaram apenas como amostra controle para avaliação da imunoexpressão de antígenos no colesteatoma, seja ele de orelha média ou externa (Tabela 1). Quanto aos desenhos dos estudos, a maioria dos artigos incluídos foram estudos transversais com uma menor quantidade de pesquisas experimentais (Tabela 2). Nos seis artigos exclusivamente sobre pele do MAE normal foram analisadas a expressão do Ki-67, vimentina, PCNA, IgA, IgG, IgM e várias citoqueratinas.

Alguns autores publicaram mais de um trabalho em áreas específicas deste tema. O autor que mais publicou artigos foi Naim, R, com sete artigos sobre análise imunohistoquímica do colesteatoma de meato acústico externo (Quadro 3).

Quadro 1: Artigos identificados após busca nas bases de dados eletrônicas com palavras-chave em inglês.

	IMH	EAC	IMH + EAC
PubMed (Medline)	405.268	4148	91
OVID	205.509	1565	48
CCTR	808	37	0
LILACS	945	73	0
SciELO	290	15	0

Legenda: PubMed: base de dados para pesquisa da Medline; Medline: Medical Literature Analysis and Retrieval System Online; Ovid: Ovid Technologies; IMH: imunohistochemistry; EAC: external auditory canal; CCTR: Revisões Sistemáticas da Colaboração Chocrane; LILACS: Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde Literatura Internacional das Américas e do Caribe; SciELO: Scientific Eletronic Library Online.

Quadro 2: Artigos identificados após busca nas bases de dados eletrônicas com palavras-chave em português.

	IMH	MAE	IMH + MAE
RBORL	33	86	3
AIO	6	40	0
CAPES	1273	53	0

Legenda: IMH: imunohistoquímica; MAE: meato acústico externo; RBORL: Revista Brasileira de Otorrinolaringologia; AIO: Arquivos Internacionais em Otorrinolaringologia; CAPES: Banco de Teses da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Tabela 1. Artigos sobre a epiderme do meato acústico externo normal.

	Número de artigos	%
Exclusivos sobre a epiderme do MAE	6	17,65
Epiderme do MAE como controle	28	82,35
Total	34	100,00

Tabela 2. Tipos de desenhos de estudo aplicados nas pesquisas incluídas.

Desenho do estudo	Número de estudos incluídos	%
Estudo transversal	36	83,72
Pesquisa experimental	5	11,63
Relato de caso	2	4,65
Total	43	100,00

As citoqueratinas foram de longe os antígenos mais pesquisados nos estudos incluídos (Quadros 4 e 5). As citoqueratinas, um complexo de 20 polipeptídeos, são filamentos intermediários que compõem o citoesqueleto

Quadro 3. Autores que mais publicaram artigos sobre análise imunohistoquímica do meato acústico externo normal e alterado e o impacto dos periódicos internacionais.

Autor	Nº de artigos	Desenho dos estudos	Qualis Internacional do periódico	Origem das amostras	Antígenos
Naim, R	7 [#]	Estudos transversais (6) Pesquisa experimental (1)	Qualis A (4 artigos) Qualis B (2 artigos) Qualis C (1 artigo)	Pele do MAE e Colesteatoma de MAE	CK, beta-catenina, MMP-2, MMP-9, SI00A1, c-met, caspase 3, fas, fatores angiogênicos, HSF/SF
Broekaert, D	3 [¢]	Estudos transversais (2) Pesquisa experimental (1)	Qualis B (1 artigo) Qualis C (2 artigos)	Pele do MAE Colesteatoma de orelha média	CK
Bujía, J	3 [*]	Estudos transversais	Qualis B (1 artigo) Qualis C (2 artigos)	Pele do MAE Colesteatoma de orelha média	IL-1-R-II, oncogene c-myc, IL-1- α e IL-1- β
Chung, JW	2 [§]	Estudos transversais	Qualis B	Pele do MAE Colesteatoma de orelha média	IL-1- α , IL-1- β , IL-8, CK e lecitinas
Lepercque, S	2 [§]	Estudo transversal (1) Pesquisa experimental (1)	Qualis C		CK
Kojima, H Tanaka, Y	2 [¶]	Estudos transversais	Qualis A	Pele do MAE Colesteatoma de orelha média	PCNA, TGF- α
Raynov, AM	2	Estudos transversais	Qualis B	Pele do MAE e retroauricular Colesteatoma de orelha média	Ki-67, EGR, PGR
Schilling, V	2	Estudos transversais	Qualis B	Pele do MAE Colesteatoma de orelha média	IL-1- α , IL-1- β , tenascina

Legenda: CK: Citoqueratina; MMP: Metaloproteinase da matriz; HSF/SF: Fator de crescimento do hepatócito; IL-1-R-II: Receptor tipo II da Interleucina 1; IL: Interleucina; PCNA: Antígeno nuclear de proliferação nuclear; TGF- α : Fator transformador do crescimento alfa; EGR: Receptor do estrogênio; PGR: Receptor da progesterona.

[#] Seis artigos como autor e um como co-autor.

[¢] Dois artigos como autor e um como co-autor.

^{*} Um artigo como autor e dois outros artigos como co-autor.

[§] Um artigo como autor e outro como co-autor.

[¶] Cada um desses dois autores publicou um artigo tendo o outro com co-autor, junto a outros co-autores.

das células epiteliais. Estes filamentos são divididos de acordo com seu peso molecular e seu ponto isoelétrico em duas subfamílias: as básicas e as ácidas. Elas são distribuídas geralmente aos pares em certas combinações dependendo do tipo de epitélio (simples, estratificado ou epitélio transicional), do potencial e do estado relativo de diferenciação dos queratinócitos, da capacidade proliferativa, bem como a localização e as condições ambientais de crescimento. Por exemplo, a CK16 é encontrada em tecidos em estágio de hiperproliferação, como em áreas cicatríciais, na

epiderme normal em zonas submetidas a pressão e atrito (planta dos pés, polpa digital e calcanhar) e no epitélio de revestimento dos folículos pilosos, em doenças epidérmicas hiperproliferativas benignas como verruga vulgar, psoríase, queratose actínica e dermatite seborréica e em doenças malignas como o carcinoma espinocelular (RIBEIRO, 2004).

As citoqueratinas, apesar de serem as mais frequentemente estudadas, foram pesquisadas exclusivamente na epiderme do meato acústico externo normal apenas por

Quadro 4. Citoqueratinas pesquisadas exclusivamente na epiderme do meato acústico externo normal.

Ano	Autor	CK pesquisadas
1993	BROEKAERT, BOEDTS	4, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18 e 19
1993	LEPERCQUE et al	4, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18 e 19
1996	VENNIX et al	5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 18 e 19
2007	SANJUAN et al	5, 10, 16, 17 e 19

Quadro 5. Citoqueratinas pesquisadas na epiderme do meato acústico externo normal em relação ao colesteatoma.

Ano	Autor	CK pesquisadas
1989	VAN BLITTERSWIJK et al	4, 8, 10, 18 e 19
1992	BROEKAERT et al	4, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18 e 19
1994	SASAKI, HUANG	13 e 16
1994	LEE et al	4, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 18 e 19
1998	CHUNG, YOON	Inespecífica
1999	KIM, CHUNG	4, 8, 10, 13, 16, 17, 18 e 19

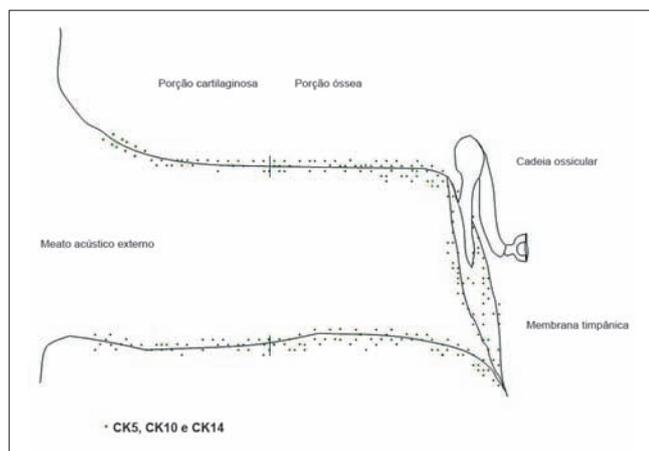


Figura 1. Distribuição das CK5, CK10 e CK14 no meato acústico externo - Baseada nos artigos de BROEKAERT, BOEDTS (1993), LEPERCQUE et al (1993) e VENNIX et al (1996).

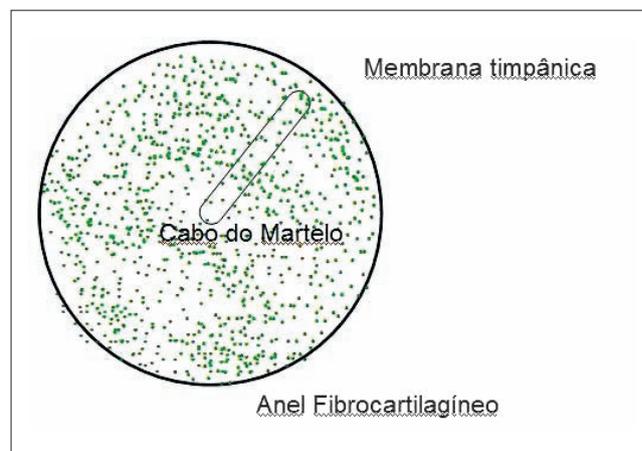


Figura 2. Distribuição das CK5, CK10 e CK14 na membrana timpânica - Baseada nos artigos de BROEKAERT, BOEDTS (1993), LEPERCQUE et al (1993) e VENNIX et al (1996).

BROEKAERT, BOEDTS (1993), LEPERCQUE et al (1993), VENNIX et al (1996) e SANJUAN et al (2007), ao contrário dos outros autores que as pesquisaram em doenças das orelhas média e externa, utilizando a epiderme do meato apenas como controle. BROEKAERT, BOEDTS (1993), LEPERCQUE et al (1993) e VENNIX et al (1996) pesquisaram a distribuição das citoqueratinas nas diversas partes do meato acústico externo e na parte externa da membrana timpânica, indicando inclusive em qual camada do epitélio as CK estavam expressas. Como já era de se esperar, os três autores concordaram que não há expressão das CK4 e CK13 em nenhuma região do MAE normal, já que estas são citoqueratinas específicas de epitélios não-queratinizados.

Não foram encontradas também expressão das CK de epitélios simples 7, 8 e 18. Os autores encontraram expressão das CK5, CK10 e CK14 em todo o meato incluindo a membrana timpânica, sendo que BROEKAERT, BOEDTS (1993) e VENNIX et al (1996) especificaram a localização da camada epitelial na qual estas CK foram encontradas. Assim, a CK10 foi observada em todas as células das camadas suprabasais e as CK5 e CK14 nas células da camada basal em todo o meato e membrana timpânica. Estas citoqueratinas estavam presentes também nas camadas suprabasais da porção óssea do meato, do anel fibrocartilágineo, da parte flácida da membrana timpânica e próximo ao cabo do martelo (Figuras 1 e 2).

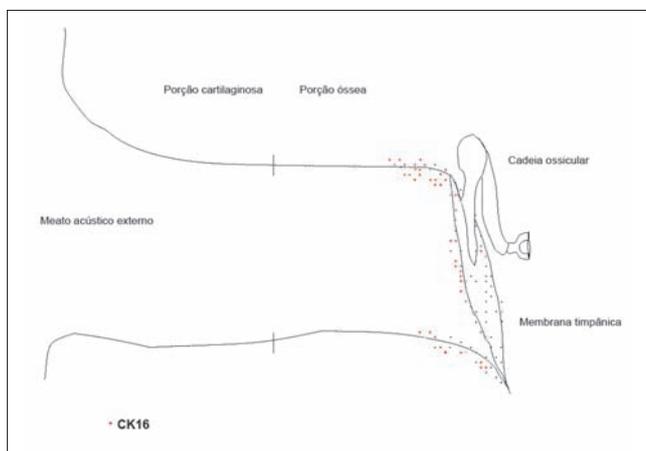


Figura 3. Distribuição da CK16 no meato acústico externo - Baseada nos artigos de BROEKAERT, BOEDTS (1993), LEPERCQUE et al (1993) e VENNIX et al (1996).

Apenas VENNIX et al (1996) pesquisaram CK6 e CK17. A CK6, típica de epitélios com características proliferativas, foi encontrada apenas na porção óssea do meato, nas camadas suprabasais e em alguns locais da camada basal. A CK17 foi encontrada apenas na porção óssea do meato, em células da camada basal. Segundo os três autores, a CK16, também característica de epitélios em estado de hiperproliferação, não foi observada na porção cartilaginosa do meato, tendo sido expressa na região mais medial da porção óssea do meato nas células das camadas suprabasais. Na membrana timpânica, segundo VENNIX et al (1996), esta CK esteve presente nas regiões do anel, parte flácida e cabo do martelo. LEPERCQUE et al (1993) observaram uma diminuição gradual na intensidade de expressão da CK16 em direção centrípeta na membrana. Isto demonstra uma capacidade proliferativa nas camadas suprabasais da epiderme das regiões próximas ao anel fibrocartilágineo (Figuras 3 e 4). A CK19 foi encontrada por Broekaert, Boedts (1993) e LEPERCQUE et al (1993) na região inferior do ânulo timpânico e próximo a este na porção óssea do meato e por VENNIX et al (1996) apenas em alguns aglomerados celulares nesta região. É interessante observar que, na pele normal do restante do corpo, não há imunoexpressão de citoqueratinas características de hiperproliferação celular, como a CK16 e a CK6, a não ser em regiões sujeitas a atrito e pressão e no epitélio dos folículos pilosos. SANJUAN et al (2007) pesquisaram a expressão das citoqueratinas 5, 10, 16, 17 e 19 na epiderme do MAE normal e após cultura da epiderme. Os autores observaram que os padrões de expressão destes filamentos estariam mantidos antes e após a cultura, corroborando inclusive as suas localizações dentre as camadas epidérmicas observadas por LEPERCQUE et al (1993) e VENNIX et al (1996).

As citoqueratinas também foram avaliadas no meato acústico externo em outros seis estudos citados a seguir,

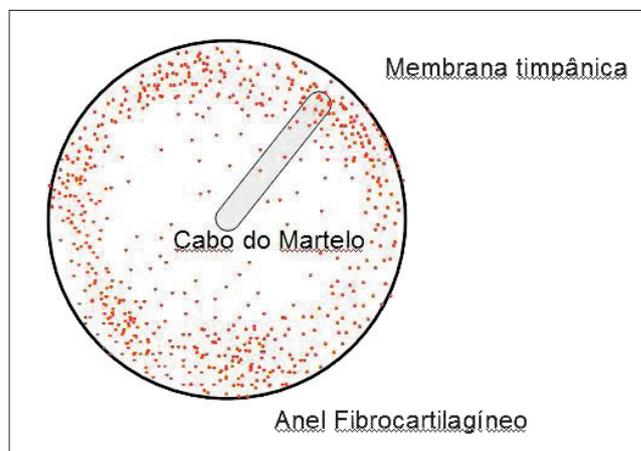


Figura 4. Distribuição da CK16 na membrana timpânica - Baseada nos artigos de BROEKAERT, BOEDTS (1993), LEPERCQUE et al (1993) e VENNIX et al (1996).

nos quais os autores analisaram a sua expressão no epitélio do colesteatoma em relação ao epitélio do meato acústico externo normal, sendo este último apenas como amostra controle. Nestes estudos não houve especificação das regiões do meato de onde as amostras foram obtidas, mas a maioria deles corrobora os achados de BROEKAERT, BOEDTS (1993), LEPERCQUE et al (1993) e VENNIX et al (1996), que parecem ter realizado os principais trabalhos sobre a expressão e a distribuição das CK no meato acústico externo. VAN BLITTERSWIJK et al (1989) concordam sobre os padrões de expressão das citoqueratinas 10, 4, 8 e 18, estando somente a primeira positiva no meato. Na pesquisa destes autores, assim como na de KIM, CHUNG (1999), somente a CK19 apresentou padrão diferente (ausente), porém este fato pode ser explicado devido à região onde as amostras foram obtidas. Segundo LEPERCQUE et al (1993) e VENNIX et al (1996), a CK19 encontra-se expressa na porção óssea do meato acústico externo mais próxima do anel fibrocartilágineo, e estes artigos não explicitaram a especificação do local de obtenção das amostras. BROEKAERT et al (1992) também concordam sobre a positividade das citoqueratinas 5, 10, 14, 16 e 19 e sobre a ausência das citoqueratinas 7, 8 e 18 no MAE e membrana timpânica. SASAKY, HUANG (1994) também observaram expressão da CK16 no meato acústico externo normal. Provavelmente as amostras foram obtidas de regiões mais profundas do meato, já que está bem estabelecido que somente nesta região há expressão desta CK no meato. A CK13 não foi encontrada no epitélio do meato acústico externo normal por aqueles autores, o contrário de LEE et al (1994), que inesperadamente observaram a presença das citoqueratinas 4 e 13 na camada suprabasal do epitélio meatal. Sabe-se que estas citoqueratinas estão presentes apenas em epitélios não-queratinizados. Estes autores encontraram também no MAE normal, agora sim como é de se esperar, imunoexpressão da CK14 na camada basal e suprabasal e as

citoqueratinas 10 e 19 apenas na camada suprabasal, assim como no colesteatoma de orelha média. KIM, CHUNG (1999) pesquisaram a presença de citoqueratinas em animais. Nos gerbils pesquisados, expressão das citoqueratinas 10, 13 e 16 foi parecida com aquela observada em amostras de humanos. Houve diferença somente na expressão de CK4, que esteve presente, e de CK19, que não foi encontrada possivelmente devido ao local de obtenção da amostra.

No meato acústico externo alterado, as citoqueratinas foram pesquisadas com positividade em casos de doenças comuns ao meato, como no carcinoma de células escamosas (CK - inespecífico), por KAMIYA et al (1999), adenoma ceruminoso (CK7), por THOMPSON et al (2004) e de colesteatoma de meato acústico externo (CK16), por RIBEIRO et al (2004).

Vários antígenos relacionados à hiperproliferação celular foram estudados nos trabalhos incluídos. A maioria dos estudos demonstra que há expressão destes antígenos na epiderme do meato acústico externo normal. Entre os estudos que continham a informação do local de obtenção das amostras no meato, alguns dos autores concordam que esses antígenos, assim com as citoqueratinas características de hiperproliferação, têm a sua expressão na porção óssea do MAE, mais precisamente nas regiões próximas do anel fibrocartilágneo, com maior concentração inferiormente. Diante deste fato, é de se questionar se a imunexpressão dos marcadores de hiperproliferação na epiderme da porção óssea do meato acústico externo, próxima do anel fibrocartilágneo, poderia estar relacionada à diferenciada capacidade de neoformação tecidual que ocorre durante a embriogênese do MAE. Além disso, questiona-se também se a manutenção desta capacidade não poderia ter alguma relação com a gênese do colesteatoma.

Dentre os marcadores de hiperproliferação, o mais estudado foi o Ki-67. O marcador Ki-67, antígeno nuclear e nucleolar fortemente relacionado à proliferação celular, foi pesquisado em cinco artigos sobre meato acústico externo normal e em quatro sobre o meato alterado, como será discutido a seguir. Todos os autores encontraram expressão deste marcador tanto no meato acústico externo normal como no alterado. KAKOI et al (1997) observaram a presença do Ki-67 nas células basais da *pars flácida* e da *pars tensa*, tanto na região do anel quanto próximo ao cabo do martelo. Já na epiderme do meato o Ki-67 foi observado principalmente próximo à região anular inferior. Não só no meato acústico externo, mas também na membrana timpânica, a expressão deste marcador coincide com aquela das citoqueratinas 6, 16 e 19 o que sugere ainda mais a peculiar característica proliferativa destas regiões. SCHILLING et al (1996), ADAMCZYK et al (2003), RAYNOV et al (2005B), HWANG et al (2006) observaram forte positividade para o Ki-67 na epiderme do MAE, sem no entanto

especificarem a localização de obtenção das amostras. Este marcador também foi pesquisado em casos de doenças do meato por KONISHI et al (2003), em um caso de ceratose seborréica, por THOMPSON et al (2004), no adenoma ceruminoso e por RIBEIRO et al (2004), no colesteatoma de meato acústico externo. Nestas doenças, de características nitidamente proliferativas, houve positividade em todas as amostras estudadas. Ainda no colesteatoma do MAE, SAUTER et al (2007) pesquisaram a expressão do Ki-67 em amostras antes e após o uso do sulindaco sulfona e observaram uma diminuição da expressão deste marcador conforme aumentava o tempo de exposição à droga.

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), também ligado a estados hiperproliferativos foi estudado em alguns artigos. KAKOI et al (1997), que pesquisaram este antígeno juntamente com o Ki-67, encontraram um padrão semelhante de expressão, tendo o observado predominantemente nas camadas basais das regiões próximas ao anel fibrocartilágneo, incluindo a porção óssea do meato. Há uma diminuição gradativa de sua expressão na membrana timpânica em sentido centrípeto. Até mesmo este padrão de expressão se assemelha àquele da CK16. KOJIMA et al (1998), TANAKA et al (1998) e TOMITA (2000) também encontraram positividade do PCNA na epiderme do MAE, sendo que os primeiros observaram sua expressão na epiderme do meato nas camadas basal e suprabasais, e os dois últimos apenas nas camadas basais. Como em nenhum destes trabalhos houve especificação do exato local de onde as amostras foram obtidas, não é possível afirmar que somente a região próxima do anel possui positividade para o PCNA. É de se esperar que realmente estes antígenos ligados à proliferação celular estejam presentes em maior concentração nas regiões mais próximas do anel fibrocartilágneo, tanto na membrana timpânica quanto no meato acústico externo, já que os estudos levam a crer, haja vista a expressão do Ki-67 e da CK16, que há de fato um maior potencial proliferativo na epiderme destas regiões.

Alguns outros antígenos relacionados à hiperproliferação foram estudados na epiderme do meato acústico externo, porém em apenas um trabalho cada e sem a descrição do local de obtenção das amostras. Eles podem corroborar ainda mais a presença da capacidade hiperproliferativa da epiderme desta região. É o caso da p27 (BAYAZIT et al, 2001) e do PPAR-gama (HWANG et al, 2006), que foram encontrados expressos na epiderme do meato acústico externo normal. A proteína S100A1, relacionada à hiperplasia, também foi observada no meato por NAIM et al (2006).

A beta-catenina participa da modulação das junções de adesão intercelular, cujos desarranjos e reformulações são essenciais para o mecanismo de migração epitelial da pele do meato acústico externo e para a

manutenção de sua integridade. Esta proteína faz parte do sistema de fatores caderina de adesão intercelular e também está diretamente relacionada à prevenção da apoptose. Normalmente a beta-catenina está localizada nas zônulas de aderência celular, porém quando exposta a diferentes estímulos, pode ocorrer sua translocação para o núcleo. Sua dissociação intranuclear permite uma persistente ativação de fatores de crescimento e promove uma diminuição da integridade celular. Sabe-se que a diminuição da expressão da beta-catenina está diretamente relacionada ao aumento da capacidade de invasão tumoral. NAIM et al (2003, 2004B, 2005A) e SAUTER et al (2007) foram os únicos autores a pesquisarem a expressão desta proteína. Em duas das pesquisas feitas por NAIM et al (2003, 2004B), a beta-catenina foi analisada em colesteatomas de meato acústico externo em relação à pele do meato normal. Os autores observaram a imunexpressão da beta-catenina em todas as camadas da epiderme do MAE com um padrão homogêneo, enquanto no colesteatoma do meato acústico externo, esta proteína foi encontrada apenas na camada basal. Nos debris de queratina não foi observada expressão da beta-catenina. NAIM et al (2005A) também observaram uma diminuição da expressão da beta-catenina em amostras de colesteatoma do MAE quando em associação ao fator transformador do crescimento beta (TGF- β). A correlação entre este antígeno e os outros já descritos neste trabalho fica prejudicada devido a não especificação dos locais de obtenção das amostras. Porém, após análise dos trabalhos, não há como deixar de notar que, além de ocorrer o aumento da proliferação celular no colesteatoma do meato, como já anteriormente citado, há também uma diminuição da expressão da beta-catenina, com conseqüente interferência no processo normal da apoptose e da adesividade intercelular. Este fato pode estar relacionado com as características invasivas do colesteatoma. SAUTER et al (2007) pesquisaram a expressão da beta catenina em amostras de colesteatoma do MAE antes e após o uso do sulindaco sulfona. Estes autores observaram não só sua presença nestas amostras como também uma diminuição da sua expressão à medida que aumentava o tempo de exposição à droga. Outro antígeno relacionado à adesão celular também foi pesquisado.

A interleucina 1 (IL-1) é uma citocina que se encontra expressa na epiderme normal e tem o potencial de agir como fator autócrino de crescimento de células epiteliais. Além disso, sabe-se que esta interleucina é o mais potente fator indutor da erosão óssea (SCHILLING et al, 1992). SCHILLING et al (1992) e CHUNG, YOON (1998) pesquisaram a expressão de duas espécies moleculares da IL-1 (IL-1- α e IL-1- β) tendo obtido positividade tanto na epiderme do meato quanto no epitélio do colesteatoma. Os primeiros as encontraram em todas as camadas da epiderme do meato acústico externo e do colesteatoma de

orelha média, com maior positividade no colesteatoma. Já o receptor II da IL-1, pesquisado por BUJÍA et al (1997) foi encontrado nas camadas basal e suprabasal com distribuição homogênea tanto na epiderme do MAE normal quanto no epitélio do colesteatoma, com positividade três vezes maior no último. As metaloproteinases da matriz 2 e 9, também envolvidas no processo de remodelação óssea, foram encontradas no meato acústico externo por NAIM et al (2004B). Mais uma vez, em nenhum destes artigos foi especificada a região do meato de onde foram obtidas as amostras pesquisadas. O mesmo ocorreu com os achados das pesquisas de de HOLLY et al (1995), que pesquisaram o oncogene c-myc, TANAKA et al (1998) que pesquisaram a expressão do TGF- α , de TOMITA (2000) que pesquisou a p53, bax e bcl-2 e de ADAMCZYK et al (2003), que estudaram o TGF- α e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Estes antígenos foram encontrados no MAE, mas como em outros artigos, sem especificação quanto ao local exato de sua expressão no epitélio do meato.

COMENTÁRIOS FINAIS

Após a revisão e análise proposta neste estudo foi possível concluir que:

1. Há uma concentração de marcadores de hiperproliferação no anel fibrocartilágneo e nas regiões do meato acústico externo e da membrana timpânica adjacentes, principalmente nas porções mais inferiores.
2. A CK16 é encontrada na epiderme do meato acústico externo normal apenas em sua parte óssea e, na membrana timpânica, sua expressão diminui em sentido centrípeto.
3. Os marcadores de hiperproliferação Ki-67 e PCNA também são encontrados apenas na parte óssea do meato acústico externo, mesmo local de expressão da CK16, sendo que, na membrana timpânica, sua expressão diminui no sentido superior.
4. Vários artigos publicados não tiveram seus dados mais bem aproveitados e analisados de forma mais aprofundada pois não foram especificados os locais exatos de obtenção das amostras pesquisadas, tanto no meato acústico externo quanto na membrana timpânica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Broekaert D, Boedts D. The proliferative capacity of the keratinizing annular epithelium. *Acta Otolaryngol.* 1993,113(3):345-8.
2. Lepercque S, Broekaert D, van Cauwenberge P. Cytokeratin expression patterns in the human tympanic membrane and external ear canal. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1993, 250(2):78-81.

3. Vennix PP, Kuijpers W, Peters TA, Tonnaer ELGM, Ramaekers FCS. Epidermal differentiation in the human external auditory meatus. *Laryngoscope*. 1996, 106(4):470-5.
4. Kakoi H, Anniko M, Kinnefors A, Rask-Andersen H. Auditory epidermal cell proliferation. VII. Antigen expression of proliferating cell nuclear antigens, PCNA and Ki-67 in human tympanic membrane and external auditory canal. *Acta Otolaryngol*. 1997, 117(1):100-8.
5. Sanjuan M, Sabatier F, Andrac-Meyer L, Lavieille JP, Magnan J. Ear canal keratinocyte culture: clinical perspective. *Otol Neurotol*. 2007, 28(4):504-9.
6. Takahashi S, Nakano Y. Immunohistochemical demonstration of Langerhans cell in cholesteatoma using an antiserum against S-100 protein. *Arch Otorhinolaryngol*. 1989, 246(1):48-52.
7. Van Blitterswijk CA, Grote JJ, Lutgert RW, Hesselning SC, Out CJ, van Muijen GN, Fransen JA. Cytokeratin patterns of tissues related to cholesteatoma pathogenesis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1989, 98(8 Pt 1):635-40.
8. 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(11):931-8.
9. Schilling V, Negri B, Bujía J, Schulz P, Kastenbauer E. Possible role of interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta in the pathogenesis of cholesteatoma of the middle ear. *Am J Otol*. 1992, 13(4):350-5.
10. Sasaki H, Huang CC. Expression of cytokeratins 13 and 16 in middle ear cholesteatoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1994, 110(3):310-7.
11. Lee RJ, Sidey C, Narula AA, James RF. The nature of the epithelium in acquired cholesteatoma: Part 3—Cytokeratin patterns in aural epithelial and cholesteatoma cells grown in cell culture. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1994, 19(6):516-20.
12. Schilling V, Lang S, Rasp G, Mack B, Nerlich A. Overexpression of tenascin in cholesteatoma and external auditory meatal skin compared to retroauricular epidermis. *Acta Otolaryngol*. 1996, 116(5):741-6.
13. Bujía J, Kim C, Ostos-Aumente P, Lopez-Villarejo J, Kastenbauer E. Enhanced epithelial proliferation due to elevated levels of interleukin-1 receptors in middle ear cholesteatomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1997, 254(1):6-8.
14. Chung JW, Yoon TH. Different production of interleukin-1alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 from cholesteatomatous and normal epithelium. *Acta Otolaryngol*. 1998, 118(3):386-91.
15. Kojima H, Tanaka Y, Tanaka T, Miyazaki H, Shiwa M, Kamide Y, Moriyama H. Cell proliferation and apoptosis in human middle ear cholesteatoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998, 124(3):261-4.
16. Tanaka Y, Shiwa M, Kojima H, Miyazaki H, Kamide Y, Moriyama H. A study on epidermal proliferation ability in cholesteatoma. *Laryngoscope*. 1998, 108(4 Pt 1):537-42.
17. 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.
18. Tomita, S. Aspectos moleculares do colesteatoma - imunoexpressão das proteínas controladoras do ciclo celular: p53, bax e bcl-2. Tese (Doutorado). São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 2000.
19. Bayazıt YA, Karakok M, Ucak R, Kanlikama M. Cycline-dependent kinase inhibitor, p27 (KIP1), is associated with cholesteatoma. *Laryngoscope*. 2001, 111(6):1037-41.
20. Adamczyk M, Sudhoff H, Jahnke K. Immunohistochemical investigations on external auditory canal cholesteatomas. *Otol Neurotol*. 2003, 24(5):705-8.
21. Naim R, Riedel F, Bran G, Hormann K. Expression of beta-catenin in external auditory canal cholesteatoma (EACC). *Biofactors*. 2003, 19(3-4):189-95.
22. 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.
23. Raynov AM, Moon SK, Choung YH, Hong SP, Park K. Nucleoplasm staining patterns and cell cycle-associated expression of Ki-67 in middle ear cholesteatoma. *Am J Otolaryngol*. 2005B, 26(5):296-301.
24. Hwang SJ, Kang HJ, Song JJ, Kang JS, Woo JS, Chae SW, et al. Up-regulation of peroxidase proliferator-activated receptor gamma in cholesteatoma. *Laryngoscope*. 2006, 116(1):58-61.
25. Naim R, Hormann K. The role of S100A1 in external auditory canal cholesteatoma. *Oncol Rep*. 2006, 16(4):671-5.
26. Kamiya M, Maehara R, Iizuka S, Yoshida T, Yamanouchi H, Yokoo H, et al. Pigmented squamous cell carcinoma with

dendritic melanocyte colonization in the external auditory canal. *Pathol Int.* 1999, 49(10):909-12.

27. Konishi E, Nakashima Y, Manabe T, Mazaki T, Wada Y. Irritated seborrheic keratosis of the external ear canal. *Pathology International.* 2003, 53(9):622-6.

28. Ribeiro FAQ, Pereira CSB, Almeida R. Estudo comparativo de aspectos histológicos e imunohistoquímicos entre o colesteatoma espontâneo do meato acústico externo e o colesteatoma adquirido da orelha média. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004, 70(5):602-7.

29. Thompson LD, Nelson BL, Barnes EL. Ceruminous adenomas: a clinicopathologic study of 41 cases with a review of the literature. *Am J Surg Pathol.* 2004, 28(3):308-18.

30. Naim R, Chang RC, Anders C, Sadick H, Riedel F, Bayerl C, et al. Up-regulation of beta-catenin in external auditory canal cholesteatoma. *Int J Mol Med.* 2005A, 15(5):801-4.

31. Sauter A, Matharu R, Braun T, Schultz J, Sadick H, Hormann K, et al. Sulindac sulfone modulates beta-catenin in human cholesteatoma cell culture. *Arch Med Res.* 2007, 38(4):367-71.