



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

## **FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS DR. ISMAEL COSIO VILLEGAS**

***RESPUESTA INFLAMATORIA LOCAL EN LA OTITIS MEDIA  
CRÓNICA COLESTEATOMATOSA (OMCC)***

### **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**ESPECIALISTA EN OTORRINOLARINGOLOGÍA Y  
CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO**

**P R E S E N T A:**

**DR. GABRIEL CARRASCO BARRERA**

**ASESOR DE TESIS: DRA. LISETTE CRISTERNA SÁNCHEZ  
COASESOR DE TESIS: DRA. GPE. JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA  
COASESOR DE TESIS: DR. ANTONIO SODA MERHY**

**MÉXICO, D.F.**

**AGOSTO 2010**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

Dra. Lisette Cristerna Sánchez  
Médico Adscrito al Departamento de Otorrinolaringología INER  
Asesor de Tesis

---

Dra. Gpe. Janette Furuzawa Carballada  
Dra. en I.B.D. Investigadora en Ciencias Depto. Inmunología y Reumatología INCMNSZ  
Co-asesor de Tesis

---

Dr. Antonio Soda Merhy  
Profesor Titular del Curso de Especialización en Otorrinolaringología INER  
Co-asesor de Tesis

---

Dr. Arturo Ramírez García  
Jefe del Departamento de Otorrinolaringología INER  
Co-asesor de Tesis

---

Dra. Ma. Eugenia Vázquez Manríquez  
Jefe del Servicio de Anatomía Patológica INER  
Co-asesor de Tesis

---

Dr. Jorge Salas Hernández  
Director de Enseñanza INER

## AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por haberme dado la familia que tengo y por haber puesto en mi camino a cada una de las personas que él tenía designadas para enseñarme, regañarme y corregirme, porque ahora comprendo que su fin era hacerme una mejor persona.

Agradezco a mi familia que amo profundamente aunque muchas veces no lo exprese, a mis padres, Arturo y Teresa por saber que siempre puedo contar con ellos, por reconfortarme en mis momentos de tristeza, apoyarme en todo momento y por haberse esforzado tanto para darme la educación que tuve a pesar de los problemas que pudieron haberse presentado; a mi hermana Angela Patricia por ser parte de mi vida, por darme tantos consejos y enseñarme a luchar por lo que quiero.

Gracias a Janette por enseñarme el verdadero valor de la amistad y por apoyarme en todo momento a pesar de sus problemas.

Agradezco al Dr. Rafael Andraca por haber sembrado en mí la semilla de la pasión por la otorrinolaringología, por haberme enseñado a tener prioridades, a fijarme metas y luchar por ellas.

Agradezco a mis maestros de la carrera; al Dr. Antonio Soda, por haberme elegido para realizar la especialidad en esta sede tan maravillosa y haber confiado en mí para ser jefe de residentes; al Dr. Arturo Ramírez, al Dr. Gabriel Tona y al Dr. Bernardo Dávila por su apoyo y sus enseñanzas; a la Dra. Carmen Tirado y a la Dra. Lizette Carranco por tanta paciencia y enseñanzas cuando roté por audiología, a la Dra. Ma. Lidia Sánchez por su paciencia por las tardes y por enseñarme a ver la vida desde otro punto de vista, gracias por su comida; al Dr. Fernando Arredondo por ser mi hermano mayor de la carrera, por confiar en mí tantas veces y darme seguridad en mí mismo, al Dr. Alejandro Jiménez por ofrecerme su amistad y enseñarme que se puede ser maestro y amigo al mismo tiempo, respetando la jerarquía hospitalaria; gracias por el apoyo que me ha dado en ésta época tan importante de mi vida.

Gracias a la Dra. Lisette Cristerna quien se preocupó desde un inicio por mi formación, no solo como médico, sino como persona; gracias por tantos consejos que me ha dado para la vida, por haberme enseñado a que todas las cosas tienen una razón de ser y que no importa cuántos obstáculos se te presenten, si deseas algo debes luchar por ello, gracias por todos los conocimientos que me ha compartido y por enseñarme a tener siempre el interés por aprender. Gracias por haber dirigido ésta tesis.

Gracias a Anita, a mis 2 Cecis, a Esthersita y a Ema por su amistad y por alivianarme con su alegría cuando el trabajo era muy pesado y el cansancio grande, gracias a Gabi a Irma a Jessy y a Andrea porque su trabajo facilita el nuestro.

Gracias a mis compañeros de la residencia por compartir tantos momentos y haber crecido juntos, a mi Laurita por su amistad, por ser un apoyo tan importante y por todos los momentos tan padres que pasamos, sin tí la residencia habría sido muy diferente; si no hubieras estado en las máquinas aquella tarde, igual y no hubiera conseguido novia y futura esposa. Gracias a Jaime por hacerme reír tanto y por enseñarme a preocuparme por las cosas que realmente lo merecen. A mis amigos y compañeros Iván Schobert, Daniel Figueredo y Mario Dávalos por compartirme sus conocimientos y por tantos momentos divertidos, por enseñarme la diferencia entre amistad y trabajo.

Gracias a mi amor y futura esposa Nidia, porque me ha alentado a ir siempre hacia adelante, por enseñarme que a pesar de los obstáculos Dios siempre quiere para tí lo mejor, por su apoyo y ecuanimidad cuando estoy enojado o preocupado, porque me ha enseñado a superarme, gracias porque a pesar de estar lejos hemos aprendido a confiar el uno en el otro y a ser un apoyo a pesar de la distancia, gracias por enseñarme que en la vida el que arriesga puede ganar o perder y en mi caso, GANÉ, TE AMO.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. RESUMEN   | 1  |
| 2. MARCO TEÓRICO                                       | 3  |
| 3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 8  |
| 4. JUSTIFICACIÓN                                       | 9  |
| 5. OBJETIVOS   | 10 |
| 6. HIPÓTESIS   | 11 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS                                | 12 |
| 8. RESULTADOS  | 18 |
| 9. DISCUSIÓN   | 23 |
| 10. CONCLUSIÓN   | 28 |
| 11. BIBLIOGRAFIA                                       | 30 |
| 12. ANEXOS   | 33 |

## 1. RESUMEN

La otitis media crónica colestomatosa (OMCC) es un problema inflamatorio frecuente, localizado en el oído medio (OM) y la mastoides. El colesteatoma es una lesión quística y expansiva delineada por epitelio escamoso estratificado así como descamación de queratina que al acumularse causa infección, otorrea, y destrucción ósea, con la consecuente afección a estructuras como el scutum, la cadena osicular, el nervio facial y los canales semicirculares, especialmente el horizontal, entre otras estructuras óseas. Se han postulado distintos mecanismos para la destrucción de hueso observada; por expansión del mismo colesteatoma, por las endotoxinas bacterianas y otra en la que la inflamación crónica promueve la activación osteoclástica a través de un gran número de citocinas proinflamatorias, por lo se ha postulado que la respuesta inmune tiene especial importancia en las alteraciones del crecimiento epitelial y lisis del hueso. **Objetivos:** Determinar la relación entre la expresión de factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), metaloproteasa-9 (MMP-9) y otras moléculas proinflamatorias/fibrogénicas con la destrucción ósea observada en la OMCC. **Métodos:** Se incluyeron 22 muestras de colesteatoma y de piel del tercio medio del conducto auditivo externo ipsilateral (CAE) en el mismo tiempo quirúrgico. Mediante inmunohistoquímica se realizó la cuantificación de TNF- $\alpha$ , factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), proteína morfogenética de hueso<sub>2/4</sub>

(BMP<sub>2/4</sub>), MMP-1, MMP-9 y el antígeno de proliferación Ki-67 y se correlacionaron con las complicaciones observadas. **Resultados:** A los pacientes reclutados se les realizó mastoidectomía para la resección del colesteatoma. El 50% de los pacientes fueron hombres (n=11). El 68.2% presentó lisis de escútum; el 90.0% afección de la cadena; el 13.6% fístula laberíntica y el 13.6% facial dehiscente. Se determinó una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células inmunorreactivas expresadas en la piel del CAE en comparación con el propio colesteatoma para TNF- $\alpha$  ( p = 0.001) así como para BMP<sub>2/4</sub> y Ki-67 (p < 0.001). **Conclusión:**

En el presente estudio observamos una mayor producción de citocinas, así como de la proliferación celular en el tejido cutáneo del CAE adyacente al colesteatoma comparado con la lesión colesteatomatosa.

Dicha piel así como las citocinas producidas por la misma podrían tener gran importancia para la perpetuación de la enfermedad, produciendo migración continua de células epiteliales y citocinas hacia caja timpánica, así como estimulación de osteoclastos que continúen produciendo destrucción ósea. Para poder correlacionar de forma significativa las concentraciones de los mediadores inflamatorios estudiados y la osteolisis observada requerimos de una población mayor.

## 2. MARCO TEÓRICO

### ANTECEDENTES

La otitis media crónica colestomatosa (OMCC) es un problema inflamatorio frecuente en el oído medio (OM) y la mastoides, asociada con la perforación de la membrana timpánica, lo anterior sugiere que el colesteatoma pudiera estar relacionado con la implantación de epitelio escamoso en OM (1). La etiología del colesteatoma en caja timpánica no queda del todo clara, no obstante, se han postulado diferentes teorías entre las cuales se encuentran **(A) la de la migración**, propuesta por Habermann en 1888, dicha teoría sugiere que el epitelio escamoso del canal auditivo externo migra a través de la perforación de la membrana timpánica hacia oído medio; **(B) la teoría de la bolsa de retracción** propuesta por Bezold en 1881, en la cual se relaciona una disfunción de la trompa de Eustaquio con la presión negativa dentro de la caja timpánica; **(C) la teoría de la metaplasia escamosa**, planteada por Ulrich en 1917, sugiere una diferenciación de las células de la mucosa del oído medio a un epitelio escamoso queratinizado, por último **(D) la teoría de la hiperplasia de células basales**, propuesta por Lange en 1925, la cual sugiere una proliferación papilar en las células epidérmicas de la Pars flácida del tímpano (18).

El colesteatoma es una lesión quística, suave, con una cubierta blanquecina, al realizar el corte de la lesión la evaluación macroscópica revela la presencia de un contenido de consistencia cremosa o serosa y de color blanquecino, rodeado por una cápsula delgada. Histológicamente los colesteatomas aparecen como lesiones quísticas con detritus queratináceos delineados por epitelio escamoso



estratificado queratinizado que contiene todas las capas de la epidermis normal, existen áreas de inflamación crónica, fibrosis y calcificación distrófica alrededor de la lesión primaria. Es una lesión destructiva del hueso temporal que gradualmente se expande y causa complicaciones por erosión de las estructuras óseas adyacentes(2). Dicha resorción puede resultar en la destrucción de la cadena osicular y la cápsula ótica, con las subsecuentes afecciones en la función vestibular, audición, parálisis facial y complicaciones intracraneales. Osma reportó que el 78% de los pacientes que presentaban complicaciones secundarias a la otitis media crónica (OMC) presentaban colesteatoma subyacente. La complicación más frecuente es la fístula laberíntica (FP) en 7% con un 90% de afección al canal semicircular horizontal (CSH); en un estudio realizado por Soda y cols. se reportó una incidencia de FP en el 7.5 % de los pacientes localizándose el 88% de las mismas en CSH (3, 4). Otra estructura comúnmente afectada es el nervio facial debido a su largo trayecto a través del hueso temporal dentro del canal de Falopio.

La destrucción ósea observada en la OMC colesteatomatosa parece estar mediada por tres factores principales: el factor mecánico, dado por la presión ejercida por el colesteatoma al ir acumulando queratina; el factor bioquímico, dado por endotoxinas bacterianas, colagenasas, hidrolasas y sustancias inherentes al colesteatoma como citocinas y factores de crecimiento; y el aumento en la actividad osteoclástica (1).

Se desconoce a profundidad el mecanismo inmunológico implicado en la génesis y recidiva de esta entidad, con respecto al papel que juegan las

citocinas pro-inflamatorias/fibrogénicas, los factores de crecimiento, las moléculas de adhesión y las proteasas, se cree que estas moléculas participan en las alteraciones del crecimiento epitelial y la lisis del hueso. Para demostrar la participación de éstas en la etio y fisiopatogenia del padecimiento, se han desarrollado varios modelos animales. Un estudio realizado por Ottaviani y cols. en tejido colesteatomatoso mostró la sobreexpresión de la molécula intercelular de adhesión-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión de leucocitos al endotelio-1 (ELAM-1), así como de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), las cuales en conjunto participan en el reclutamiento de las células inflamatorias, lo que sugiere que las células epiteliales del colesteatoma de oído medio se encuentran en un estado de activación persistente y que su hiperproliferación es mediada por citocinas y moléculas de adhesión (6). Massuda y cols. concluyeron que las células inflamatorias presentes en el colesteatoma expresan interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, factores de crecimiento y quimiotácticos que causan migración de las células del epitelio escamoso del CAE al oído medio.

También se ha reportado que las células del tejido colesteatomatoso producen una mayor concentración de IL-6 y TNF- $\alpha$  lo cual agrava la enfermedad por su acción en el sistema mucociliar, por aumentar la proliferación de células del colesteatoma y la activación del catabolismo óseo (7). Un estudio realizado por Yoshikawa mostró que los fibroblastos de muestras de colesteatoma al ser estimulados con IL-1 $\alpha$  aumentan la expresión de RNA mensajero del factor de crecimiento de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), del factor de

crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) y de la molécula de adhesión ICAM-1, lo cual tiene relevancia en la hiperqueratosis de oído medio (8).

La importancia adjudicada al TNF- $\alpha$  en la fisiopatogenia del colesteatoma está dada por ser un importante mediador en los procesos de remodelación y erosión ósea, al estimular la producción de colagenasas y de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) por los fibroblastos.

Li y cols., realizaron un análisis inmunohistoquímico para determinar la producción de MMP-9 y TNF- $\alpha$  en el tejido colesteatomatoso, encontrando que las células estromales de dicho tejido son las que producen los factores y por lo tanto la destrucción ósea (9). Tokuriki reportó un aumento significativo en la inducción de genes involucrados en la proliferación, diferenciación celular e invasividad celular, entre los que se encuentra la MMP- 9 en el tejido colesteatomatoso. La asociación de TNF- $\alpha$  y MMP-9 no es nueva ya que dichas moléculas están íntimamente ligadas en procesos inflamatorios crónicos en los que hay pérdida del estroma fibroso.

La MMP-9 pertenece a la familia de las metaloproteasas. La MMP-9 degrada a la matriz extracelular desmineralizada (gelatina) y su presencia ha sido ampliamente relacionada a la lesión colesteatomatosa. La regulación de la síntesis y expresión de la MMP-9 se lleva a cabo por el TNF- $\alpha$ ; lo cual es un indicador de la correlación positiva de ambos factores, tal como se observa en el epitelio suprabasal de dicha lesión (10). Jason desarrolló un modelo de disfunción tubárica en gerbos en la que se presenta un incremento en los niveles de MMPs y de TNF- $\alpha$ , las cuales a su vez, provocan mayor inflamación y

atelectasia de la membrana timpánica desencadenando la perpetuación del ciclo que concluye con el desarrollo del colesteatoma (11). Yan y cols., demostraron *in vitro* que el TNF- $\alpha$  induce células con actividad osteoclástica que producen la desmineralización ósea debido a la producción de fosfatasa ácida. Asimismo, se ha reportado que en los sobrenadantes del tejido colesteatomatoso, la presencia de MMP-9 es directamente proporcional a la concentración del TNF- $\alpha$  (12,13).

### **3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

Dentro de la evolución clínica de la OMC colesteatomatosa, existen pacientes en los cuales la afección de estructuras óseas dentro de la cavidad timpánica, se realiza de forma mas acelerada que en otros, dicha diferencia podría estar dada por la mayor producción de citocinas y moléculas de adhesión en las células estromales del colesteatoma

### **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existe una relación entre la expresión de TNF- $\alpha$ , MMP-9 y otras moléculas pro-inflamatorias con el grado de destrucción ósea en la OMC colesteatomatosa?

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El mecanismo, mediante el cual se lleva a cabo y se perpetua el proceso inflamatorio, de remodelación ósea y fibrosis en la OMCC es multifactorial y no se encuentra del todo claro. Sin embargo, en modelos *in vivo* e *in vitro*, se ha observado que ciertas citocinas y moléculas de adhesión, las cuales son producidas por las células estromales de la lesión juegan un papel importante, ya que aumentan la resorción de hueso, propician la migración de las células epiteliales del CAE a oído medio y causan alteraciones de la función mucociliar. Debido a lo anterior se hace necesario identificar dichas moléculas en el tejido colesteatomatoso, para entender la fisiopatología de la OMCC. De forma más específica, el factor de inflamación TNF- $\alpha$  y la MMP-9 han sido reportados en la literatura como factores que en conjunción presentan características y funciones sinérgicas en las que se aumenta la producción de otras citocinas inflamatorias que a su vez inducen la quimiotaxis de grupos celulares con características osteoclásticas. No obstante, no se ha podido correlacionar la mayoría de los mecanismos intermedios implicados en la osteolisis, por lo que determinar la importancia que tienen estos dos factores puede contribuir al mejor entendimiento de la fisiopatología de esta entidad. Entendiendo el mecanismo fisiopatogénico implicado en la OMC colesteatomatosa podríamos prevenir y optimizar las propuestas terapéuticas para reducir las complicaciones de dicha patología, así como evitar las recidivas y recurrencias.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general:

- Determinar la relación entre la expresión de las moléculas TNF- $\alpha$  y MMP- 9 con la destrucción ósea en la OMC colesteatomatosa.

### Objetivos específicos:

- Analizar la arquitectura tisular del tejido colesteatomatoso y del CAE adyacente en muestras teñidas con el método de Herovici.
- Determinar los niveles de MMP-9 en el tejido colesteatomatoso y de piel adyacente del CAE y su relación con la lisis ósea en la OMC colesteatomatosa.
- Evaluar los niveles de TNF- $\alpha$  en el tejido colesteatomatoso y piel adyacente del CAE y su relación con la destrucción de hueso en la OMC colesteatomatosa.
- Determinar por inmunoperoxidasa la presencia de MMP-1, MMP-9, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 y BMP<sub>2/4</sub> en el colesteatoma y la piel del CAE.
- Cuantificar la proliferación celular del tejido colesteatomatoso y del CAE mediante la presencia del antígeno Ki-67.

## **6. HIPÓTESIS**

### **Hipótesis alterna.**

A mayor expresión de las moléculas TNF- $\alpha$  y MMP-9 existe mayor grado de destrucción ósea en la OMC colesteatomatosa.

### **Hipótesis nula.**

No existen diferencias entre la expresión de las moléculas TNF- $\alpha$  y MMP-9 y el grado de destrucción ósea en la OMC colesteatomatosa.



## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

**Diseño del estudio:** Estudio transversal, observacional, comparativo, descriptivo.

### **Cálculo de la muestra**

Pacientes: No se determinará tamaño de muestra ya que es un estudio piloto.

Se incluirán a todos los pacientes operados de mastoidectomía por OMCC en el INER, que cumplan con los criterios de inclusión.

Controles: Se incluirá un control, de piel tomada del tercio medio del conducto auditivo externo (CAE) ipsilateral del paciente, durante el mismo tiempo quirúrgico.

### **Criterios de selección:**

Población objetivo: Pacientes con OMC colesteatomatosa

Población elegible: Todos los pacientes con OMC colesteatomatosa tratados quirúrgicamente en el INER cuya muestra sea fijada máximo 2 horas posterior al procedimiento quirúrgico.

### **Criterios de inclusión**

- Pacientes con diagnóstico clínico de OMC colesteatomatosa.
- Confirmación histopatológica de colesteatoma.
- Aceptación para participar en el estudio y firma del consentimiento informado.

### **Criterios de exclusión**

- Enfermedades que alteren el aclaramiento mucociliar: discinesia ciliar primaria, fibrosis quística.

- Inmunodeficiencias primarias o secundarias.
- Pacientes con cirugía otológica previa fuera del INER.

### **Variables a medir**

Variables principales:

- Expresión de MMP-1 y -9 en tejido colesteatomatoso y de piel del CAE.
- Expresión de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, BMP<sub>2/4</sub> en tejido colesteatomatoso y de piel del CAE.
- Expresión de Ki-67 como marcador de proliferación celular.
- Grado de destrucción ósea.
- Determinar presencia de colágenas tipo I y III, así como de infiltrados inflamatorios mediante la tinción de Herovici.

Variables secundarias:

- Edad
- Género
- Tiempo de evolución de la enfermedad

Variable Dependiente:

- Grado de destrucción ósea: fístula laberíntica, erosión del canal de Falopio, erosión de la cadena osicular, erosión de tegmen timpani, observadas tomográficamente y transoperatoriamente así como tiempo de evolución.

Variable Independiente:

- Expresión de TNF- $\alpha$ , MMP-9 y otras moléculas de inflamatorias, edad, género y tiempo de evolución.

### **Medición de las variables:**

Todos los pacientes serán valorados en una única ocasión al medir las moléculas pro-inflamatorias/fibrogénicas (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 y BMP<sub>2/4</sub>) la proteínas con actividad proteolítica (MMP-1 y MMP-9) y la proliferación celular (Ki-67) mediante la técnica de inmunohistoquímica en el tejido colesteatomatoso resecado, el cual deberá ser confirmado histopatológicamente como colesteatoma previo a su análisis.

El grado de erosión ósea se valorará tomográficamente y transoperatoriamente en función de la afección al escútum, disrupción de cadena osicular, dehiscencia de tegmen tímpani, presencia de fístula de canal semicircular lateral y dehiscencia del facial.

### **Diagnóstico histopatológico**

Los colesteatomas son lesiones quísticas, suaves, con una cubierta blanquecina, al realizar el corte de la lesión el contenido es de consistencia cremosa o serosa y de color blanquecino rodeado por una cápsula delgada. Histológicamente los colesteatomas usualmente aparecen como lesiones quísticas con detritus queratináceos delineado por un epitelio escamoso estratificado queratinizado el cual contiene todas las capas de la epidermis

normal, existen áreas de inflamación crónica, fibrosis y calcificación distrófica alrededor de la lesión primaria.

### **Histología**

Los tejidos se tiñeron de acuerdo a la técnica de Herovici (1963), en la cual una mezcla de ácido pícrico, azul de metilo y fucsina ácida permiten la diferenciación de la agregación de las fibras de colágena tipo I (haces más gruesos en su mayoría) que se tiñen en magenta y las de tipo III y colágena joven en azul (haces más delgados).

### **Técnica de inmunohistoquímica o inmunoperoxidasa**

Para la técnica de inmunoperoxidasa se emplearon cortes de tejido embebidos en parafina. Los tejidos hidratados se incubaron con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % (JT Baker) durante 20 min. Los sitios de pegado inespecífico se bloquearon con un suero no relacionado (Santa Cruz, CA) durante 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los tejidos se incubaron durante 18 h a 4°C con el anticuerpo primario, una inmunoglobulina monoclonal de tipo IgG/k preparado en ratón anti-Ki-67 o anti-TGFβ-1 humanos o un anticuerpo policlonal preparado en conejo anti-TNF-α, o un anticuerpo policlonal de chivo anti-BMP<sub>2/4</sub> a una concentración de 10 µg/ml (Santa Cruz, CA). Se empleó el anticuerpo secundario biotinado correspondiente y los tejidos se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación se empleó el complejo avidina-peroxidasa (VECTASTAIN Elit ABC Kit, Vector Lab), con el que se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción se desarrolló en 10 min, empleando una solución de 6 mg de diaminobencidina en 10 ml de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4 y 10 µl

de  $H_2O_2$  que produce un precipitado color sepia en las células inmunorreactivas. Las muestras se contratiñeron con hematoxilina de Harris durante 10 min, se deshidrataron con alcohol y xileno y finalmente se montaron con resina. Durante el ensayo se corrió un control negativo en el que se sustituyó el primer anticuerpo por uno no relacionado (suero normal de caballo diluido 1:100) y un blanco de reactivos en el que se reemplazó el anticuerpo primario por albúmina de huevo al 3% en PBS 0.01 M, pH 7.4. Al menos 2 secciones de 2 diferentes tejidos fueron analizadas en cada paciente en un análisis ciego. La expresión de las moléculas analizadas se reportó determinando el número de células inmunorreactivas al anticuerpo de un total de 400 células a lo largo de un campo (16X) elegido al azar. La cuantificación se realizó de forma automatizada empleando el programa analizador de imágenes Image-Pro Plus 5.1 (Ascencio D, 2004; Furuzawa-Carballeda J, 1999). Los valores representan el promedio del porcentaje de las células inmunorreactivas  $\pm$  error estándar (E.S.) (Krötzsch-Gómez FE, 1998)

### **Análisis estadístico**

#### Análisis univariado

- a) Variables numéricas con distribución normal: se utilizó Media  $\pm$  desviación Standard.
- b) Variables numéricas con distribución no normal: mediana  $\pm$  Intervalo, moda, mínimos y máximos.
- c) Para variables categóricas: Chi cuadrada, porcentajes y frecuencias.

Se realizaron gráficas de barras y pastel, histogramas y gráficas de caja y bigotes.

## Análisis bivariado

- a) Variables numéricas con distribución normal: se utilizará T de student para comparación de promedios o Anova.
- b) Para las variables numéricas de distribución no normal: U de Mann Whitney para comparar promedio o Kruskal- Wallis.
- c) Para las variables categóricas se usó Chi cuadrada para comparar proporciones.

## Análisis multivariado

Para valorar todas aquellas variables que se relacionaron de manera independiente con el grado de complicaciones en la OMC colesteatomatosa se utilizó un modelo de regresión logística. Sin embargo al obtenerse significancias muy aisladas no se realizó correlación de Spearman. Se considerará estadísticamente significativa una  $P < 0.05$ . Para análisis de datos se utilizará el programa Sigma Stat 3.0 y SPSS 12.0

## **Consideraciones éticas**

Se incluyó una carta de consentimiento informado apegada a la Ley General de Salud, a la Conferencia Internacional de Armonización y a las Buenas Prácticas Clínicas. El proyecto fue sometido a revisión y aprobado por los Comités de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Este proyecto según el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia para Investigación para la Salud corresponde a una investigación con riesgo mínimo. El formato de consentimiento informado se incluye en el apartado de anexos.

## **8. RESULTADOS**

### **Datos demográficos y clínicos**

Se reclutaron 22 pacientes a los cuales se realizó mastoidectomía para la resección del colesteatoma. Once pacientes (50%) fueron hombres con una mediana de la edad de 36.5 años (intervalo 10– 73 años). El tiempo de evolución de la OMC colesteatomatosa tuvo una mediana de 18.5 años (intervalo 4– 63 años). De los 22 pacientes intervenidos, 14 (63.6%) presentaron OMCC unilateral.

### **Hallazgos tomográficos y transoperatorios**

Se observó una alta correlación entre hallazgos tomográficos y transoperatorios mediante el índice correlación Spearman para lisis del scutum con IC de 0.904  $p < 0.001$  y para fístula laberíntica de 0.869 con  $p < 0.001$  (Tabla 1). La erosión ósea más frecuentemente observada fue en la cadena osicular (90.9%), seguida por lisis del scutum en (68.2%). Dentro de las complicaciones intratemporales de forma prequirúrgica, se observaron dos pacientes con parálisis facial (9.1 %) y un paciente con desarrollo de absceso subperióstico (4.55%) (Figura 1, Tabla 1 y 2).

## **Análisis histológico de las lesiones colesteatomatosas y de la piel del tercio del conducto auditivo externo.**

Los cortes histológicos de la piel del CAE y colesteatoma, fueron identificados con la técnica de Herovici de la siguiente manera: 1) las fibras de colágena tipo III y la colágena joven de tipo I ó III tiñen en color azul. 2) Las fibras de colágena tipo I y los haces gruesos de las fibras tiñen en color rojo-magenta. La queratina se tiñe de color amarillo y los núcleos de las células en color negro.

La lesión del colesteatoma se encontraba constituida en su mayoría por tejido fibroso en la parte central, encapsulado por un epitelio plano estratificado queratinizado. Los componentes principales del tejido fibroso fueron fibras jóvenes de colágena tipo I y tipo III (tejido teñido en color azul). Así mismo el tejido manifestó hipocelularidad con células de poca actividad metabólica (fibroblastos y c. endoteliales), determinado mediante el análisis inmunohistoquímico para proliferación celular con el antígeno Ki-67 y para la síntesis de citocinas y proteasas. El epitelio de la cápsula presentó zonas de acantosis e hiperqueratosis, lo cual es inusual en el tejido del oído medio ya que éste se caracteriza por ser un epitelio cilíndrico ciliado no queratinizado (Figura 2A).

El análisis histológico de la piel del tercio medio de CAE, correspondió al de un epitelio plano estratificado queratinizado normal. El componente principal de la dermis papilar, fue la colágena tipo III (azul) y en la reticular la colágena tipo I (rojo-magenta). En la dermis papilar y en la reticular, se observó un componente inflamatorio crónico abundante, con hipervascularización. En el estrato córneo,



de forma ocasional, se determinaron zonas de acantosis e hiperqueratosis. Comparado con el tejido colesteatomatoso, fue en este último tejido y particularmente en la dermis papilar, donde se observó la mayor producción de citocinas pro-inflamatorias y fibrogénicas (TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1), de actividad proteolítica (MMP-9) y osteogénica (BMP<sub>2/4</sub>), (Figura 3B-G, 4 y Tabla 3).

### **Expresión de citocinas pro-inflamatorias y fibrogénicas (TNF- $\alpha$ y TGF- $\beta$ 1) en el colesteatoma y la piel del CAE adyacente al colesteatoma**

Al realizar la cuantificación de las células que expresan al TNF- $\alpha$ , un factor pro-inflamatorio por excelencia, observamos un porcentaje de células menor y estadísticamente significativo en el tejido colesteatomatoso comparado con la piel del CAE ( $14.7 \pm 5.2\%$  vs.  $24.7 \pm 3.8\%$ ;  $p = 0.001$ ) (Figuras 2C, 3C y 4 ).

El TGF- $\beta$ 1, el cual se ha descrito como un factor pro-inflamatorio y fibrogénico, tuvo expresión aumentada en piel y colesteatoma, sin presentar diferencias estadísticamente significativas. ( $17.0 \pm 3.7\%$  vs.  $14.5 \pm 2.8\%$ ) (Figuras 2E, 3E y 4, Tablas 3, 4 y 5).

### **Expresión de la citocina osteogénica (BMP<sub>2/4</sub>) en el colesteatoma y la piel del CAE adyacente al colesteatoma**

La determinación de la expresión del factor osteogénico, la BMP<sub>2/4</sub>, evidenció un menor porcentaje de células inmunorreactivas en el colesteatoma comparado con la piel del CAE ( $3.9 \pm 0.9\%$  vs.  $16.4 \pm 2.0\%$ ;  $p < 0.001$ ; Figuras 2B, 3B y 4, Tablas 3, 4 y 5).

### **Expresión de la MMP-1 y MMP-9 en el colesteatoma y la piel del CAE adyacente al colesteatoma**

Se observó una expresión a la baja de la MMP-1 o colagenasa 1, en las células inmunorreactivas del colesteatoma y de la piel del CAE adyacente a la lesión. No se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas ( $3.2 \pm 1.0\%$  vs.  $6.7 \pm 1.9\%$ ) ( Figuras 2D, 3D y 4, Tablas 3, 4 y 5).

La expresión de la gelatinasa tipo IV o de 92kD o GELB o MMP-9 en las células del colesteatoma y la piel de CAE fue a la alta, sin embargo, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $29.6 \pm 6.5\%$  vs.  $32.2 \pm 3.4\%$ ) (Figuras 2F, 3F y 4, Tablas 3, 4 y 5). Cabe hacer notar que la expresión de la MMP-9 fue 6 veces mayor que la de la MMP-1 tanto en el colesteatoma como en la piel adyacente al mismo (Figura 4, Tabla 3).

### **Expresión del antígeno de proliferación celular Ki-67 en el colesteatoma y la piel del CAE adyacente a la lesión.**

La determinación de la expresión del antígeno de proliferación Ki-67 fue significativamente menor en el tejido colesteatomatoso en comparación con la piel del CAE adyacente ( $3.0 \pm 0.7\%$  vs.  $37.6 \pm 3.2\%$ ;  $p < 0.001$ ; Figuras 2G, 3G y 4). Las células inmunorreactivas que se encontraban en proliferación fueron principalmente endoteliales, lo que indica que existe un incremento en la vascularidad y en consecuencia, en la formación de focos inflamatorios y en la migración celular a nivel de piel comparado con la matriz del colesteatoma. Lo

anterior sugiere que el aumento de la vascularidad, con su consecuente incremento en el reclutamiento focal de células inflamatorias, lo hace un sustrato con mayor número de células inmunorreactivas.

## 9. Discusión

El colesteatoma se caracteriza anatomopatológicamente por ser una lesión constituida en su región central por tejido fibroso, rodeado por una cápsula de epitelio plano estratificado queratinizado localizado en el espacio del oído medio. Una de las teorías mayormente aceptada de la génesis de la capa epitelial externa del colesteatoma, es mediante la migración de las células basales de la membrana timpánica o de la piel de CAE adherida a la membrana timpánica. Normalmente, en el epitelio, las células basales de la capa papilar se encuentran en contacto directo con la membrana basal, se liberan, emigran verticalmente y se diferencian. En contraparte los queratinocitos y fibroblastos basales del colesteatoma emigran para sustituir a la mucosa del oído medio y mantenerse en un estado de hiperproliferación (19). Se ha tratado en diferentes estudios, in vitro y en tejido obtenido quirúrgicamente, de esclarecer la fisiopatología de la OMC colesteatomatosa, estudiando la actividad osteoclástica, degradación de matriz extracelular, la proliferación celular y producción de citocinas para explicar el origen de la recurrencia y afección ósea de esta enfermedad (20).

Nuestra investigación se enfocó principalmente al análisis de TNF  $\alpha$  y MMP-9, dos citocinas cuya importancia y asociación en dicha enfermedad se han relacionado con mayor grado de inflamación, destrucción y recurrencia del colesteatoma. La importancia del TNF- $\alpha$  en la fisiopatogenia del colesteatoma es por su característica de mediador en los procesos de remodelación y erosión ósea, ya que estimula a los fibroblastos para producir colagenasas y

prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>). La MMP-9 o colagenasa IV pertenece a la familia de las metaloproteasas, encargadas de degradar la matriz extracelular desmineralizada (gelatina) y su presencia ha sido ampliamente relacionada a la lesión colesteatomatosa. La asociación de TNF- $\alpha$  y MMP-9 no es nueva ya que dichas moléculas están íntimamente ligadas en procesos inflamatorios crónicos en los que hay pérdida del estroma fibroso. *In vitro* se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  induce células con actividad osteoclástica que, a través de fosfatasa ácida, producen la desmineralización ósea. También se ha reportado que en los sobrenadantes del tejido colesteatomatoso, la presencia de MMP-9 es directamente proporcional a la concentración del TNF- $\alpha$  (10,12,13).

Secundariamente se estudiaron otras moléculas inflamatorias como TGF- $\beta$ 1, MMP-1, BMP<sub>2/4</sub> y Ki-67. El TGF- $\beta$  es una citocina con un potente efecto en hueso y tejido conectivo ya que estimula la diferenciación y proliferación osteoblástica así como la producción de proteínas óseas. Por otra parte disminuye la producción de nuevos osteoclastos y la activación de los preformados, estimula la activación de macrófagos y fibroblastos e inhibe la acción de enzimas proteolíticas. Es posible que éstas acciones pudieran tener un efecto protector en el hueso y tejido conectivo en la región afectada por el colesteatoma. Las proteínas morfogénicas de hueso son factores de crecimiento pertenecientes a la superfamilia de moléculas de señalización de TGF- $\beta$  y se han asociado *in vivo* con la diferenciación osteoblástica y a la formación de cartílago. En la lisis ósea reportada en el colesteatoma, BMP<sub>2/4</sub> en conjunción con Il-1 $\alpha$  se ha relacionado con activación de células estromales y

células multinucleadas parecidas a osteoclastos (22, 25). El Ki-67 es un antígeno nuclear para medición de proliferación celular, no es un marcador específico de alguna estirpe celular, sin embargo se ha utilizado con el fin de estudiar de forma general la proliferación de grupos celulares (21).

Contrario a nuestra hipótesis inicial, algunas de las citocinas y colagenasas tuvieron mayor expresión en la piel que en el colesteatoma (Fig.2, 3 y 4), específicamente TNF- $\alpha$  y BMP<sub>2/4</sub>. Ante este hallazgo postulamos que la piel del tercio medio e interno del CAE cuenta con un estrato celular compuesto por queratinocitos, fibroblastos y sobre todo por células endoteliales e inflamatorias, el cual es metabólicamente más activo que el propio epitelio del colesteatoma. Además, este tejido por contigüidad, se encuentra constantemente agredido por la infección y otorrea persistente causada por el mismo colesteatoma, lo cual de forma reactiva, aumenta la proliferación de células inflamatorias y de citocinas. Microscópicamente en los cortes histológicos se observó un componente inflamatorio crónico abundante, hipervascularización mostrada por proliferación importante de células endoteliales y zonas de acantosis e hiperqueratosis. La hipervascularidad es importante, ya que a través de estos vasos neoformados existe una mayor migración celular así como de sustancias proinflamatorias hacia regiones adyacentes, la acantosis e hiperqueratosis traducen la reparación tisular deficiente producto de la inflamación crónica del epitelio. Estos resultados fueron verificados de forma significativa ( $p < 0.001$ ) mediante el marcaje del indicador de proliferación celular Ki-67 y la mayor expresión en tejido cutáneo de TNF- $\alpha$  y BMP<sub>2/4</sub> ( $p = 0.001$  y  $p < 0.001$

respectivamente). Lo anterior concuerda con los estudios realizados por Schmidt y Yan, quienes remarcan la presencia de estas sustancias en tejido colesteatomatoso, en cultivo y en la región suprabasal y su asociación con la activación fibroblástica y osteoclástica (13, 16, 25).

La piel continuamente inflamada del CAE y expuesta a citocinas proinflamatorias podría ser el origen de queratinocitos en oído medio ya que como determinó Massuda, se ha visto migración de células de CAE hacia caja timpánica y ausencia de la inhibición por contacto entre la capa epitelial y la mucosa de la MT. (7)

El TGF- $\beta$ 1 y la MMP-9 presentaron inmunorreactividad celular aumentada en ambos tejidos, mientras que la MMP-1 tuvo poca inmunorreactividad. Ninguna de éstas moléculas tuvo una diferencia estadísticamente significativa, lo cual pudo deberse al tamaño de la muestra y a las características de la piel biopsiada. Nosotros proponemos que la temporalidad en la actividad inmunogénica del colesteatoma y su consecuente producción de citocinas proinflamatorias, fibrogénicas y osteogénicas puede ser la causa de que las lesiones presenten periodos con menor o mayor actividad. En diferentes estudios in vitro se ha reportado variación en la vida media de TNF- $\alpha$  (18.2 min) y BMP (7- 16 min), que depende del tejido estudiado (estroma, niveles sanguíneos o sobrenadante). Por lo tanto, la ausencia o presencia de expresión de citocinas en el colesteatoma y la piel, puede depender de la diferencia en la temporalidad de su vida media. Esta relación no pudo ser establecida forma significativa, sin embargo sentaría el precedente para otros estudios ( 23, 24).

Además del papel de osteolisis de  $BMP_{2/4}$  antes mencionado,  $TNF-\alpha$  también tiene un papel importante en la activación osteoclástica y producción de colagenasas. En nuestro estudio  $BMP_{2/4}$  y  $TNF-\alpha$  se relacionaron de forma predominante con lisis de cadena osicular y del scutum, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura. Dichos hallazgos se presentaron de forma muy aislada, por lo que realizar una correlación para determinar una relación entre cada uno de ellos requeriría de mayor muestra de pacientes. Para investigaciones futuras sería importante estudiar éstos marcadores en piel sana de CAE, ya que se ha establecido por parte de Schönemark, Tokuriki y Yan (10,13, 15) diferencias significativas en la expresión de moléculas inflamatorias de piel sana y colesteatoma. Sin embargo, la piel de nuestros pacientes por proximidad al colesteatoma, no fue tejido cutáneo normal y sería importante determinar si hay diferencias en la producción de dichas moléculas entre el colesteatoma, piel adyacente inflamada crónicamente y piel sana.

Al realizar el análisis de la distribución por componentes histológicos (estroma, endotelio y mononucleares, Tablas 4 y 5), observamos que la actividad inmunogénica principal, tanto en piel como colesteatoma, radica en la región estromal y en menor grado en endotelio y mononucleares. Sin embargo, al carecer el colesteatoma, de tejido endotelial y por ende de la migración de células mononucleares, éste parece presentar menor inmunorreactividad en comparación con la piel. Esta última condición, si se analizara de forma independiente, podría mostrar resultados más homogéneos entre ambos tejidos.



## **10. CONCLUSIÓN**

En el presente estudio se observó una mayor producción de citocinas proinflamatorias y osteogénicas, así como de antígeno de proliferación celular en células endoteliales, mononucleares y fibroblastos en la dermis papilar de la piel del CAE, comparado con la lesión colesteatomatosa propiamente dicha. La piel adyacente a la lesión así como las moléculas proinflamatorias producidas por la misma podrían tener gran importancia para la perpetuación de la enfermedad, provocando migración continua de células epiteliales y citocinas hacia la caja timpánica, así como estimulación de osteoclastos que continúen produciendo destrucción ósea a través de la formación de nuevos vasos sanguíneos evidenciados por la proliferación de las células endoteliales. Lo anterior podría establecer al colesteatoma como un padecimiento no tanto local en oído medio, sino loco-regional por su afección a otras regiones anatómicas adyacentes. Con base en lo anterior, el establecer el papel que tiene la piel crónicamente inflamada en dicha región, podría dar origen a mayores investigaciones en las que se identifique la importancia de la participación de este tejido en la perpetuación de la patología. La temporalidad en la actividad inmunogénica del colesteatoma, observada en la región suprabasal del mismo y dada por la vida media de las citocinas producidas, sería otro punto de estudio para determinar las variaciones en la actividad de la patología.

La actividad inmunogénica principal, tanto en piel como colesteatoma, radica en la región estromal y en menor grado en tejido endotelial y células mononucleares. Al carecer el colesteatoma, de tejido endotelial y por ende de la

migración de células mononucleares, éste parece presentar menor inmunorreactividad en comparación con la piel, el análisis de estas condiciones de forma independiente, podría mostrar resultados más homogéneos entre ambos tejidos.

Se requiere aumentar el tamaño de la muestra para poder establecer correlaciones más claras entre las concentraciones de los mediadores inflamatorios estudiados y la destrucción ósea observada, así como la determinación de estos mediadores en el mismo tejido óseo afectado.

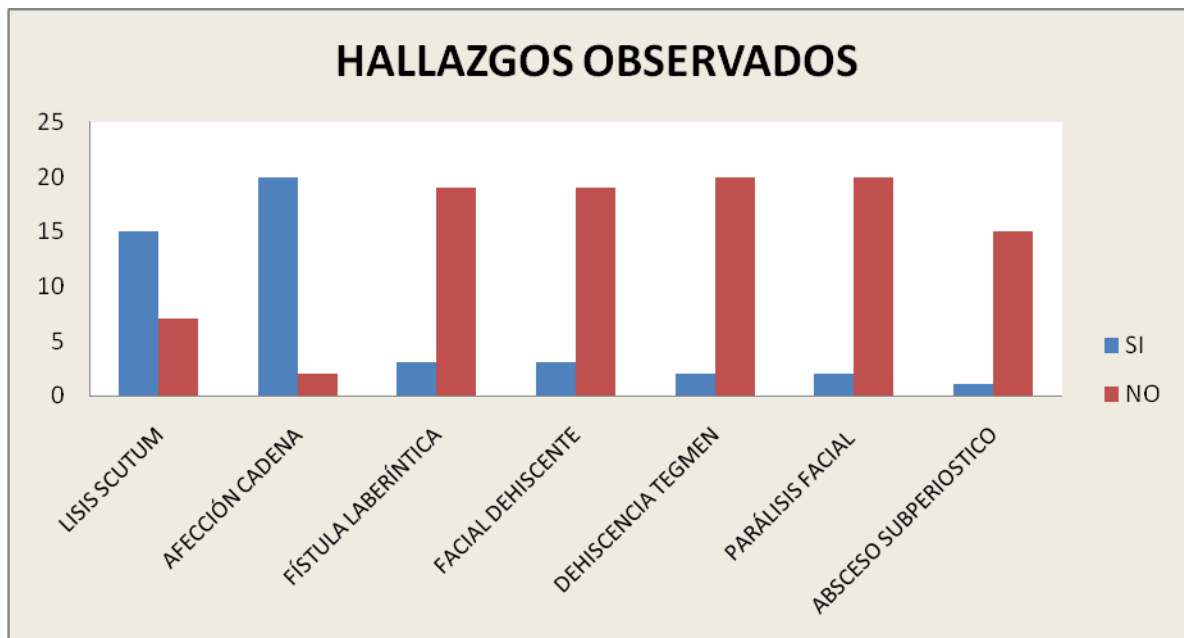
## 11. Bibliografía

1. Canalis R. The Ear Comprehensive Otiology; 2000, Editorial Lippincott Williams & Wilkins, pp:409-31.
2. Cotran R, Kumar V, Collins T. Patología Estructural y Funcional, 6<sup>a</sup> Edición; 2000, Editorial McGraw Hill Interamericana, pp:800-1.
3. Osma U, Cureoglu S, Hosoglu S. The complications of chronic otitis media: report of 93 cases. J Laryngol Otol 2000;114(2):97–100.
4. Soda A, Betancourt M. Surgical treatment of labyrinthine fistula caused by cholesteatoma. Otolaryngol Head Neck Surg 2000; 122: 739- 42.
5. Tos M, Lau T. Attic cholesteatoma. Recurrence rate related to observation time. Am J Otol 1988; 9:456-64.
6. Ottaviani F, Neglia CB, Berti E. Cytokines and adhesion molecules in middle ear cholesteatoma. A role in epithelial growth? Acta Otolaryngol 1999;119(4):462- 7.
7. Massuda ET, Oliveira JA. A new experimental model of acquired cholesteatoma. Laryngoscope. 2005;115(3):481-5.
8. Yoshikawa M, Kojima H, Wada K, Tsukidate T, Okada N, Saito H, Moruyama H. Identification of specific gene expression profiles in fibroblasts derived from middle ear cholesteatoma. Arch Otolaryngol head and Neck Surg. 2006;132(7):734-42.
9. Li N, Qin Z, Dong M. The expression of matrix metalloproteinase-9 and tumor necrosis factor-alpha in cholesteatoma. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi. 2004;18 (7):424-6.

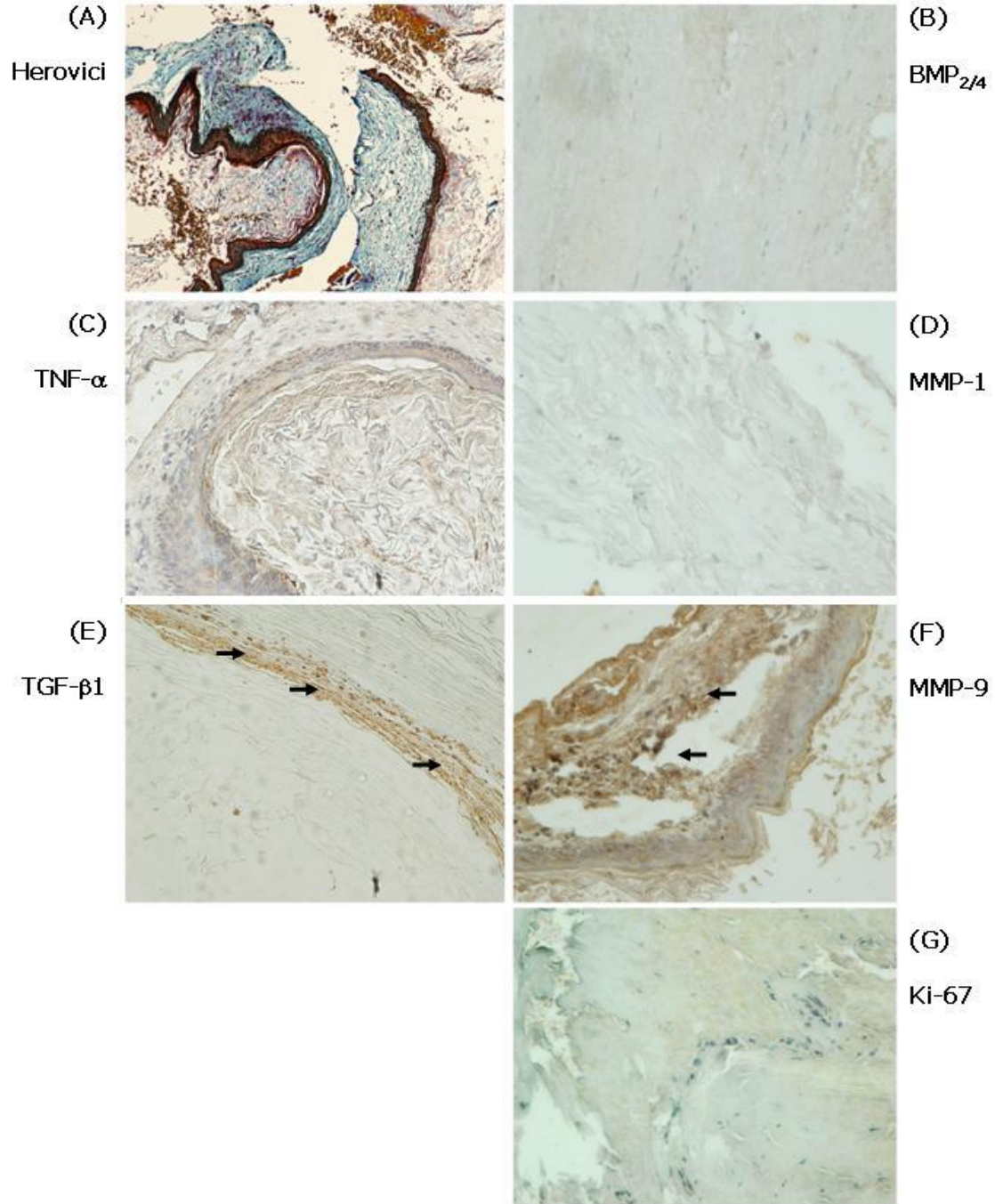
10. Tokuriki M, Noda I, Saito T, et al. Gene expression analysis of human middle ear cholesteatoma using complementary DNA arrays. *Laryngoscope* 2003;113(5):808–14.
11. Smith JA, Christopher J, Danner MD. Complications of Chronic Otitis Media and Cholesteatoma. *Otolaryngol Clin N Am* 2006;39:1237–55.
12. Yan SD, Huang CC. The role of tumor necrosis factor-alpha in bone resorption of cholesteatoma. *Am J Otolaryngol* 1991;12(2):83–9.
13. 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.
14. Maroun T, Semaan MD, Megerian CA. The pathophysiology of Cholesteatoma. *Otolaryngol Clin N Am* 2006;39:1143–59.
15. Schonemark M, Mester B, Kempf HG, et al. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in human cholesteatomas. *Acta Otolaryngol* 1996;116(3):451–6.
16. Schmidt M, Grunsfelder P, Hoppe F. Up-regulation of matrix metalloprotease-9 in middle ear cholesteatoma—correlations with growth factor expression in vivo? *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001;258(9):472–6.
17. 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.
18. Ulrik J, Brahe C. Human leukocyte antigen A-B-C tissue types in patients with middle ear cholesteatoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988;97:192- 4.

19. Sprekelsen M, Ebmeyer J, Ananopoulos A. Alteraciones de la membrana basal en el colesteatoma de oído medio. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2001;52:330-5.
20. Juhn S, Jung M, Hoffman M, Drew B. The Role of Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Otitis Media and Sequelae. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2008;1(3):117-38.
21. Mallet Y, Nouwen J, et al. Progressiveness and quantification of epithelial proliferation of middle ear cholesteatoma by M1B1. *Laryngoscope* 2003;113: 328–331.
22. Schimdt M, Schl G, Grunsfelder P, Hoppe F. Expression of Bone Morphogenetic Protein 2 Messenger Ribonucleic Acid in Cholesteatoma Fibroblasts. *Otol Neurotol* 2002;23:267–70.
23. Oliver JC, Bland LA, Oettinger CW. Cytokine kinetics in an in vitro whole blood model following an endotoxin challenge. *Lymphokine Cytokine Res.* 1993 Apr;12(2):115-20.
24. Golde J, Jone A, Bucholz R. Recombinant Human BMP-2 and Allograft Compared with Autogenous Bone Graft for Reconstruction of Diaphyseal Tibial Fractures with Cortical Defects. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)*. 2008;90:1168-1169.
25. Marena S, Aufdemorte T. Localization of cytokines in cholesteatoma tissue. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 112: 359- 68.

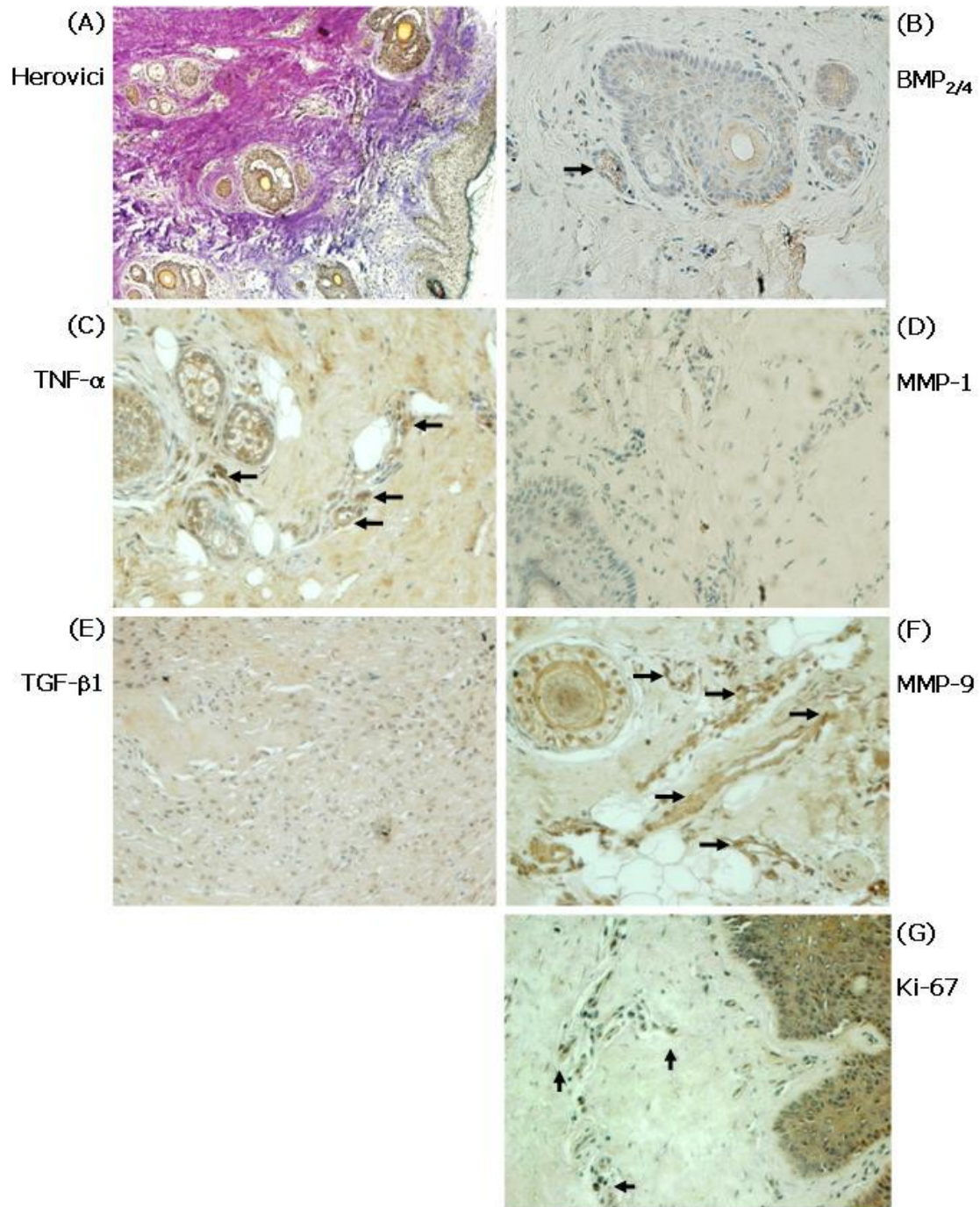
## 12. ANEXOS FIGURAS



**Figura 1.** Distribución de hallazgos observados en pacientes con OMCC.



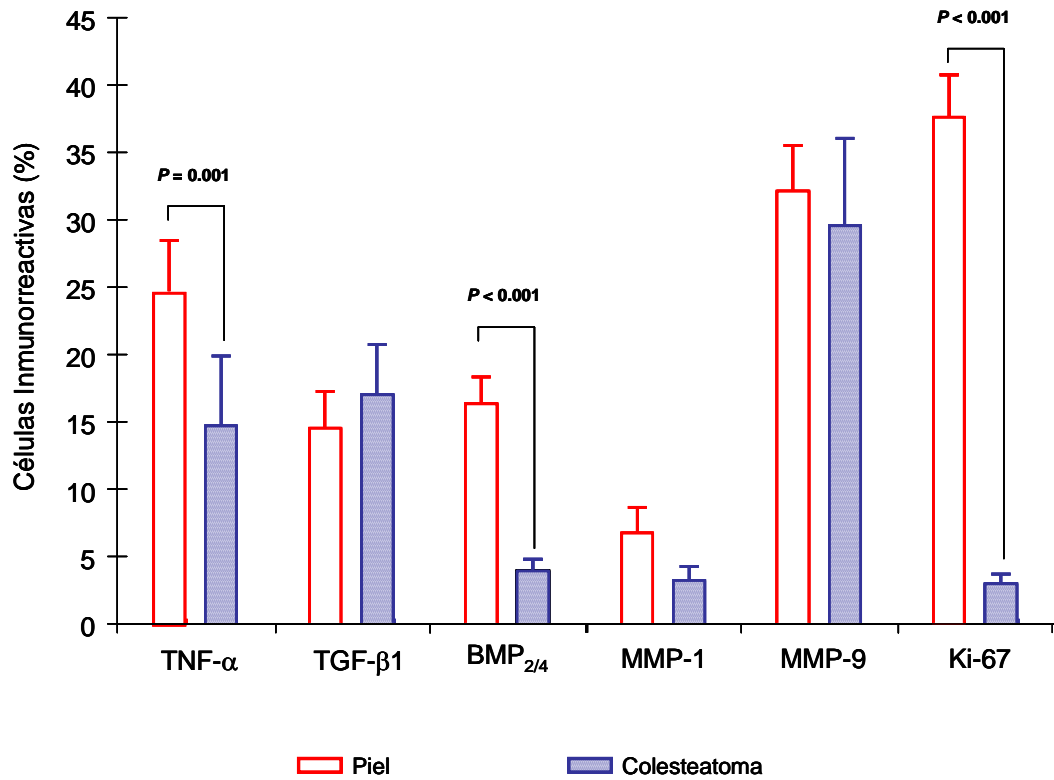
**Figura 2. Micrografías de una muestra representativa de un tejido colesteatomatoso.** (A) Tejido teñido con la técnica de Herovici (100X). (B) Células inmunorreactivas al anticuerpo anti-BMP<sub>2/4</sub> (200X). (C) Células productoras de TNF- $\alpha$  (200X). (D) Células inmunorreactivas al anticuerpo anti-MMP-1 (200X). (E) Células productoras de TGF- $\beta$ 1 (200X). (F) Células positivas para MMP-9 (200X). (G) Células en proliferación positivas al antígeno Ki-67 (200X). Las flechas señalan a las células inmunorreactivas.



**Figura 3. Micrografías de una muestra representativa de la piel del tercio medio del CAE adyacente al tejido colestomatoso.** (A) Tejido teñido con la técnica de Herovici (100X). (B) Células inmunorreactivas al anticuerpo anti-BMP<sub>2/4</sub> (200X). (C) Células productoras de TNF-α (200X). (D) Células inmunorreactivas al anticuerpo anti-MMP-1 (200X). (E) Células productoras de TGF-β1 (200X). (F) Células positivas para MMP-9 (200X). (G) Células en proliferación positivas al antígeno Ki-67 (200X). Las flechas señalan a las células inmunorreactivas.



**Marcadores Inflamatorios, Fibrogénicos, Proteolíticos y de Proliferación en el Colesteatoma y piel del CAE adyacente a la lesión.**



Mann-Whitney Rank Sum Test

**Figura 4. Porcentaje de células inmunoactivas en tejido colesteatomatoso y piel del tercio medio del CAE. Los resultados expresan el promedio  $\pm$  ES.**

## TABLAS

|                              | <b>ÍNDICE DE CORRELACIÓN</b> | <b>SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA (P)</b> |
|------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| <b>LISIS DE SCUTUM</b>       | 0.904                        | < 0.001                              |
| <b>FÍSTULA LABERÍNTICA</b>   | 0.869                        | < 0.001                              |
| <b>DEHISCENCIA DE TEGMEN</b> | 0.69                         | < 0.001                              |
| <b>FACIAL DEHISCENTE</b>     | 0.58                         | < 0.001                              |
| <b>AFECCION DE CADENA</b>    | 0.5                          | 0.018                                |

Tabla 1. Índice de correlación tomográfica y transoperatoria para los hallazgos más frecuentes observados en el estudio.

|                              | Número de pacientes | Porcentaje % |
|------------------------------|---------------------|--------------|
| <b>AFECCION DE CADENA</b>    | 20                  | 90.0%        |
| <b>LISIS DE SCUTUM</b>       | 15                  | 68.2%        |
| <b>FÍSTULA LABERÍNTICA</b>   | 3                   | 13.6%        |
| <b>FACIAL DEHISCENTE</b>     | 3                   | 13.6%        |
| <b>DEHISCENCIA DE TEGMEN</b> | 2                   | 9.1%         |

Tabla 2. Porcentaje de hallazgos observados por estructura ósea afectada en orden de frecuencia.

|                                | <b>PIEL<br/>MEDIANA (INTERVALO)</b> | <b>COLESTEATOMA<br/>MEDIANA ( INTERVALO)</b> |
|--------------------------------|-------------------------------------|--|
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | 18 (6 – 66)                         | 3 (0- 76)                                    |
| <b>TGF-<math>\beta</math>1</b> | 12 (0 – 43)                         | 13 (0- 54)                                   |
| <b>BMP<sub>2/4</sub></b>       | 13.5 (0 – 39)                       | 2 (0- 13)                                    |
| <b>MMP-1</b>                   | 1.5 (0 – 28)                        | 2 (0- 16)                                    |
| <b>MMP-9</b>                   | 29.5 (9 – 81)                       | 22.5 ( 0- 83)                                |
| <b>Ki-67</b>                   | 36 (10 – 73)                        | 2 (0- 14)                                    |

Tabla 3. Marcadores Pro-inflamatorios, Fibrogénicos, Proteolíticos y de Proliferación determinados en la piel del CAE adyacente al colesteatoma y en el tejido colesteatomatoso.

|                                | <b>ESTROMA</b> | <b>ENDOTELIO</b> | <b>MONONUCLEARES</b> |
|--------------------------------|----------------|------------------|----------------------|
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | +              | -                | -                    |
| <b>TGF-<math>\beta</math>1</b> | +++            | -                | -                    |
| <b>BMP<sub>2/4</sub></b>       | +              | -                | -                    |
| <b>MMP-1</b>                   | +              | -                | -                    |
| <b>MMP-9</b>                   | ++             | ++               | ++                   |
| <b>Ki-67</b>                   | +              | +                | -                    |

Tabla 4. Correlación histo-morfológica de las citocinas proinflamatorias, fibrogénicas y osteogénicas, de proteasas y del antígeno de proliferación en el colesteatoma.

|                                | <b>ESTROMA</b> | <b>ENDOTELIO</b> | <b>MONONUCLEARES</b> |
|--------------------------------|----------------|------------------|----------------------|
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | +              | +++              | ++                   |
| <b>TGF-<math>\beta</math>1</b> | +++            | +                | ++                   |
| <b>BMP<sub>2/4</sub></b>       | +++            | -                | -                    |
| <b>MMP-1</b>                   | +              | -                | -                    |
| <b>MMP-9</b>                   | +++            | +                | +                    |
| <b>Ki-67</b>                   | ++             | +++              | -                    |

**Tabla 5. Correlación histo-morfológica de las citocinas proinflamatorias, fibrogénicas y osteogénicas, de proteasas y del antígeno de proliferación en la piel de CAE adyacente.**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL INGRESO AL PROTOCOLO DE ESTUDIO TITULADO “Relación de la respuesta inflamatoria local en la otitis media crónica colesteatomatosa (OMCC) y sus complicaciones en pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.”**

**I. INTRODUCCIÓN**

Es importante que lea y comprenda la siguiente explicación acerca de su enfermedad y/o de su familiar, y la posibilidad de que sea incluido en el estudio arriba mencionado, ésta describe claramente el propósito, beneficios y riesgos que condiciona el ingreso al estudio. También deberá entender que el hecho de rechazar su participación o de su familiar en el estudio no cambiará en absoluto las decisiones médicas que se tomen con respecto al tratamiento de la enfermedad.

**II. OBJETIVO**

Yo (nombre de paciente o familiar) portador de Otitis Media Crónica Colesteatomatosa \_\_\_\_\_ con dirección \_\_\_\_\_ en

Voluntariamente acepto (nombre del paciente o familiar)

Participar en el estudio, cuyo propósito es demostrar, que la producción aumentada de mediadores de inflamación esta relacionada con el grado de destrucción ósea en pacientes con OMC colesteatomatosa.

Consideramos que usted o familiar es un candidato para ingresar al estudio, ya que presenta las características de tener el diagnóstico Otitis Media Crónica Colesteatomatosa.

**III. PROCEDIMIENTOS**

Estoy informado de que con la finalidad de confirmar la relación que tiene la expresión de citosinas proinflamatorias en la OMC colesteatomatosa con el grado de destrucción ósea será necesario realizarle el protocolo de estudio estandarizado en el INER (que no conlleva a un riesgo adicional del ya establecido) y consiste en un interrogatorio y exploración física completa, realización de estudios de imagen (TC de oído) y análisis histopatológico y mediante inmunohistoquímica. He sido informado que las muestras de biopsias sean realizadas en los Departamentos de Anatomía patológica e Inmunológica del INER, respectivamente, los cuales cuentan con personal entrenado y calificado para realizar dichos procedimientos, además del material nuevo y esterilizado para cumplir con todas las medidas de control de calidad.

#### **IV. BENEFICIOS**

*Estoy informado que al conocer la fisiopatología de mi enfermedad desde el punto de vista inmunológico, será más factible el comprender por que el grado de destrucción ósea y la presencia de complicaciones es tan variable.*

#### **V. RIESGO**

*Yo (o familiar) no seré (a) sometido a algún riesgo agregado a los procedimientos diagnósticos y terapéuticos que se realizan a los pacientes que tienen el diagnóstico de OMC colesteatomatosa, tales como la realización de mastoidectomía para erradicar el tejido colesteatomatoso.*

#### **VI. ALTERNATIVA DE RECHAZO**

*Si yo o mi familiar decidimos no participar en el estudio, el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento serán iguales que en otros pacientes tratados en este Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.*

#### **VII. CONFIDENCIALIDAD**

*Entiendo que cualquier información que se obtenga en este estudio será confidencial y que ni mi nombre o el de mi familiar serán mencionados en el reporte del estudio.*

#### **VIII. DISPONIBILIDAD DE LA INFORMACION**

*Se me ha informado que tendré disponibilidad en todo momento de la información de los resultados obtenidos en el análisis histopatológico y de inmunohistoquímica del tejido resecado durante la mastoidectomía.*

#### **IX. CESION DE DERECHOS**

*La decisión de ingresar al estudio implica que las biopsias de colesteatoma, quedan bajo la propiedad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y además implica que el instituto pueda realizar otras pruebas posteriormente sin necesidad de que sea informado de ello.*

#### **X. DERECHO A DESERTAR**

*Soy libre de excluirme del estudio en cualquier momento. En el caso de que tome esta decisión, el tratamiento y seguimiento no cambiarán.*

México, D.F., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_ .