

O papel das citocinas no colesteatoma adquirido da orelha média: revisão da literatura

The role of cytokines in acquired middle ear cholesteatoma: literature review

Adriana Leal Alves¹, Fernando de Andrade Quintanilha Ribeiro²

Palavras-chave: imuno-histoquímica, citocinas, orelha média, colesteatoma.
Key words: immunohistochemistry, cytokines, middle ear, cholesteatoma.

Resumo / Summary

Este estudo visa a analisar de modo crítico a literatura pertinente a respeito do papel das citocinas no colesteatoma adquirido. O colesteatoma da orelha média é caracterizado pela presença de epitélio escamoso estratificado queratinizado neste local, com alto poder invasivo, causando destruição óssea e podendo levar a complicações. As citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular que atuam na intercomunicação celular. São importantes na estimulação e supressão dos eventos da resposta imune, desencadeando e coordenando a resposta inflamatória, assim como os processos de cicatrização e remodelação tecidual. No colesteatoma já foram observadas as seguintes citocinas e fatores de crescimento: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- \pm , TGF- \pm , TGF- 2 , EGF e KGF. Ocorre um sinergismo entre as diferentes citocinas para resultar nas características agressivas do colesteatoma.

This study aims at a critical analysis of the literature regarding to the role of cytokines in acquired cholesteatomas. Cholesteatomas of the middle ear are characterized by the presence of stratified squamous epithelium in this cavity revealing with highly invasive properties causing destruction of the bone which may bring complications. The cytokines are glycoproteins of low molecular weight that act in the cellular intercommunication. They are important at the stimulation and suppression of the events of the immune response, unchaining and co-ordinating the inflammatory response, as well the wound healing and tecidual remodelling. In cholesteatoma, they had been observed by following cytokines and growth factors: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- \pm , TGF- \pm , TGF- 2 , EGF and KGF. A synergism occurs among different cytokines as result in the aggressive characteristics of cholesteatoma.

¹ Mestranda do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

² Professor Adjunto do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

Realizado no Departamento de Otorrinolaringologia da Santa Casa de São Paulo.

Endereço para correspondência: Dra. Adriana Leal Alves – Rua João Clímaco Pereira, 46 São Paulo SP 04532-070.

Tel/Fax: (0xx11) 3849-0543 – E-mail: adrialves@yahoo.com

Artigo recebido em 23 de janeiro de 2004. Artigo aceito em 02 de abril de 2004.

INTRODUÇÃO

O colesteatoma da orelha média é uma doença caracterizada histologicamente pela presença de epitélio escamoso estratificado queratinizado neste local, que habitualmente é revestido por epitélio colunar pseudo-estratificado ciliado.

O colesteatoma possui características migratórias e líticas, podendo causar erosão óssea tanto da cadeia ossicular quanto das células mastóideas, gerando complicações endo e exocranianas.

Diversos autores têm estudado o colesteatoma, na tentativa de descobrir a etiopatogenia da doença, que permanece controversa. Dentre estes estudos, vários trabalhos utilizando métodos imuno-histoquímicos possibilitaram a análise mais detalhada das citocinas e sua participação na etiopatogenia do colesteatoma.

Estes estudos imuno-histoquímicos trouxeram progressos no diagnóstico de diversas doenças, permitindo a identificação de proteínas específicas de determinado tecido por meio de uma reação antígeno-anticorpo, o que não é possível com as técnicas histológicas convencionais, demonstrando, assim, que a inflamação estimula a liberação de citocinas e estas estimulam o processo inflamatório, desencadeando uma reação em cascata.

As citocinas são proteínas produzidas pelas células em resposta ao processo inflamatório e atuam modificando as suas próprias características e das células adjacentes. Muitas delas já foram estudadas e definidas, umas causando vasodilatação, outras, osteólise, outras, migração de mastócitos e/ou de células epiteliais, e ainda, formação de tecido de granulação. Esta interação entre as citocinas acaba sendo, ao mesmo tempo, causa e efeito do comportamento agressivo do colesteatoma.

O colesteatoma da orelha média faz parte do cotidiano dos otorrinolaringologistas e ainda nos dias atuais muitas de suas características permanecem controversas quanto à sua etiopatogenia e agressividade. O objetivo deste trabalho é realizar uma revisão da literatura e uma análise crítica a respeito da expressão de várias citocinas no colesteatoma, identificando quais delas conferem aos colesteatomas diferentes comportamentos.

REVISÃO DA LITERATURA

Muito comum em nosso meio, o colesteatoma é uma entidade rara em outros países, representando 0,1% -0,5% de todas as afecções da orelha. A proporção entre homens e mulheres é de 1,2: 1,0, com idades variando de 3 a 70 anos¹.

Histologicamente, o epitélio do colesteatoma é semelhante à epiderme da pele normal, contendo as quatro camadas clássicas dos tecidos epidérmicos (basal, espinhosa, granulosa e córnea). O epitélio do colesteatoma é também chamado matriz, e o tecido conjuntivo frouxo subepitelial,

contendo fibras colágenas, elásticas, fibroblastos e células inflamatórias, perimatriz do colesteatoma².

A maioria das células do infiltrado inflamatório é linfócitos e macrófagos ambos estão num estado imunologicamente ativo, o que sugere que a inflamação no colesteatoma seja um processo imunomediado³.

O colesteatoma possui características hiperproliferativas, que estão relacionadas com a presença de citoqueratinas (CK) e do Ki-67^{4,5}. As citoqueratinas são filamentos protéicos do cito-esqueleto das células epiteliais. O colesteatoma e o epitélio do meato acústico externo, por serem histologicamente semelhantes aos tecidos epidérmicos, possuem as citoqueratinas 1, 2, 5, 10 e 14. O interessante é que existe uma citoqueratina no colesteatoma que não aparece na mucosa da orelha média nem no epitélio da maior parte do meato acústico externo, que é a CK 16. Essa citoqueratina é característica de células epiteliais em estágio de hiperproliferação. Ela aparece em todas as doenças epidérmicas hiperproliferativas benignas como psoríase, queratose actínica, dermatite seborréica e verrugas, ou malignas como carcinoma espinocelular. Também está presente em zonas submetidas à pressão (pés e polpa digital) e no epitélio de revestimento dos folículos pilosos. Ela aparece nas camadas suprabasais da matriz do colesteatoma, mostrando que este epitélio, apesar de histologicamente ser semelhante à pele normal, tem comportamento hiperproliferativo⁴. O Ki-67 é um antígeno nuclear que aparece nas células em estágio de multiplicação (fases G1, S, G2 e M do ciclo celular). A presença do Ki-67 em todas as camadas do epitélio do colesteatoma confere a este características hiperproliferativas⁵.

As Citocinas

As citocinas compreendem um grande número de glicoproteínas de baixo peso molecular (menor que 80 kD) que atuam na intercomunicação celular. Podem ser secretadas e/ou expressas em membranas celulares ou armazenadas na matriz extracelular⁶.

Um dos aspectos mais importantes dessas proteínas é o amplo espectro e potencial de ações. Podem ser produzidas por qualquer célula do corpo com exceção dos eritrócitos. São importantes na estimulação e supressão dos eventos da resposta imune, desencadeando e coordenando a resposta inflamatória, assim como os processos de cicatrização e remodelação tecidual⁶.

Atualmente o termo citocina é usado como um nome genérico para um grupo diverso de proteínas e polipeptídeos solúveis que agem como reguladores humorais em uma pequena concentração⁶.

As citocinas são também chamadas de citoquinas, linfocinas, monocinas, imunotransmissores, imunocitocinas, quimiocinas, interleucinas e interferons⁷.

Na imunidade natural, as citocinas efetoras são produzidas principalmente por fagócitos mononucleares e

costumam ser chamadas, portanto, monocinas. A maioria das citocinas da imunidade específica é produzida por linfócitos T ativados, e tais moléculas comumente são chamadas linfocinas⁷.

Algumas citocinas compartilham a capacidade de estimular o movimento leucocitário (quimioquese) e o movimento dirigido (quimiotaxia) e têm sido coletivamente chamadas "quimioquinas", uma contração de citocinas quimiotáticas⁷.

Uma hipótese importante gerada na década de 70 foi que as citocinas eram sintetizadas principalmente por leucócitos e primariamente atuavam sobre outros leucócitos e, desta forma, poderiam ser chamadas interleucinas (IL)⁷.

Diferentes citocinas compartilham as mesmas propriedades, as quais foram denominadas de *propriedades gerais*, que são:

1. As citocinas atuam sobre muitos tipos celulares diferentes. Esta propriedade é chamada pleiotropismo.
2. As ações das citocinas costumam ser redundantes. Muitas funções originalmente atribuídas a uma citocina têm provado ser propriedades compartilhadas de várias citocinas diferentes. Esta observação tem sido reforçada pelo estudo de camundongos submetidos a processo de eliminação gênica e que não possuem genes para citocinas em particular e ainda assim exibem apenas anormalidades sutis de suas respostas imunes.
3. As citocinas costumam influenciar a ação de outras citocinas. Duas citocinas podem interagir antagonizando-se, produzindo efeitos aditivos ou, em alguns casos, produzindo efeitos maiores que os antecipados ou até peculiares, um tipo de interação comumente denominado sinergismo.
4. As citocinas costumam influenciar a síntese de outras citocinas, levando a cascatas nas quais uma segunda ou terceira citocina possa mediar os efeitos biológicos da primeira citocina. A capacidade da citocina de potencializar ou suprimir a produção de outras pode proporcionar importantes mecanismos regulatórios positivos e negativos para respostas imunes e inflamatórias.
5. As citocinas, como outros hormônios polipeptídicos, iniciam sua ação por ligação a receptores específicos de membrana na célula-alvo. Os receptores para citocinas costumam mostrar afinidades muito altas por seus ligantes. Em consequência, apenas quantidades muito pequenas de uma citocina precisam ser produzidas para desencadear um efeito biológico.
6. As ações das citocinas podem ser locais ou sistêmicas. A célula-alvo pode ser a mesma célula que secreta a citocina (ação autócrina ou intracelular), uma célula vizinha (ação parácrina ou intercelular). Quando produzidas em grandes quantidades, as citocinas podem entrar na circulação e agir à distância do sítio de produção (ação endócrina).
7. Para muitas células-alvo, as citocinas atuam como

reguladoras da divisão celular, isto é, como fatores de crescimento.

Alguns imunologistas propuseram que as citocinas deveriam ser agrupadas juntamente com os fatores de crescimento epiteliais ou mesenquimais num grupo funcional maior de moléculas reguladoras polipeptídicas⁶. Contudo, outros autores continuaram a distinguir aquelas moléculas cujas ações primárias são as de mediadores de defesa do hospedeiro (isto é, as citocinas) das moléculas cujo papel primário reside no reparo tecidual (isto é, os fatores de crescimento das células epiteliais e mesenquimais)⁷.

As Citocinas no Colesteatoma

A seguir iremos detalhar dados a respeito das citocinas mais estudadas no colesteatoma adquirido:

A Interleucina 1 (IL1) é produzida principalmente pelos macrófagos, e também por células endoteliais, epiteliais, células de Langerhans, linfócitos T, B e NK, fibroblastos, células mesangiais e células da glia. A IL1 é mediadora da resposta inflamatória na imunidade natural e estimula a reabsorção óssea aumentando o número de células precursoras de osteoclastos, além de estimular a produção de prostaglandinas e colagenases pelos fibroblastos e osteoblastos. É sintetizada sob duas formas: a IL-1 α e a IL-1 β . A IL1 foi descrita no colesteatoma adquirido por diversos autores⁸⁻¹³.

A Interleucina 6 (IL-6) é uma citocina de 26 kD, sintetizada por vários tipos celulares: macrófagos (principalmente), linfócitos T e B, fibroblastos, células do estroma da medula óssea, células epiteliais e endoteliais. Estimula a proliferação de células T, a ativação do mecanismo natural de morte celular e citotoxicidade⁷. A IL-6 foi estudada no colesteatoma adquirido por diversos autores^{8,14,15}.

O Fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), também chamado de caquetina, é produzido principalmente por macrófagos, mas também pode ser liberado por linfócitos e mastócitos. Além de induzir produção de colagenases e prostaglandinas, é quimiotático para células inflamatórias. O TNF- α regula a síntese de outras citocinas como a IL-6 e a IL-1^{6,7}. O TNF- α foi estudado no colesteatoma adquirido por diversos autores^{8,12,13,15-18}.

O Fator beta transformador de crescimento (TGF- β) é produzido por células endoteliais, macrófagos, neutrófilos, plaquetas, linfócitos T e B. Quanto à modulação de inflamação, suas ações podem ser pró-inflamatórias e imunossupressoras. Em geral, células imaturas em repouso são estimuladas por TGF- β , enquanto que estas mesmas células, já ativadas, podem ser inibidas por TGF- β , que por este motivo pode ser considerado uma "anticitocina", ou seja, faz uma regulação negativa da resposta imune. Sua ação pró-inflamatória inclui quimiotaxia para macrófagos e em menor escala para fibroblastos, aumento de expressão de moléculas de adesão, e auto-indução de TGF- β . Possui ação angiogênica, promove a proliferação de colágeno e de

novos vasos. Esses achados sugerem que a superprodução de TGF- β pode levar a cicatrização e implica num mecanismo patogênico na fibrose⁷. O TGF- β foi estudado no colesteatoma adquirido por diversos autores^{8,19,20}.

O Fator alfa transformador de crescimento (TGF- α) é um fator polipeptídico de crescimento para células epiteliais e mesenquimais. O TGF- α é produzido por queratinócitos, macrófagos e plaquetas, tendo sua imunexpressão aumentada em várias doenças epidérmicas incluindo o colesteatoma e tumores ectodérmicos. Tem estrutura relacionada ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e liga-se ao seu receptor⁷. O TGF- α foi estudado no colesteatoma adquirido por diversos autores²⁰⁻²³.

O fator de crescimento epidérmico (EGF) é um polipeptídeo que estimula a proliferação de células epidérmicas, fibroblastos e células endoteliais (angiogênese). O seu receptor (EGF-R) está localizado no tecido epitelial²⁴. O EGF e o EGF-R foram estudados no colesteatoma adquirido por diversos autores^{13,21,25,26}.

O fator de crescimento de queratinócitos (KGF) é um polipeptídeo que estimula a proliferação e diferenciação de células epidérmicas. Pode ser produzido por fibroblastos. O seu receptor (KGF-R) está localizado no tecido epitelial²⁷. O KGF e o KGF-R foram estudados no colesteatoma adquirido por Yamamoto-Fukuda et al.²⁷.

DISCUSSÃO

Quanto à gênese do colesteatoma adquirido, muito já se discutiu e nos dias de hoje há um consenso sobre a sua classificação em primário e secundário e sobre as respectivas teorias para explicar a origem de cada um destes subtipos. A patogênese do colesteatoma adquirido está diretamente relacionada às afecções da orelha média, quer por disfunções crônicas da tuba auditiva, quer por infecções por ela oriundas, causando uma perfuração da membrana timpânica. Tanto o aparecimento quanto à evolução de um colesteatoma são multifatoriais e estão relacionados às características genéticas e de biologia molecular de suas células. O potencial migratório das células do meato, justatimpânicas, é dado por citoqueratinas com características de proliferação que só aparecem em doenças epidérmicas hiperproliferativas benignas e zonas submetidas à pressão e atrito. Este potencial é reativado quando estimulado por forças físicas que exercem pressão ou por processo infeccioso, como ocorre no colesteatoma⁴. Desde que esse processo se inicie, tanto a inflamação decorrente da otite média secretora quanto à infecção bacteriana estimulam a liberação de citocinas. Essas propriedades fazem os colesteatomas ter comportamentos individuais, uns mais, outros menos agressivos. Uns com características recidivantes, outros não⁵.

Entre as diversas estruturas descobertas na cascata de eventos da resposta inflamatória e homeostasia do corpo humano, as citocinas vêm sendo o principal alvo de

pesquisas⁷.

Inúmeras citocinas já foram estudadas no colesteatoma adquirido e iremos discutir o papel de cada uma delas.

A Interleucina 1 (IL1) foi descrita no colesteatoma adquirido por Marena & Aufdemorte⁸ e Bujia et al.¹⁰, que concordaram em seus achados, observando a imunexpressão da IL-1 em todas as camadas do epitélio e no subepitélio do colesteatoma. Discordando destes achados, Akimoto et al.¹², observaram a imunexpressão da IL-1 apenas no tecido subepitelial do colesteatoma. Esta diferença talvez possa ser explicada pelo estudo realizado por Chung & Yoon¹¹, que realizaram uma dissociação do tecido epitelial do subepitelial e utilizaram as células epiteliais para realizar cultura de tecido. Estes autores observaram que as células epiteliais produzem IL-1 apenas quando estavam sob influência do tecido subepitelial. Este fato já é descrito na imunologia, pois o principal indutor da síntese de IL-1 é o linfócito T, neste caso presente no subepitélio do colesteatoma.

Em relação a imunexpressão da interleucina 6 (IL-6) podemos dizer que houve um consenso entre os autores, tanto Marena & Aufdemorte⁸ quanto Bujia et al.¹⁴, a encontraram em todas as camadas do epitélio e no tecido subepitelial do colesteatoma.

Quanto ao papel das interleucinas no colesteatoma, a IL-1 estimula a reabsorção óssea aumentando o número de células precursoras de osteoclastos, além de estimular a produção de prostaglandinas e collagenases pelos fibroblastos e osteoblastos. A IL-6 também induz a formação de osteoclastos. Concentrações elevadas de IL-6 foram associadas à erosão da cadeia ossicular e presença de tecido de granulação intra-operatório. A IL-8 promove a produção de collagenases, proteínas envolvidas nos processos de lise óssea^{8,10,11}.

Quanto a imunolocalização do fator alfa de necrose tumoral (TNF- \pm) no colesteatoma adquirido houve discordância entre os autores. Yan & Huang¹⁶ observaram a imunexpressão do TNF- α nas células basais e espinhosas do epitélio e no tecido subepitelial. Enquanto Marena & Aufdemorte⁸ descreveram a imunexpressão do TNF- α nas camadas suprabasais do epitélio do colesteatoma humano e no tecido subepitelial, mas não foi encontrado nas camadas basais. Já nos estudos de Sastry et al.¹⁸, o TNF- α foi imunexpressado em todas as camadas do epitélio do colesteatoma. Discordando destes achados, Akimoto et al.¹² observaram a imunexpressão do TNF- α apenas no tecido subepitelial do colesteatoma.

Em relação ao papel do TNF- α no colesteatoma, ele age como um mediador nos processos de destruição e remodelação dos tecidos, aumenta a atividade das collagenases, expondo a superfície óssea à ação dos osteoclastos. É um regulador autócrino do crescimento estimulando a síntese protéica, proliferação e diferenciação terminal dos queratinócitos e fazendo com que haja um

aumento na produção de queratina. A queratina atua como estímulo inflamatório, levando à formação de tecido de granulação. A concentração de TNF- α é proporcional ao grau de destruição óssea. A concentração de TNF- α também é elevada no soro de pacientes com colesteatoma, em especial naqueles com grandes extensões de destruição óssea¹⁸.

Podemos observar uma discordância dos autores quanto a imunexpressão do TGF- β no colesteatomas, pois Lang et al.¹⁹ e Sudhoff et al.²⁰ o encontraram apenas no tecido subepitelial, enquanto Marena & Aufdemorte⁸ o localizaram nas camadas suprabasais do epitélio e no tecido subepitelial do colesteatoma humano.

Quanto ao papel do TGF- β no colesteatoma, ele regula a proliferação de osteoblastos e sua diferenciação, diminui o número de osteoclastos, estimula os macrófagos e fibroblastos, além de inibir a ação de enzimas proteolíticas que destroem os tecidos neoformados, resultando em formação de tecido de granulação no local. A atividade do TGF- β 2 está correlacionada com a presença da erosão óssea na orelha média e a atividade do TGF- β 1 está correlacionada com o tempo de evolução da doença. O TGF- β 1 inibe a formação de osteoclastos e também inibe outras citocinas como a IL-1. Sua presença possivelmente diminuiria a proliferação do colesteatoma e formação de lamelas de queratina⁸.

Há uma concordância entre os autores quanto a imunexpressão do TGF- α , pois todos eles o encontraram em todas as camadas do epitélio do colesteatoma²⁰⁻²³. E apenas alguns destes autores observaram a imunexpressão do TGF- α também no tecido subepitelial do colesteatoma^{20,22}. O TGF- α interage com o EGFR, presente na superfície celular²³.

O fator de crescimento epidérmico (EGF) e seu receptor (EGF-R) foram estudados no colesteatoma adquirido por diversos autores que concordaram nos seus achados quanto à imunexpressão do EGF-R em todas as camadas do epitélio do colesteatoma^{21,25,26}.

O fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e o seu receptor (KGF-R) foram estudados no colesteatoma adquirido por Yamamoto-Fukuda et al.²⁷ que detectaram o KGF exclusivamente nos fibroblastos do tecido subepitelial, enquanto o KGF-R foi localizado exclusivamente no epitélio dos colesteatomas. O estudo realizado por estes autores aponta o futuro no estudo dos colesteatomas, pois no tecido epitelial encontra-se o receptor para citocina e no tecido subepitelial encontra-se a citocina.

O processo inflamatório que ocorre no tecido subepitelial do colesteatoma parece ter um papel importante na produção das citocinas que atuam tanto no tecido subepitelial quanto no tecido epitelial do colesteatoma. Esta interação entre epitélio e subepitélio foi bem demonstrada quando se realizou cultura de tecido do colesteatoma, separando o epitélio do subepitélio¹¹.

Novos estudos devem ser realizados comparando as diferenças no padrão de expressão das citocinas entre o

colesteatoma infectado e o colesteatoma seco, ou ainda, descrevendo a expressão das citocinas no revestimento das cavidades radicais epitelizadas, no intuito de uma melhor compreensão desta doença tão freqüente em nosso meio.

COMENTÁRIOS FINAIS

No colesteatoma já foram observadas as seguintes citocinas, fatores de crescimento e receptores: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β , TGF- β 2, EGF, EGF-R, KGF e KGF-R. Porém, não há uma concordância entre os autores sobre a imunolocalização de uma mesma citocina.

Não há apenas uma citocina responsável para cada característica do colesteatoma, como reabsorção óssea, invasão, angiogênese. O que existe é um sinergismo entre as diferentes citocinas resultando nestas características agressivas do colesteatoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gyo K, Sasaki S, Yasuyuki N. Residue of middle ear cholesteatoma after intact wall tympanoplasty: surgical findings at one year. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996; 105: 615-9.
2. Lim DJ & Saunders WH. Acquired cholesteatoma: light and electron microscopic observations. *Ann Otol* 1972; 81: 2-12.
3. Schilling V, Bujia J, Negri B, Schulz P, Kastenbauer E. Immunologically activated cells in aural cholesteatoma. *Am J Otolaryngol* 1991; 12: 249-53.
4. Pereira CSB. Análise de estudos da expressão das citoqueratinas no colesteatoma adquirido. São Paulo; 1997 (dissertação – mestrado – Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo).
5. Pereira CSB. Imunexpressão da citoqueratina 16 e do Ki-67 no colesteatoma adquirido. São Paulo 2001 (tese – doutorado – Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo).
6. Hamblin AS. Cytokines and cytokine receptors. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1993.
7. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Citocinas. In: *Imunologia celular e molecular*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p. 253-276.
8. Marena SA & Aufdemorte TB. Localization of cytokines in cholesteatoma tissue. *Otolaryngology Head Neck Surg* 1995; 112: 359-68.
9. Kim CS, Lee CH, Chung JW, Kim CD. Interleukin-1 alpha interleukin-1 beta and interleukin-8 gene expression in human aural cholesteatomas. *Acta Otolaryngol* 1996; 116(2): 302-6.
10. Bujia J, Kim C, Boyle D, Hammer C, Firestein G, Kastenbauer E. Quantitative analysis of interleukin-1-alpha gene expression in middle ear cholesteatoma. *Laryngoscope* 1996; 106: 217-20.
11. Chung JW & Yoon TH. Different production of interleukin-1 α interleukin-1 β and interleukin-8 from cholesteatomatous and normal epithelium. *Acta Otolaryngol (Stockh.)* 1998; 118: 386-91.
12. Akimoto R, Pawankar R, Yagi T, Baba S. Acquired and congenital cholesteatoma: determination of tumor necrosis factor-alpha intercellular adhesion molecule-1 interleukin-1-alpha and lymphocyte functional antigen-1 in the inflammatory process. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2000; 62(5): 257-65.
13. Yetiser S, Satar B, Aydin N. Expression of epidermal growth factor tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1alpha in chronic otitis media with or without cholesteatoma. *Otol Neurotol* 2002; 23(5): 647-52.
14. Bujia J, Kim C, Ostos P, Kastenbauer E, Hultner L. Role of interleukin 6 in epithelial hyperproliferation and bone resorption in middle ear cholesteatomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996; 253: 152-57.

-
15. Kato A, Ohashi Y, Masamoto T, Sakamoto H, Uekawa M, Nakai Y. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha synthesized by cholesteatoma cells affect mucociliary function in the Eustachian tube. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1998; 538: 90-7.
 16. Yan SD & Huang CC. Tumor necrosis factor alpha in middle ear cholesteatoma and its effect on keratinocytes in vitro. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991, 100: 157-61.
 17. Amar MS, Wishahi HF, Zakhary MM. Clinical and biochemical studies of bone destruction in cholesteatoma. *J Laryngol Otol* 1996; 110(6): 534-9.
 18. Sastry KVSSR, Sharma SC, Mann SBS, Ganguly NK, Panda NK. Aural cholesteatoma: role of tumor necrosis factor-alpha in bone destruction. *The American Journal of Otology* 1999; 20: 158-161.
 19. Lang S, Schilling V, Wollenberg B, Mack B, Nerlich A. Localization of transforming growth factor-beta expressing cells and comparison with major extracellular components in aural cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106: 669-73.
 20. Sudhoff H, Dazert S, Gonzales A.M, Borkowski G, Park SY, Baird A, Hildmann H, Ryan AF. Angiogenesis and angiogenic growth factors in middle ear cholesteatoma. *Am J Otol* 2000; 21(6): 793-8.
 21. Ergün S, Zheng X, Carlsson B. Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in middle ear cholesteatoma. *Am J Otol* 1996; 17(3): 393-6.
 22. Tanaka Y, Shiwa M, Kojima H, Miyazaki H, Kamide Y, Moriyama H. A study on epidermal proliferation ability in cholesteatoma. *Laryngoscope* 1998; 108: 537-42.
 23. Shiwa M, Kojima H, Moriyama H. Expression of transforming growth factor-alpha (TGF- α) in cholesteatoma. *J Laryngol Otol* Aug. 1998; 112(8): 750-54.
 24. Jordão BQ & Andrade CGTJ. Ciclo celular e meiose. In: Junqueira LC & Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. 7ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2000. p. 171-97.
 25. Bujia J, Kim C, Holly A, Sudhoff H, Ostos P, Kastenbauer E. Epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human middle ear cholesteatoma: an analysis of protein production and gene expression. *Am J Otol* 1996;17(2): 203-6.
 26. Ottaviani F, Neglia C. B, Berti E. Cytokines and adhesion molecules in middle ear cholesteatoma. A role in epithelial growth? *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 1999;119: 462-7.
 27. Yamamoto-Fukuda T, Aoki D, Hishikawa Y, Kobayashi T, Takahashi H, Koji T. Possible involvement of keratinocyte growth factor and its receptor in enhanced epithelial-cell proliferation and acquired recurrence of middle-ear cholesteatoma. *Lab Invest* 2003; 83(1): 123-36.