

TNF-R2 expression in acquired middle ear cholesteatoma

Expressão do TNF-R2 no colesteatoma adquirido da orelha média

Rodrigo Faller Vitale¹, Celina Siqueira Barbosa Pereira², Adriana Leal Alves³, Jose Humberto Tavares Guerreiro Fregnani⁴, Fernando Quintanilha Ribeiro⁵

Keywords:

bone resorption,
cholesteatoma,
middle ear,
receptors, tumor
necrosis factor, type II,
tumor necrosis
factor-alpha.

Palavras-chave:

colesteatoma da
orelha média,
fator de necrose
tumoral alfa,
reabsorção óssea,
receptores tipo
II do fator de
necrose tumoral.

Abstract

Acquired middle ear cholesteatoma is a disease which promotes bone erosion resulting in potentially serious complications. The tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is present in cholesteatoma and it is related to bone erosion, as shown by different authors. To understand the aggressiveness characteristics of cholesteatoma is necessary, however, to better address the presence and distribution of their receptors. **Objective:** To evaluate the expression of type 2 TNF- α receptor (TNF-R2) in fragments of cholesteatoma and correlate it to the degree of inflammation present. **Material and methods:** observational cross-sectional study, which analyzed 33 fragments of cholesteatomas through histological analysis and immunohistochemistry (using as primary antibody to TNF-R2 LabVision ® brand). The evaluation was performed by means of a qualitative and semi-quantitative agreement with the observed intensity. For statistical analysis we used the Fisher exact test and Spearman's correlation coefficient (considered statistically significant when $p \leq 0.05$). **Results:** The expression of TNF-R2 was present in all fragments, however a statistical analysis showed no correlation or association between inflammation and the expression of TNF-R2. **Conclusions:** TNF-R2 is present in cholesteatoma of the middle ear, however, its expression is not directly related to the degree of inflammation observed in patients with this disease.

Resumo

O colesteatoma adquirido da orelha média promove erosão óssea, ocasionando complicações potencialmente graves. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) está presente no colesteatoma adquirido da orelha média e relaciona-se com a erosão óssea, como demonstraram diferentes autores. Para que se compreenda as características de agressividade do colesteatoma, é necessário que se estude a presença e a distribuição seus receptores. **Objetivo:** Avaliar a expressão do receptor tipo dois do TNF- α (TNF-R2) em fragmentos de colesteatoma e relacioná-lo com o grau de inflamação. **Material e Métodos:** Estudo observacional do tipo transversal. Foram analisados 33 fragmentos de colesteatomas, submetidos à análise histológica e imunoistoquímica (utilizando o TNF-R2 da marca Labvision®). A avaliação foi realizada de forma qualitativa e semiquantitativa, de acordo com a intensidade observada. Para a análise estatística, foram utilizados o teste exato de Fischer e o coeficiente de correlação de Spearman (estatisticamente significativo quando $p \leq 0,05$). **Resultados:** A expressão do TNF-R2 estava presente em todos os fragmentos, entretanto a estatística não evidenciou correlação, nem associação entre o processo inflamatório e a expressão do TNF-R2. **Conclusões:** O TNF-R2 está presente no colesteatoma adquirido da orelha média. Entretanto, a sua expressão não está relacionada ao grau de inflamação.

¹ Doutorado, preceptor.

² Doutora em Medicina, Professora Assistente do Depto. de Morfologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

³ Doutora em Medicina, Professora Instrutora do Departamento de Morfologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

⁴ Doutor em Medicina, Professor do Programa de Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente - Hospital do Câncer A. C. Camargo.

⁵ Doutor em Medicina, Professor Adjunto do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, SP.

Endereço para correspondência: Rodrigo Faller Vitale - Rua Zacarias de Goes, 1296, Pq. Colonial. São Paulo - SP. CEP: 04610-003.

Tel. (0xx11) 3637-0406 - Fax: (0xx11) 3637-0406 - E-mail: rfvitale@hotmail.com

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da BJORL em 17 de novembro de 2009. cod. 6784

Artigo aceito em 2 de junho de 2010.

INTRODUÇÃO

O colesteatoma adquirido da orelha média foi descrito pela primeira vez por Curveilhier, em 1829¹, e é caracterizado pela invasão da cavidade timpânica por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, diferente do epitélio pseudoestratificado colunar ciliado com células caliciformes presente na região próxima à tuba auditiva ou do epitélio simples, pavimentoso, cúbico ou colunar, no restante da orelha média². Histologicamente, o colesteatoma pode ser dividido em matriz (epitélio) e perimatriz (tecido conjuntivo subjacente)³.

A matriz do colesteatoma possui quatro camadas distintas: basal, espinhosa, granulosa e córnea, assim como a pele fina. Já a perimatriz é caracterizada pela presença de tecido conjuntivo frouxo composto por fibras colágenas, elásticas, fibroblastos, bem como células inflamatórias⁴. A análise histológica da matriz do colesteatoma pode evidenciar diferentes padrões: atrofia, acantose, hiperplasia da camada basal e presença de cones epiteliais. É frequente o encontro de vários destes padrões simultaneamente em um mesmo caso².

Devido à sua capacidade de causar erosão óssea, que está presente em 80% dos casos⁵, o colesteatoma é responsável por complicações extracranianas e intracranianas. Essas complicações, quando presentes, têm alta taxa de morbidade e mortalidade⁶. Por essas razões, torna-se relevante o estudo dos mecanismos pelo quais o colesteatoma adquirido da orelha média promove a erosão óssea.

No início da década de 90, surgiram os primeiros trabalhos sugerindo que o TNF- α fosse uma importante citocina envolvida no processo, de destruição óssea^{7,8}. As citocinas liberadas pelo processo inflamatório, presente na perimatriz seriam as responsáveis pela destruição óssea presente no colesteatoma⁹. Dentre estas, o TNF- α destaca-se como sendo uma das principais citocinas envolvidas neste processo favorecendo, juntamente com o ligante do ativador do receptor do fator nuclear Kappa B (RANKL) e as interleucinas 1 e 6, a destruição e a remodelação óssea¹⁰. Por isto destaca-se a importância de se estudar a expressão do TNF-R2 e sua relação com o processo inflamatório.

Há descrição da presença do TNF-R2 em diferentes órgãos como, por exemplo, o rim, o cérebro e o ovário, estando sempre associado ao processo inflamatório devido à ativação do fator nuclear Kappa B (NF-kB)¹¹⁻¹³. Entretanto, não existe ainda descrição do TNF-R no colesteatoma.

Os dois receptores de TNF- α possuem atividades semelhantes. Estão envolvidos no processo inflamatório, relacionam-se à erosão óssea e podem desencadear a apoptose (morte celular programada), sendo esta última atividade associada principalmente ao TNF-R2. Entretanto, o mecanismo que determina qual efeito será dominante ainda não está totalmente esclarecido¹³.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão do receptor tipo dois do fator de necrose tumoral alfa (TNF-R2), empregando técnicas imunoistoquímicas, em fragmentos de colesteatomas adquiridos da orelha média e relacioná-la com o grau de inflamação presente.

MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo observacional do tipo transversal aprovado pelo comitê de ética da instituição Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, na qual foi realizado. O material constituiu-se de 68 fragmentos de colesteatomas obtidos de 68 pacientes submetidos à cirurgia otológica para remoção do colesteatoma adquirido da orelha média. As cirurgias foram realizadas no Departamento de Otorrinolaringologia desta instituição no período de agosto de 2007 a março de 2009. O diagnóstico da doença foi baseado na história clínica e exame físico dos pacientes. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por diferentes otorrinolaringologistas.

Foram excluídos deste estudo os fragmentos que não apresentavam epitélio (matriz) visível à microscopia óptica com a coloração de hematoxilina-eosina (HE), sendo excluídos 35 fragmentos. Desta forma, o total de fragmentos utilizados para este trabalho foi de 33 fragmentos.

Após a remoção dos fragmentos de colesteatoma, o material foi fixado em formol a 10% e processado pelas técnicas histológicas habituais com inclusão em parafina. Para avaliação histológica, foram considerados os padrões de: atrofia (matriz com espessura de no máximo quatro camadas de queratinócitos), acantose (aumento da espessura da matriz à custa da camada espinhosa), hiperplasia da camada basal (aumento do número de camadas de queratinócitos basais), formação de cones epiteliais (invaginações da matriz para o interior da perimatriz) e processo inflamatório presente na perimatriz. A avaliação foi realizada de forma qualitativa (presente ou ausente) e semiquantitativa, com graduação de 0 a 3 de acordo com a intensidade observada (ausente = 0; fraca = 1; moderada = 2 e grave = 3).

Para a imunoistoquímica, foi utilizado como anticorpo primário o TNF-R2 policlonal sintetizado a partir de ratos (Labvision®, EUA), na titulação de 1:100. O anticorpo secundário utilizado foi o Max Polymer Detection System (Kit Novo Link, Novocastra®, UK).

A avaliação imunoistoquímica foi realizada de forma qualitativa (presente ou ausente) e semiquantitativa, com graduação de 0 a 3 de acordo com a intensidade da coloração observada: ausente = 0; fraca = 1 (Figura 1); moderada = 2 (Figura 2) e grave = 3 (Figura 3).

As lâminas com fragmentos de colesteatoma foram

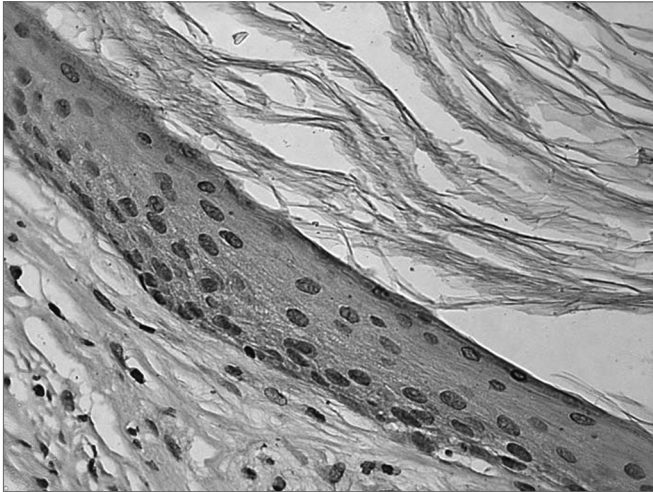


Figura 1. Fotomicrografia de fragmento de colesteatoma onde se observa reação fraca ao anticorpo TNF-R2 no citoplasma dos queratinócitos da matriz (IHQ X400).

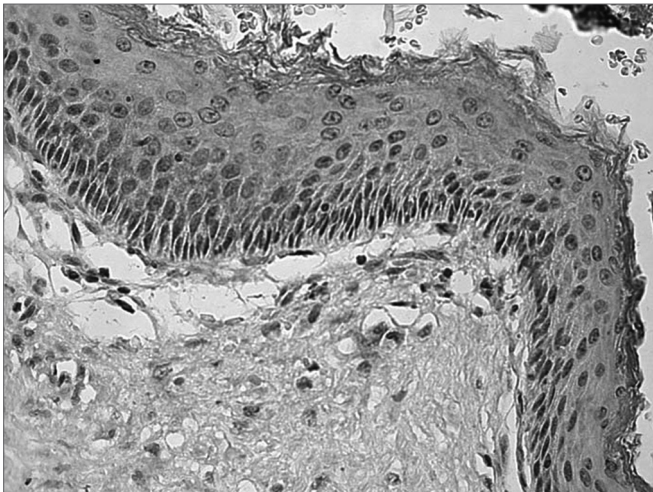


Figura 2. Fotomicrografia de fragmento de colesteatoma onde se observa reação moderada ao anticorpo TNF-R2 no citoplasma dos queratinócitos da matriz (IHQ X400).

analisadas com um microscópio óptico modelo Axioscope 40 (Carl Zeiss do Brasil), com ocular de 10X e objetiva de 10X, 20X e 40X, tanto para avaliação histológica quanto para a imunohistoquímica. Todas as lâminas foram avaliadas por três observadores independentes de maneira cega. O microscópio estava acoplado a uma câmera AxioCam MRC 5 (Zeiss) para a obtenção das imagens digitais do material, utilizando o software Axiovision 4.8.

Após a coleta de dados, foi montado um banco informatizado que foi submetido à análise estatística, com o auxílio do programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 13.0.

Realizou-se análise descritiva com cálculos de valores mínimos e máximos, média, mediana e desvio-padrão para a variável idade e cálculos de frequências absolutas e

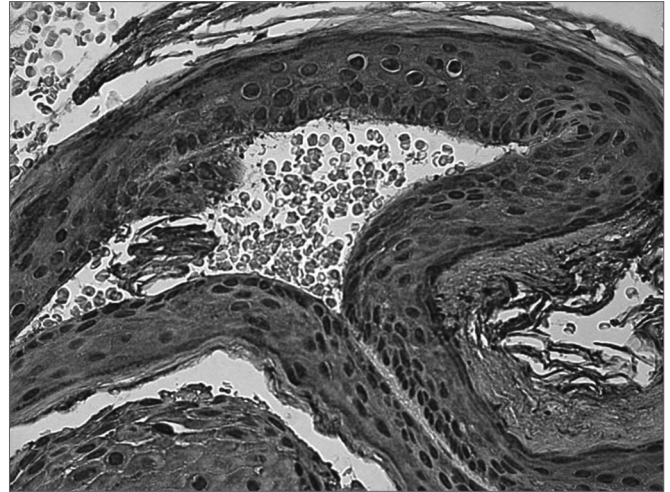


Figura 3. Fotomicrografia de fragmento de colesteatoma onde se observa reação grave ao anticorpo TNF-R2 no citoplasma dos queratinócitos da matriz (IHQ X400).

relativas para o gênero e para as variáveis histopatológicas e imunohistoquímicas.

Para a associação entre as variáveis qualitativas, foi utilizado o teste exato de Fisher. Para verificar a existência de correlações entre as variáveis quantitativas, utilizou-se o Coeficiente de Spearman.

Todos os testes foram realizados na forma bicaudal e admitindo-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Foram analisados 33 fragmentos de colesteatoma de 33 pacientes submetidos à cirurgia otológica, sendo 17 deles (51,5%) do gênero masculino e 16 (48,5%) do gênero feminino. A idade mínima foi de sete anos e a máxima de 70, com média de 30 anos, mediana de 31 anos e desvio-padrão de 16,4. Dos 33 pacientes incluídos no estudo, dois (6,1%) não sabiam referir o tempo decorrido desde o início dos sintomas até a admissão no Departamento de Otorrinolaringologia e a marcação da cirurgia. Dos 31 pacientes que informaram este dado, 13 referiram período de menos de cinco anos de doença (41,9%), sete mencionaram período entre seis e dez anos (22,6%), nove citaram período entre 11 e 20 anos (29%) e, em apenas dois pacientes, o tempo excedeu 20 anos (6,5%). O tempo decorrido desde o início dos sintomas até a admissão no Departamento de Otorrinolaringologia variou de um a 60 anos, com média de 11,5, mediana de oito anos e desvio-padrão de 11,6.

Em relação à orelha acometida pela doença, quatro pacientes (12,1%) apresentavam otite média crônica colesteatomatosa em ambas as orelhas e 29 (87,9%) tinham acometimento unilateral, sendo 15 (45,5%) em orelha direita e 14 (42,4%) em orelha esquerda.

Em relação aos sintomas clínicos referidos pelos pacientes na admissão, 31 (93,9%) relataram otorreia, 30 (90,9%) mencionaram hipoacusia e 27 (81,8%), episódios de tontura.

Em relação ao comprometimento da cadeia ossicular, 28 pacientes (84,8%) apresentavam erosão em algum dos ossículos e, em cinco (15,2%), não foi evidenciado comprometimento da cadeia na avaliação intraoperatória. Em relação ao ossículo acometido, 23 pacientes (69,7%) tiveram erosão do martelo, 23 (69,7%), da bigorna e 18 (54,5%) do estribo.

Além do comprometimento da cadeia ossicular, observou-se a presença de erosão do canal semicircular, exposição do nervo facial e da dura-máter. Houve erosão do canal semicircular em três pacientes (9,1%), exposição do nervo facial em seis (18,2%) e da dura-máter em cinco (15,2%).

A avaliação histológica evidenciou a presença de mais de um padrão histopatológico (atrofia, acantose, hiperplasia da camada basal e presença de cones epiteliais) simultaneamente na maioria dos fragmentos de colesteatoma analisados.

Devido à ausência de perimatriz em um dos 33 fragmentos estudados, não foi possível avaliar a intensidade da inflamação neste caso. Dos 32 casos restantes, a inflamação estava ausente em um (3,1%), fraca em 14 (43,8%), moderada em 13 (40,6%) e acentuada em quatro (12,5%) (Figura 4). O infiltrado inflamatório foi predominantemente linfoplasmocitário com áreas de neovascularização.

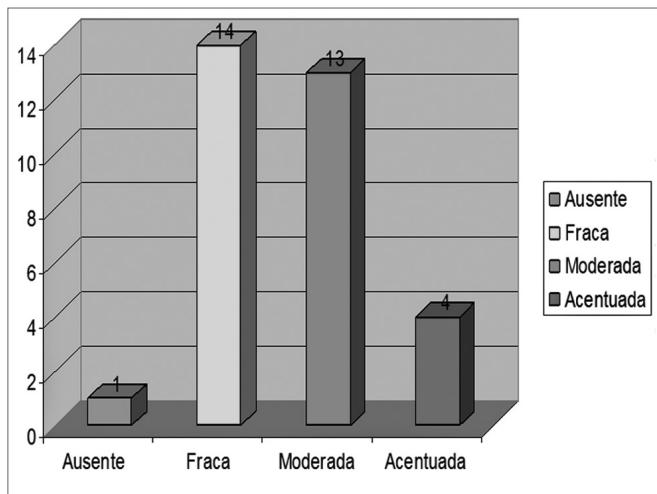


Figura 4. Análise da intensidade do processo inflamatório.

Na avaliação imunoistoquímica, foi observada a reação do anticorpo anti-TNF-R2 nas células da matriz em todos os fragmentos de colesteatomas analisados. Esta reação foi considerada fraca em 10 casos (30,3%), moderada em 18 (54,5%) e acentuada em cinco (15,2%)

(Figura 5). Além da reação citoplasmática, foi observada reação em quase todos os núcleos dos queratinócitos da matriz dos fragmentos analisados e também em núcleos das células inflamatórias da perimatriz.

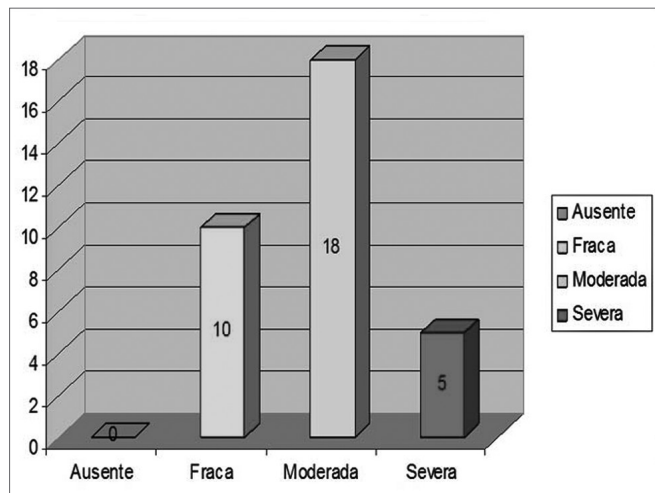


Figura 5. Distribuição do TNF-R2 nos fragmentos de colesteatoma analisados.

A análise estatística não evidenciou associação estatisticamente significativa entre o grau de inflamação presente no colesteatoma adquirido da orelha média e a presença do TNF-R2 ($p=0,589$). Também não foi demonstrada correlação positiva e estatisticamente significativa pelo coeficiente de correlação de Spearman ($p=0,155$).

DISCUSSÃO

O colesteatoma adquirido da orelha média é uma doença caracterizada pela invasão da cavidade timpânica por um epitélio (matriz) diferente do encontrado habitualmente dentro da orelha média. Histologicamente este epitélio é semelhante à pele normal³.

A análise histológica demonstrou que a matriz pode apresentar diferentes padrões histopatológicos, como atrofia, acantose, hiperplasia da camada basal e formação de cones epiteliais. Esses padrões frequentemente coexistem em um mesmo fragmento, como demonstrado no presente estudo. Esses achados histológicos estão de acordo com a literatura^{2,4}.

A avaliação da perimatriz dos fragmentos de colesteatomas evidenciou a presença de processo inflamatório em 96,9% dos casos, em diferentes intensidades. Este fato está de acordo com Pereira⁴ (2001) e Alves et al.² (2008), que observaram infiltrado inflamatório na perimatriz em 90,9% e 96,0%, respectivamente. Estes resultados são compatíveis com a história clínica do colesteatoma adquirido da orelha média, visto ser uma doença crônica que cursa, na maioria das vezes, com processo inflamatório e infeccioso intenso.

Essa reação inflamatória e infecciosa estaria relacionada à erosão óssea e às complicações promovidas por esta doença 14. A análise estatística, entretanto, não mostrou correlação, ou associação, entre a expressão do TNF-R2 e a intensidade do processo inflamatório.

Frequentemente, o colesteatoma causa erosão da cadeia ossicular. No presente estudo, durante o ato cirúrgico, a cadeia ossicular estava erodida em 84,4% dos pacientes. Estes dados corroboram os observados na literatura, que relatam erosão da cadeia ossicular em 91,5% dos pacientes¹⁴.

No presente estudo, os ossículos mais acometidos foram a bigorna, especialmente a sua apófise longa, e o martelo, ambos em 23 pacientes (69,7%). A erosão do estribo ocorreu em 18 pacientes (54,5%). Estes achados diferem de Tos¹⁵ e Dornelles et al.¹⁶, que observaram a erosão da bigorna como a mais frequente, seguida do estribo e, posteriormente, do martelo.

O colesteatoma adquirido da orelha média é uma doença que cursa com intenso processo inflamatório e infeccioso. Esta situação induz a produção e liberação de diferentes substâncias (citocinas e fatores de crescimento) que agem concomitantemente e em sinergismo, resultando nas características agressivas do colesteatoma⁹. Entre estas substâncias, destacam-se as interleucinas 1, 6 e 8, o TGF- α o TGF- β , o EGF, o KGF e, principalmente, o TNF- α , que é considerada uma das principais citocinas envolvidas nos processos inflamatórios e imunes¹⁷.

Existem dois receptores para o TNF- α , o TNF-R1 e o TNF-R2. O papel de cada um dos receptores do TNF- α não é totalmente conhecido¹³.

O intuito do presente estudo foi verificar a expressão do TNF-R2 por meio de técnicas imunoistoquímicas em fragmentos de colesteatomas adquiridos da orelha média e correlacioná-la à ao grau de inflamação observado na histologia.

No presente estudo, avaliou-se a expressão do TNF-R2, por meio de técnicas imunoistoquímicas, em fragmentos de colesteatomas adquiridos da orelha média. A reação ao TNF-R2 foi citoplasmática e ocorreu em todos os queratinócitos da matriz dos fragmentos analisados. Também ocorreu reação em algumas células inflamatórias da perimatriz (linfócitos e plasmócitos). Além da expressão do TNF-R2, foi observada a inflamação presente.

Realizou-se análise estatística para verificar se havia associação ou correlação entre a expressão do TNF-R2 e o grau de inflamação. Entretanto, no presente estudo, não se evidenciou o envolvimento do TNF-R2 na inflamação presente no colesteatoma. Ou seja, o receptor do TNF- α está presente no colesteatoma adquirido da orelha média, porém a sua expressão (quantidade de receptor) não está relacionada ao grau de inflamação observada. Entretanto, é necessário realizar estudos futuros com uma amostra maior de fragmentos de colesteatomas para que se obtenha uma

análise estatística mais fidedigna.

No presente trabalho, além da reação citoplasmática (padrão) decorrente da ligação entre o TNF- α e o TNF-R2, também foi detectada uma expressão nuclear significativa em todas as lâminas avaliadas, em células epiteliais da matriz e em algumas células do infiltrado inflamatório da perimatriz (linfócitos e plasmócitos). Esta reação pode indicar uma reação cruzada com alguma proteína do núcleo celular, entretanto, deve ser mais bem avaliada em estudos futuros.

CONCLUSÕES

1) O TNF-R2 está presente na matriz dos colesteatomas adquiridos da orelha média.

2) Não foi possível correlacionar a expressão do TNF-R2 com o grau de inflamação presente no colesteatoma adquirido da orelha média.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ribeiro FAQ, Pereira CSB. Otite média crônica colesteatomatosa In: SBORL. Tratado de Otorrinolaringologia. São Paulo: Editora Roca; 2003.p.93-102.
2. Alves AL, Pereira CSB, Ribeiro FAQ, Fregnani JHTG. Análise dos padrões histopatológicos do colesteatoma adquirido da orelha média. Braz J Otorhinolaryngol. 2008;74(6):835-41.
3. Lim DJ, Saunders WH. Acquired cholesteatoma: light and electron microscopic observation. Ann Otol. 1972;81:2-12.
4. Pereira CSB. Imunoexpressão da citoqueratina 16 e do antígeno nuclear Ki-67 no colesteatoma adquirido da orelha média. Tese (doutorado). São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2001.
5. Kurihara A, Toshima M, Yuasa R, Takasaka T. Bone destruction mechanisms in chronic otitis media with cholesteatoma: specific production by cholesteatoma tissue in culture of bone-resorbing activity attributable to interleukin-1 alpha. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1991;100(12):989-98.
6. Lessa HA, Freitas EB, Cruz OLM. Complicações das otites médias. In: SBORL. Tratado de otorrinolaringologia. São Paulo: Editora Roca; 2003. p 43-9.
7. Iino K, Toriyama M, Ogawa H, Kawakami M. Cholesteatoma debris as an activator of human monocytes. Acta otolaryngol. 1990;110:410-5.
8. Kreutzer DL, Yellon RF, Leonard G, Marucha PT, Craven R, Carpenter RJ et al. Characterization of cytokines present in middle ear effusions. Laryngoscope. 1991;101:165-9.
9. Alves AL, Ribeiro FAQ. O papel das citocinas no colesteatoma adquirido da orelha média: revisão da literatura. Rev Bras Otorrinolaringol. 2004;70(6):813-8.
10. Vitale RF, Ribeiro FAQ. O papel do fator de necrose tumoral Alfa no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. Braz J Otorhinolaryngol. 2007;73(1):123-7.
11. Ramesh G, Reeves WB. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. Am J Physiol Renal Physiol. 2003;285(4):F610-8.
12. Abdo M, Hisheh S, Arfuso F, Dharmarajan A. The expression of tumor necrosis factor-alpha, its receptors and steroidogenic acute regulatory protein during corpus luteum regression. Reprod Biol Endocrinol. 2008;6:50-61.
13. Bingham CO. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. J Rheumatol Suppl. 2002;65:3-9

-
14. Amar MS; Wishahi HF; Zakhary MM. Clinical and biochemical studies of bone destruction in cholesteatoma. *J Laryngol Otol.* 1996;110(6):534-9.
 15. Tos M. Pathology of the ossicular chain in various chronic middle ear diseases. *J Laryngol Otol.* 1979;93:769-80.
 16. Dornelles C, Rosito LPS, Meurer L, Costa SS, Argenta A, Alves SL. Correlação da cadeia ossicular no transoperatório com achados histológicos de colesteatomas. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007;73(6):738-43.
 17. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Citocinas. Imunologia celular e molecular.* 2nd ed. Rio de Janeiro: Revinter;1998. p.253-76.