

JULIANA GUSMÃO DE ARAÚJO

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES
NO COLESTEATOMA ADQUIRIDO**

RECIFE
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Juliana Gusmão de Araújo

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES
NO COLESTEATOMA ADQUIRIDO**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador Interno

Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto

Prof. Dr. Adjunto de Cirurgia, CCS-UFPE

Orientadora Externa

Dra. Mariana de Carvalho Leal Gouveia

Profa. Dr.^a Adjunto de Cirurgia, CCS-UFPE

RECIFE/PE
2012

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

A663i Araújo, Juliana Gusmão de.
 Identificação de potenciais biomarcadores no colesteatoma adquirido
 / Juliana Gusmão de Araújo. – 2012.
 82 f.: il.; tab.; 30 cm.

 Orientador: Sílvio da Silva Caldas Neto.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
 CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2012.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Colesteatoma. 2. Proteômica. 3. Lisofosfolipase. 4. β -actina. 5.
 Stanniocalcina-2. I. Caldas Neto, Sílvio da Silva (Orientador). II. Título.

617.91 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-232)

**“IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES NO
COLESTEATOMA ADQUIRIDO”**

JULIANA GUSMÃO DE ARAÚJO

APROVADA EM: 26/12/2012

ORIENTADOR INTERNO: **DRº. SÍLVIO DA SILVA CALDAS NETO**

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROFº - CARLOS TEIXEIRA BRANDT (PRESIDENTE) – CCS/UFPE

PROFº DRº. FERNANDO RIBEIRO DE MORAES NETO – CCS/UFPE

PROFª. DRª. FABIANA ARAUJO SPERANDIO - USP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

VICE-COORDENADOR

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fábio de Oliveira Vilar

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Josemberg Marins Campos

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio da Silva Caldas Neto

Aos meus pais, *Paulo Freitas de Araujo* e *Ana Rosa Carvalho de Gusmão Araujo*, e ao meu *irmão* pelo apoio e confiança incondicionais. O meu profundo agradecimento a eles que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

Ao meu noivo, *Paulo*, que nos momentos de minha ausência dedicados ao mestrado, sempre entendeu que o futuro é construído a partir da dedicação no presente, incentivou e me fez acreditar que conseguiria.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Silvio da Silva Caldas Neto, meu orientador, pelo incentivo, pelos seus conhecimentos na otologia, interesse acadêmico e dom para o ensino.

Ao Prof. Álvaro Antonio Bandeira Ferraz, coordenador da pós graduação em cirurgia, pelas orientações, por acreditar no futuro deste projeto e por ser um exemplo de dedicação à universidade.

À Prof.^a Mariana de Carvalho Leal Gouveia, pela disposição para discutir o projeto, bem como por seus questionamentos e contribuições.

Ao Prof. Carlos Teixeira Brandt, pelas orientações sobre a metodologia da pesquisa.

A Marcela Silvestre Outtes Wanderley, pesquisadora do LIKA, pela orientação, apoio, incentivo e amizade. Agradeço pelo exemplo e por todo o ensinamento adquirido.

Ao Prof. José Luiz de Lima Filho, diretor do LIKA, que cedeu a estrutura do laboratório e os excelentes profissionais para participarem desta pesquisa.

A Roberto Afonso da Silva, pesquisador do LIKA, pelo auxílio imprescindível neste trabalho.

A Francisco Mario de Biase Neto, pela enorme colaboração na coleta das amostras, sem as quais esta dissertação não seria possível.

Aos preceptores e residentes do Hospital Agamenon Magalhães, que também me auxiliaram na coleta das amostras.

A Márcia, que com alegria e grande disponibilidade fez a formatação do trabalho.

RESUMO

Introdução: O colesteatoma adquirido, mesmo com os conhecimentos acumulados desde sua primeira descrição, ainda se mantém como um problema de saúde pública distante de ser solucionado. O entendimento mais profundo da patogênese do colesteatoma é de extrema importância visto que a natureza desta lesão é destrutiva e causadora de complicações potencialmente graves. Apesar das teorias propostas e das várias proteínas terem sido identificados no colesteatoma, a verdadeira etiopatogenia da doença ainda carece de investigações. **Objetivo:** Identificar biomarcadores do colesteatoma adquirido utilizando a plataforma proteômica. **Casuística e Métodos:** Foram coletadas amostras de colesteatoma e também fragmento de pele da região retroauricular de 12 indivíduos submetidos a cirurgia para remoção do colesteatoma. As amostras foram armazenadas em solução salina e mantidas a -20°C até pesagem tecidual e extração das proteínas. Eletroforese bidimensional foi realizada, os géis foram corados com nitrato de prata e suas imagens digitalizadas. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os peptídeos extraídos após a digestão do spots foram levados à espectrometria de massa e os espectros obtidos foram analisados usando o algoritmo Mascot utilizando os bancos de dados de proteína do NCBI e SwissProt. **Resultados:** Dos 393 spots identificados na análise do extrato proteico de colesteatoma adquirido, apenas 10 estavam dentro dos parâmetros estatísticos aceitáveis pelo algoritmo Mascot. As principais proteínas detectadas no colesteatoma adquirido foram a cadeia beta do fibrinogênio, proteína da matriz extracelular 2, actina citoplasmática 1, heparan sulfato glucosamina 3-O-sulfotransferase 3A1, fator de necrose tumoral alfa induzido proteína 8-like 1, Stanniocalcina-2, lisofosfolipase eosinofílica e OFUT1. **Conclusão:** Foram identificadas proteínas envolvidas com a migração celular, regulação da apoptose, vias de sinalização, hiperproliferação celular, cicatrização e processos inflamatórios. Pudemos, desta maneira, traçar um perfil proteômico do colesteatoma adquirido.

Palavras-chave: Colesteatoma. Proteômica. Lisofosfolipase. β -actina. Stanniocalcina-2.

ABSTRACT

Introduction: The acquired cholesteatoma, even with all the knowledge accumulated since its first description, still remains a public health problem, far from being solved. A deeper understanding of its pathogenesis is extremely important since it is a destructive lesion that might cause potentially serious complications. Several proteins have been identified in cholesteatoma and a few theories were described, however the true etiology of the disease still needs investigation. **Objective:** Identify acquired cholesteatoma biomarkers using proteomics platform. **Patients and methods:** Cholesteatoma samples were collected and also a skin fragment of the surgical incision of twelve patients undergoing surgery for cholesteatoma removal. The samples were stored in saline solution and kept at -20 ° C until weighing tissue and proteins extraction. Two-dimensional electrophoresis was conducted, the gels were stained with silver nitrate and their images were digitized. All analyzes were performed in triplicate. The peptides extracted after spots digestion were taken to mass spectrometry and the spectra obtained were analyzed using the Mascot algorithm comparing databases of the NCBI and SwissProt protein. **Results:** Of the 393 spots identified in the analysis of protein extracts of acquired cholesteatoma, only 10 were within acceptable statistical parameters by Mascot algorithm. The proteins detected in acquired cholesteatoma were fibrinogen beta chain, extracellular matrix protein 2, actin cytoplasmic 1, heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 3A1, tumor necrosis factor alpha 8 induced protein-like 1, stanniocalcin-2, eosinophil lysophospholipase and OFUT1. **Conclusion:** Proteins involved in cell migration, regulation of apoptosis, signaling pathways, cellular proliferation, wound healing and inflammatory processes were identified. We were able to draw a proteomic profile of acquired cholesteatoma.

Keywords: Cholesteatoma. Proteomics. Lysophospholipase. β -actin. Stanniocalcin-2.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1.	Desenho esquemático do aparelho auditivo direito em visão frontal. OE: orelha externa; MT: membrana timpânica; OM: orelha média; OI: orelha interna.....	13
Figura 2.	Desenho esquemático da orelha média e mastóide direitas em visão lateral. M: apófise mastóide e seu sistema de células aéreas; OM: orelha média; TA: tuba auditiva; *: ádito.	14
Figura 3.	Desenho esquemático do aparelho auditivo direito. OE: orelha externa; MT: membrana timpânica; C: colesteatoma...	20
Figura 4.	Desenho esquemático do colesteatoma adquirido primário. MT: membrana timpânica; C: colesteatoma. Note a retenção de escamas no interior da bolsa de retração timpânica.....	22
Figura 5.	Desenho esquemático de colesteatoma secundário por migração epitelial. As cabeças de seta mostram a epiderme da face externa da MT avançando pela sua face interna. OM: orelha média.....	23
Figura 6.	Gel analítico de eletroforese bidimensional de extrato proteico de colesteatoma adquirido corado pelo nitrato de prata. Os spots foram numerados conforme a tabela 1.....	44
Figura 7.	Gel analítico de eletroforese bidimensional de extrato proteico de pele corado pelo nitrato de prata.....	45
Tabela 1.	Proteínas identificadas pelo MALDI-TOF a partir da digestão enzimática dos spots da eletroforese bidimensional.	46

LISTA ABREVIATURAS

C	cabamidometil
CK	citoqueratinas
DTT	ditiotreitól
EGFR	fator de crescimento epidérmico
IL-1	interleucina-1
KGF	fator de crescimento de queratinócitos
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight</i>
MMP	matriz-metaloproteinases
MS	espectrometria de massa
MUC5AC	mucinas
MT	membrana timpânica
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OM	orelha média
OSF-1	osteoclastos
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
TFA	ácido trifluoroacético
TGF- β	fator β transformador do crescimento
TNF- α	fator de necrose tumoral- α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Apresentação do problema.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Colesteatoma.....	17
2.1.1 Histórico e Definição.....	17
2.1.2 Considerações Gerais.....	18
2.1.3 Classificação e Fisiopatologia.....	19
2.1.4 Aspectos moleculares do Colesteatoma.....	24
2.2 A proteômica.....	30
3. OBJETIVO.....	34
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	35
4.1 Local do estudo.....	35
4.2 Delineamento do estudo.....	35
4.3 Período do estudo.....	35
4.4 Seleção dos pacientes.....	36
4.4.1 Critérios de inclusão.....	36
4.4.2 Critérios de exclusão.....	36
4.5 Procedimentos técnicos.....	36
4.5.1 Coleta das amostras.....	36
4.5.2 Extração e dosagem das proteínas totais.....	37
4.5.3 Eletroforese bidimensional.....	37
4.5.4 Digestão dos Spots.....	38
4.5.5 Espectrometria de massa.....	39
4.6 Procedimentos analíticos.....	40
4.7 Considerações éticas.....	41
5. RESULTADOS.....	42
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICES.....	76

Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido menor.....	76
Apêndice B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	78
ANEXO	80
Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do problema

O colesteatoma é uma doença que acomete indivíduos de todas as idades e é registrado em todas as partes do mundo. Particularmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil, ele aparece como um importante problema de saúde pública.

A orelha humana está localizada no interior do osso temporal e consiste em três partes (figura 1): a orelha externa, constituída pelo pavilhão auricular e pelo conduto auditivo externo; a orelha média, que é uma cavidade aérea separada do conduto pela membrana timpânica; e a orelha interna, órgão sensorial da audição⁽¹⁾.

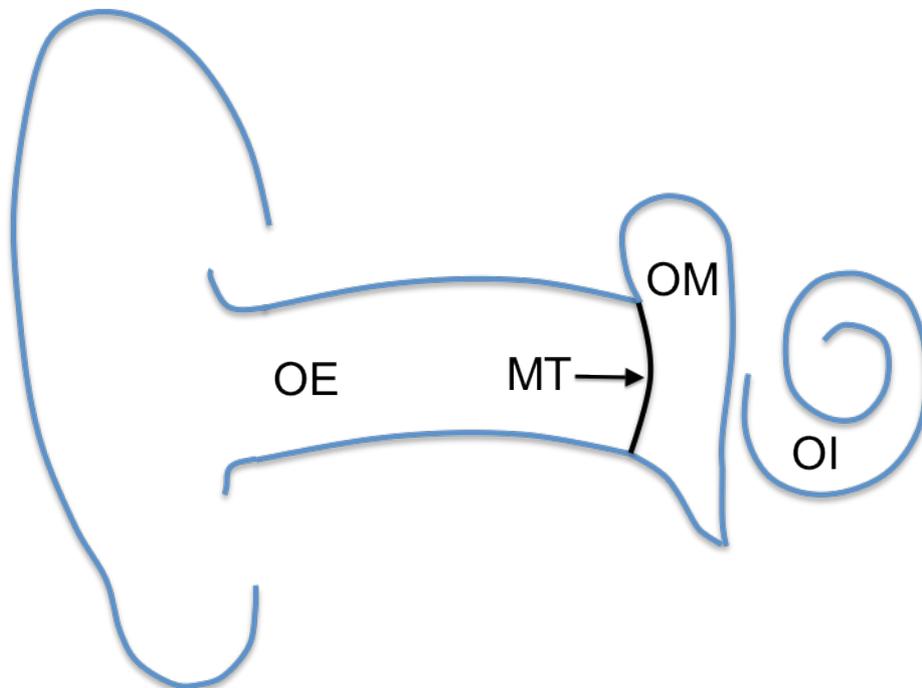


Figura 1. Desenho esquemático do aparelho auditivo direito em visão frontal. OE: orelha externa; MT: membrana timpânica; OM: orelha média; OI: orelha interna

Unido à orelha média através de pequena abertura póstero-superior denominada de ádito, existe o complexo celular da mastoide. Anteriormente, há o orifício timpânico da tuba auditiva que comunica a orelha média com a rinofaringe e tem a função de equilibrar a pressão de ar da orelha média com a atmosférica (Figura 2). Estas estruturas são inteiramente revestidas por mucosa respiratória⁽¹⁾.

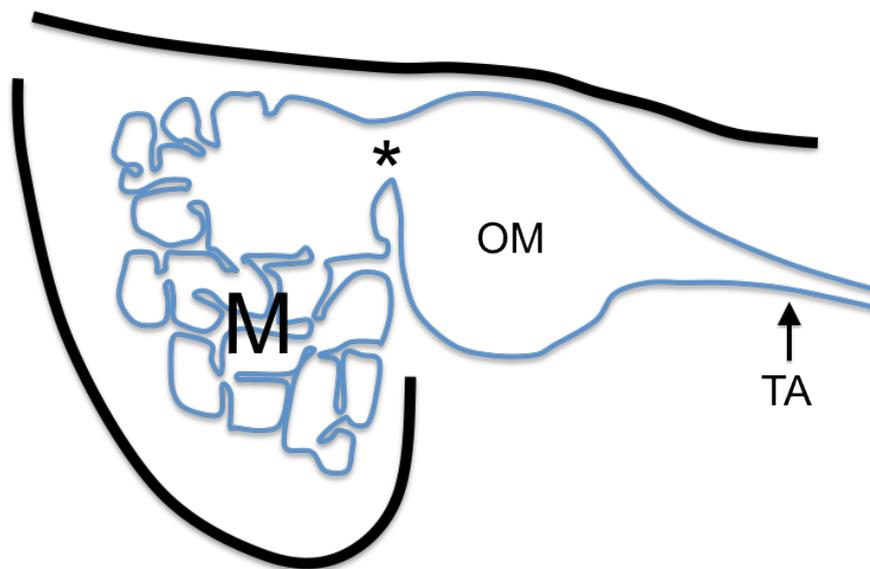


Figura 2. Desenho esquemático da orelha média e mastóide direitas em visão lateral. M: apófise mastóide e seu sistema de células aéreas; OM: orelha média; TA: tuba auditiva; *: ádito.

O colesteatoma consiste na presença de epitélio escamoso queratinizado em qualquer região pneumatizada do osso temporal. Apresenta características de expansão gradual que leva a complicações decorrentes da invasão e destruição das estruturas adjacentes. A perda auditiva, disfunção vestibular, paralisia facial e complicações intracranianas são algumas das possíveis complicações resultantes da erosão da cápsula ótica e cadeia ossicular.

A discussão sobre como células do epitélio escamoso estratificado queratinizado chegam à orelha média é ainda motivo de controvérsia. Apesar de muitos estudos já terem sido realizados, sua exata patogênese permanece não totalmente compreendida. Algumas teorias já foram propostas a fim esclarecer o problema, mas o fato é que, cada vez mais, acredita-se que o aparecimento e a evolução do colesteatoma são acontecimentos multifatoriais, estando relacionados primariamente a características genéticas e moleculares.

Vários mediadores inflamatórios e outras proteínas já foram relacionados com a sua etiopatogenia. Características genéticas influenciadas certamente por alguns fatores ambientais, propiciariam o surgimento dos colesteatomas, com suas particularidades como a migração epitelial, invasão das estruturas adjacentes, destruição óssea, hiperproliferação celular, agressividade e propensão à recidiva.

O tratamento do colesteatoma consiste basicamente na sua ressecção cirúrgica. Porém, a propensão a recidivas acarreta a submissão do paciente a inúmeros procedimentos cirúrgicos. A erradicação da doença, muitas vezes, exige cirurgias agressivas com remoção dos ossículos e da parede posterior do conduto auditivo externo, podendo acarretar maus resultados funcionais, deformidades estéticas e um maior do risco de complicações, além da necessidade de acompanhamento otorrinolaringológico por tempo indeterminado para limpeza da cavidade, gerando um custo considerável para um sistema de saúde já bastante limitado.

Desta maneira, estudos que se dediquem ao esclarecimento desta morbidade são de extrema importância tanto para interesse científico quanto para benefício da saúde pública. Inúmeras pesquisas estão em progressão e muitas novidades surgem diariamente sobre a estrutura e o comportamento do colesteatoma. A descoberta do

conjunto de moléculas que caracteriza esta doença é importante para tentar determinar o provável comportamento da lesão e, assim, intervir no seu tratamento, a fim de proporcionar ao paciente uma maior perspectiva de cura e diminuir as taxas de recidiva.

A maioria dos estudos que identificam proteínas relacionadas ao colesteatoma são feitos por meio de imunohistoquímica. Este método exige a busca de uma ou mais proteínas pré-determinadas no tecido estudado. Entretanto, desta forma, várias outras proteínas presentes no material podem permanecer desconhecidas até que se faça uma procura específica por elas.

Neste contexto, a proteômica aparece como uma ferramenta promissora na identificação de potenciais biomarcadores do colesteatoma, pois é um método novo que permite a identificação de todas as proteínas existentes num determinado tecido e que podem revelar padrões ainda desconhecidos da doença, sendo potencialmente úteis para detecção precoce e análise do comportamento evolutivo e avaliação de prognóstico.

Portanto, o corrente estudo tem como objetivo identificar as proteínas presentes no colesteatoma adquirido por meio da utilização da plataforma proteômica para que, no futuro, elas possam ser usadas em estudos dirigidos a relacioná-las com as características clínicas desta doença e ao desenvolvimento de novos métodos terapêuticos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Colesteatoma

2.1.1 Histórico e Definição

A lesão hoje conhecida como colesteatoma da orelha média foi primeiramente descrita por Curveilhier, em 1829, como um tumor perolado do osso temporal⁽²⁾. No entanto pode ser definido, de forma mais simplista, como a presença de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado em qualquer local onde este não deveria ser encontrado, como na orelha média e células da mastoide, locais revestidos por mucosa⁽³⁾.

O termo colesteatoma foi utilizado pela primeira vez por Johannes Mueller em 1838, que o descreveu como um tumor perolado de camadas de gordura distinto das outras lesões adiposas por apresentar gordura biliar ou colesterina entremeada entre lâminas de células poliédricas⁽⁴⁾. No entanto, diferentemente de sua descrição inicial, não contém gordura nem cristais de colesterol, não obstante o termo permaneça sendo amplamente utilizado na literatura mundial.

Sabe-se que o colesteatoma é constituído por escamas de pele na orelha média ou em qualquer área pneumatizada do osso temporal⁽²⁾. Friedmann, em 1959, definiu o colesteatoma como uma estrutura cística revestida por epitélio escamoso estratificado queratinizado, repousando sobre um estroma fibroso de espessura variável⁽⁵⁾. Ele, inclusive propôs o emprego do termo “ceratoma”, certamente mais condizente com os achados histológicos da doença em questão. A matriz de epitélio descama em lamelas de queratina para o interior do espaço por ela delimitado, preenchendo-o e distendendo-o⁽⁶⁾.

2.1.2 Considerações Gerais

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 anos⁽⁷⁾.

Aquino et al em 2011, realizaram um estudo retrospectivo de levantamento estatístico de 1146 cirurgias de colesteatoma da orelha média em adultos e crianças oriundas de várias classes sociais de todas as regiões do Brasil no período de 1962 a 1988 realizadas em hospital terciária na cidade de São Paulo. A idade dos indivíduos variou de 4 a 68 anos e, com relação ao sexo, houve maior incidência em homens (64,7%) que em mulheres (35,3%), tanto para adultos quanto para crianças⁽⁸⁾.

De acordo com Caldas e Caldas Neto, em 1988, a capacidade expansiva e destrutiva dos colesteatomas pode comprometer a cadeia ossicular da orelha média e eventualmente causar erosões às proteções ósseas da orelha interna, nervo facial, meninges e seio sigmoide, provocando lesões irreversíveis e infecções à distância que podem levar o paciente a incapacidades funcionais permanentes ou, mesmo, à morte⁽⁹⁾.

Histologicamente, o colesteatoma é composto de três elementos. Primeiramente, existe a matriz de epitélio escamoso queratinizado. Este epitélio contém, da mesma maneira que a epiderme da pele normal, as quatro camadas clássicas dos tecidos epidérmicos: a camada basal, espinhosa, granulosa e córnea⁽¹⁰⁾. Há ainda um conteúdo cístico de queratina e, por fim, uma perimatriz de tecido conjuntivo subepitelial e de granulação⁽⁴⁾. Além disso, o colesteatoma apresenta características histológicas hiperproliferativas e líticas, podendo causar destruição da cadeia ossicular e das células aéreas da mastoide, além de levar a complicações

intracranianas, como abscessos extradurais, subdurais, cerebrais e cerebelares, meningite e tromboflebite dos seios venosos; e extracranianas, como paralisia facial periférica, fístula perilinfática, labirintite infecciosa, abscesso periosteal e petrosite (2).

Apesar de potencialmente graves e incapacitantes, com o advento dos antibióticos e dos avanços tecnológicos que melhoraram o diagnóstico destas complicações, houve importante decréscimo na ocorrência delas^(11,12). A mortalidade relacionada a essas complicações também tem reduzido drasticamente por conta desses avanços e pesquisa recentemente publicada chegou a apresentar mortalidade de 0% entre 34 casos⁽¹³⁾. No entanto, mesmo com estas importantes melhorias, ainda representam uma questão primordial, particularmente as complicações intracranianas.

2.1.3. Classificação e Fisiopatologia

O colesteatoma é tradicionalmente classificado como congênito ou adquirido⁽²⁾: o colesteatoma congênito é raro e surge medialmente à membrana timpânica intacta (Figura 3) em pacientes sem passado de infecção da orelha média ou cirurgia otológica. Existem várias teorias para explicar sua origem e, segundo a mais aceita, o colesteatoma congênito se originaria de restos de células embrionárias ectodérmicas presentes na fenda auditiva⁽¹⁴⁾. Esta coleção de células escamosas estratificadas epidermóides aparece durante o desenvolvimento fetal e desapareceriam com aproximadamente trinta e três semanas de gestação⁽¹⁵⁾. Estes restos epiteliais são encontrados, na maioria das vezes, no quadrante anterossuperior, condizendo com a localização da maioria dessas lesões. Esta teoria, no entanto, não explica o surgimento desta lesão em outras regiões e, desta maneira,

muitos outros mecanismos também têm sido propostos, tal como a metaplasia celular e a migração de células epiteliais do canal auditivo externo durante o período fetal⁽¹⁶⁾.

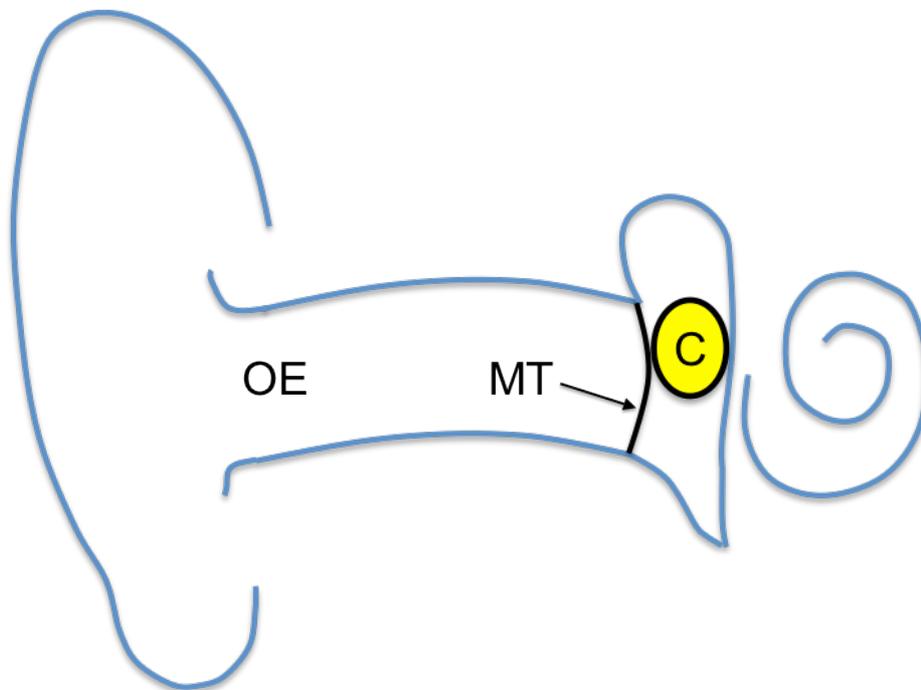


Figura 3. Desenho esquemático do aparelho auditivo direito em visão frontal. OE: orelha externa; MT: membrana timpânica; C: colesteatoma.

Em seu estudo de 2000, Tos, entretanto, questiona a ideia de que o colesteatoma com membrana timpânica íntegra seja necessariamente congênito. Ele apresenta a teoria da inclusão, segundo a qual o epitélio escamoso queratinizado pode ser implantado na orelha média durante algum evento patológico que afete a membrana timpânica e a orelha média durante a infância⁽¹⁷⁾. Esta teoria é baseada no fato de que os locais de origem dos colesteatomas coincidirem com as áreas de contato da membrana timpânica e com a cadeia ossicular na vigência de condições patológicas comuns, como retrações da membrana timpânica. Desta maneira,

durante este processo, algumas células epiteliais poderiam ser deixadas na cavidade timpânica formando o colesteatoma⁽¹⁶⁾.

A incidência do colesteatoma congênito vem crescendo nos últimos anos, possivelmente pela maior disponibilidade de exames complementares e pelo maior conhecimento da doença pelos otorrinolaringologistas⁽¹⁵⁾.

O colesteatoma adquirido o se classifica como primário ou secundário⁽²⁾. Esta subdivisão relaciona-se com a sua forma de origem. Os primários, mais comuns, têm sua origem tão controversa quanto a do congênito. A teoria mais aceita é a da invaginação baseada no comprometimento da tuba auditiva, gerando pressões negativas na orelha média e promovendo a aspiração de parte da membrana timpânica, ocasionado defeitos ou bolsas de retração principalmente na sua região atical ou pósterio-superior⁽²⁾. Gradativamente estas bolsas de retração perdem a sua capacidade autolimpante (Figura 4), passando a acumular lamelas de queratina em seu interior⁽¹⁶⁾, o que facilita o intenso crescimento bacteriano, formação de um biofilme microbiano, e conseqüentemente a infecção crônica e proliferação epitelial, que induz a uma grande reação inflamatória da mucosa da orelha média (OM) adjacente⁽¹⁸⁾.

O colesteatoma adquirido secundário, da mesma maneira, tem sua origem ainda em discussão. Entre as várias teorias, a mais provável considera a migração epitelial como a origem da enfermidade. Esta migração começaria a partir das margens de uma perfuração prévia da membrana timpânica⁽¹⁹⁾ (Figura 5). A presença abundante de tecido de granulação na cavidade timpânica, sob estímulo inflamatório crônico, funcionaria como uma ponte de migração de células da epiderme do conduto auditivo externo para dentro da orelha média⁽²⁾.

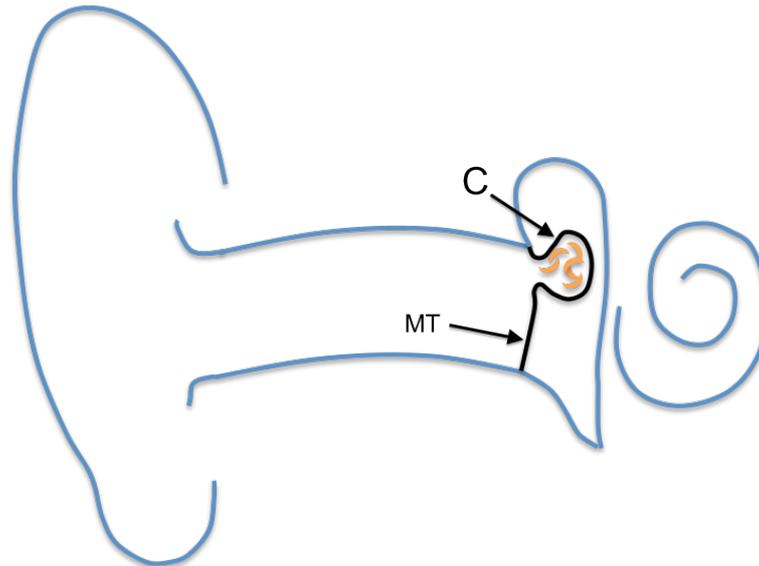


Figura 4. Desenho esquemático do colesteatoma adquirido primário. MT: membrana timpânica; C: colesteatoma. Note a retenção de escamas no interior da bolsa de retração timpânica

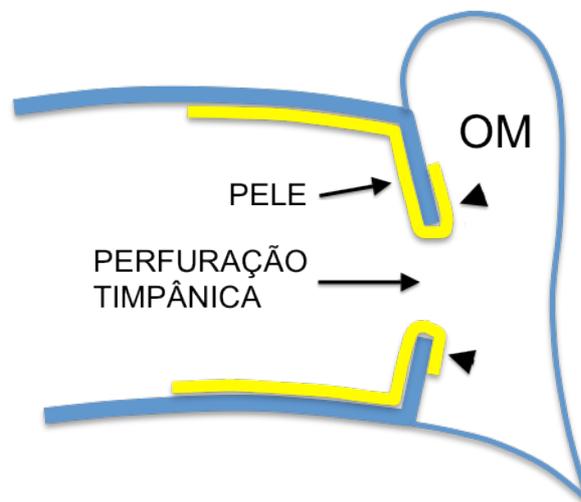


Figura 5. Desenho esquemático de colesteatoma secundário por migração epitelial. As cabeças de seta mostram a epiderme da face externa da MT avançando pela sua face interna. OM: orelha media

Uma outra vertente baseia-se na teoria da metaplasia, em que ocorre a transformação do epitélio pavimentoso simples da orelha média em escamoso estratificado queratinizado secundário à otite média crônica e a otites médias agudas de repetição⁽²⁰⁾. Também acredita-se em outra importante teoria, a qual sugere a ocorrência de migração de células indiferenciadas da camada basal da epiderme do meato acústico externo justatimpânico em profundidade, sem perfuração timpânica, para a orelha média⁽²⁾.

Também é importante mencionar os colesteatomas iatrogênicos, que ocorrem secundariamente a implantações de epitélio escamoso estratificado na orelha média. Este evento pode ocorrer durante qualquer manipulação cirúrgica realizada sobre a membrana timpânica, como timpanotomias para inserção de tubos de ventilação, timpanoplastias, estapedotomias e mastoidectomias. Há ainda os colesteatomas decorrentes de traumatismos do osso temporal, decorrentes também da implantação de tecido epitelial na orelha média⁽²⁾.

No entanto, estudos recentes evidenciam o caráter multifatorial desta doença. Diante deste contexto, características genéticas e moleculares do colesteatoma têm sido implicadas como fatores determinantes no seu surgimento e, sobretudo, na sua agressividade⁽²⁾.

2.1.4. Aspectos moleculares do Colesteatoma

Diversas teorias explicam vagamente as propriedades destrutivas do colesteatoma. Inicialmente foi proposto que a pressão exercida pelo acúmulo de queratina e de outros resíduos seria a responsável por essa deterioração. Posteriormente, surgiu a teoria bioquímica segundo a qual algumas enzimas e citocinas liberadas pelo colesteatoma teriam a capacidade de causar lise óssea e erosão ossicular⁽³⁾. Além disso, outros parâmetros bioquímicos são relatados com a infecção crônica acarretando a osteíte, tais como a mudanças de pH, a ativação de enzimas liberadas pelos queratinócitos do colesteatoma e a ativação dos osteoclastos por mediadores inflamatórios como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α)⁽¹⁶⁾.

É importante ressaltar que a erosão proteolítica do osso temporal é o evento-chave no curso da progressão do colesteatoma e os mecanismos moleculares de reabsorção óssea, põem em perigo os ossículos, o ouvido interno, o nervo facial, grandes vasos ou o cérebro. Porém, estes mecanismos não são completamente compreendidos⁽²⁾.

Dessa maneira, muitas perguntas continuam sem resposta, como, por exemplo, quais fatores predizem a agressividade, o crescimento e a recidiva do colesteatoma da OM. Nesse contexto, ferramentas moleculares vêm sendo utilizadas para identificar algumas proteínas envolvidas no desenvolvimento, agressividade e recidiva do colesteatoma.

Pesquisadores do mundo inteiro têm estudado o colesteatoma na tentativa de descobrir a verdadeira etiopatogenia da doença^(16,21-32). Dentre estes, vários trabalhos utilizando métodos imunohistoquímicos possibilitaram a análise mais detalhada das

citocinas e sua participação na etiopatogenia do colesteatoma^(29,31,32). Estes achados 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⁽¹⁰⁾.

Uma das principais metas do estudo do colesteatoma é estimar seu potencial hiperproliferativo. O crescimento da matriz do colesteatoma é refletido pela regulação anormal de citoqueratinas correspondentes às fases iniciais da queratinização. Relatos evidenciam que, na matriz do colesteatoma, além das citoqueratinas (CK) usualmente encontradas na epiderme normal, está expressa a CK14 e CK16 nas camadas suprabasais, característica de epitélios hiperproliferativos⁽³⁾.

Park et al, em 2001, identificou pela técnica da imunohistoquímica a presença de CK 13 e 16 na camada basal em colesteatoma experimental desenvolvido em roedores, sugerindo que estas células suprabasais tinha atividade hiperproliferativa⁽²¹⁾. Além disso, o mesmo estudo avaliou o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), com a utilização da técnica de imunohistoquímica no colesteatoma experimental, e observou que houve coloração positiva nas células suprabasais, bem como nas células basais, o que significava atividade mitótica aumentada nas camadas basal e suprabasal do colesteatoma. Diferentemente da pele meatal, na qual houve coloração positiva apenas na camada de células basais⁽²¹⁾. Alguns pesquisadores já haviam utilizado esta proteína como o índice de proliferação⁽²²⁾.

Olszewska et al, em 2006, encontraram células positivas para PCNA na porcentagem de 23% na epiderme e 45,7% no colesteatoma. Através de investigação

imunohistoquímica, revelou 7% de células Ki-67 positivas na epiderme, sobretudo na sua camada basal, enquanto que no colesteatoma foi encontrado em 22% das células, nas camadas parabasal e estroma⁽²³⁾.

Outra pesquisa analisou a imunoexpressão do antígeno Ki-67, presente no núcleo de células que estão em fase de multiplicação e encontrou que todos os trinta e um casos de colesteatoma analisados apresentavam Ki-67 na camada basal e 67,74% exibiram células Ki-67 positivas nas camadas suprabasais. O Ki-67 é um antígeno presente no núcleo das células em fase de multiplicação utilizado como marcador de proliferação celular⁽³⁾.

Recentemente, uma nova família de enzimas proteolíticas, denominadas de matriz-metaloproteinases (MMP) têm sido descrita e identificada. Estas parecem desempenhar um papel crucial na homeostase dos ossos e doenças inflamatórias osteolíticas, como por exemplo a osteoartrite e periodontite. Estas enzimas são sofisticadamente controladas por inibidores específicos e cascatas de ativação e vêm sendo encontradas no colesteatoma. Schönermark et al, em 1996, demonstraram, através de imunohistoquímica, a expressão de MMP-2, MMP-3 e MMP-9 estritamente limitada às células das camadas basais e suprabasais do epitélio do colesteatoma. A MMP-8 mostrou uma expressão mais disseminada no epitélio e também no tecido de granulação. O inibidor tecidual de metaloproteinases, TIMP-1, pode ser detectada apenas em áreas muito limitadas do tecido de granulação de uma maneira bastante aleatória⁽²⁴⁾.

A através da análise de expressão das diferentes metaloproteinases de matriz e seus inibidores, é possível correlacionar esta atividade molecular com a agressividade da doença. Uma vez confirmada esta, seria possível propor estratégias

para controlar o seu desenvolvimento bioquímico. A avaliação dos níveis de expressão dessas enzimas indicaram a expressão dos genes MMP2, MMP3, MMP13 e TIMP1, porém diferenças na expressão das MMPs e dos TIMPs podem estar associadas à agressividade da doença⁽²⁵⁾.

Morales et al, em 2007, analisaram a expressão imunohistoquímica de MMP2 em colesteatomas invasivos, comparando-os aos latentes. Um estudo de corte transversal com dezenove lâminas e blocos parafinados de colesteatoma, derivados de mastoidectomias, foram desparafinados e submetidos à técnica imunohistoquímica com anticorpos anti-MMP2. Os achados indicaram a expressão MMP2 no colesteatoma e essa expressão aumentada em colesteatoma invasivo quando comparada aos latentes⁽²⁶⁾.

Estudo comparativo do colesteatoma com a pele retroauricular indicou que a MMP-9 e a MMP-2 podem estar implicadas nos mecanismos moleculares da invasão colesteatoma e destruição óssea⁽²⁷⁾. Outras enzimas proteolíticas, tais como ativadores do plasminogênio, também exercem papel crucial na lesão dos tecidos adjacentes ao colesteatoma⁽²⁸⁾.

Ghinst et al, em 2012, estudaram nove colesteatomas adquiridos e oito congênitos em crianças. Seis amostras de pele do conduto auditivo externo também foram coletadas para que pudessem servir como controle. Através de imunohistoquímica, foram investigados alguns subtipos de galectinas, glicoproteínas implicadas em fenômenos biológicos como o desenvolvimento embrionário, a resposta imune, proliferação, indução da apoptose e motilidade celular, invasão e metástase tumoral⁽¹⁹⁾. A galectina-1 estava ausente no colesteatoma e presente na

epiderme; e a galectina-3 estava menos expressa no colesteatoma que na pele normal⁽¹⁹⁾.

Mediadores inflamatórios também vêm sendo descritos no colesteatoma. As interleucinas 1 e 8, importantes mediadores da atividade osteoclástica, mostram-se aumentadas no colesteatoma quando comparadas com células epiteliais do conduto auditivo externo⁽²⁹⁾. Enquanto que, substâncias indutoras da apoptose como o fator de necrose tumoral (TNF), o fator β transformador do crescimento (TGF- β) e o p53 estão elevadas no colesteatoma quando comparadas com a pele normal⁽³⁰⁾.

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^(10,16,31,32). Análise histológica com utilização de técnicas de imunohistoquímica demonstrou a expressão aumentada do receptor 2 para o TNF- α (TNF-R2) em fragmentos de colesteatoma, todavia não houve correlação com o grau de inflamação observado no paciente.⁽³²⁾

Jin et al, em 2011, encontraram uma maior expressão do fator de crescimento epidérmico (EGFR) no colesteatoma quando comparado com a pele retroauricular, no entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa⁽³³⁾.

O fator de crescimento de queratinócitos (KGF), produzido por células do estroma, é um importante mediador de proliferação epitelial, diferenciação e migração. Entre os fatores de crescimento e citocinas que podem desempenhar um papel no desenvolvimento do colesteatoma, bem como em outras doenças epiteliais hiperproliferativas, KGF aparece como uma importante chave molecular⁽³⁴⁾.

Diante do exposto, percebe-se que muitas pesquisas têm surgido nos últimos anos acerca da fisiopatologia do colesteatoma e dos possíveis marcadores implicados

em sua patogênese. Grande parte destes, no entanto, utilizou a técnica da imunohistoquímica, ferramenta capaz de identificar, individualmente, proteínas específicas nos mais diversos tecidos. Neste contexto a proteômica surge como uma excelente alternativa e perspectiva de descoberta de proteínas com papel no desenvolvimento do colesteatoma ainda não estudadas pelas técnicas laboratoriais usuais.

2.2. A proteômica

Nos últimos anos, a bioquímica sofreu uma verdadeira revolução, principalmente devido aos espetaculares avanços na área de biologia molecular, que vem disponibilizando uma incrível gama de informações moleculares sobre os sistemas biológicos⁽³⁵⁾.

Através da análise proteômica é possível identificar e caracterizar todas as proteínas presentes em determinado material biológico, como o colesteatoma, e definir os biomarcadores envolvidos no seu desenvolvimento, agressividade e tendência à recidiva. A proteômica oferece uma poderosa gama de técnicas para investigação de doenças com expressão fenotípica variada, porque permite a identificação direta da concentração diferencial das proteínas envolvidas na patogênese. É uma ferramenta na elucidação dos mecanismos básicos e patológicas, diagnóstico da doença, bem como seu tratamento⁽³⁵⁾.

Dificuldades na compreensão dos processos patológicos direcionaram a aproximação da medicina com a biologia molecular e em particular, a proteômica. Uma vez que grande parte dos biomarcadores é de natureza proteica, a aplicação da proteômica para a descoberta de novos biomarcadores tornou-se imprescindível. Dessa maneira, devemos compreender a proteômica com estudos que buscam relacionar a atividade tecidual ao conjunto de proteínas expressas em determinado momento. Ao contrário da genômica e transcriptômica, onde pesquisamos genes ou RNA mensageiros, nos exames de proteômica buscamos identificar diretamente as proteínas presentes no tecido em questão⁽³⁶⁾.

Após a era pós-genômica, estudos de análise de proteomas estão sendo considerados altamente estratégicos e estão recebendo pesados apoios de governos

de países como Estados Unidos, Dinamarca, França, Alemanha, Inglaterra, Japão e Austrália. Países emergentes como Coreia do Sul, Taiwan, Índia, África do Sul e outros já estão também realizando financiamentos de projetos proteômicos⁽³⁷⁾. No Brasil, apesar do próprio conceito de proteomas ser pouco conhecido pela comunidade científica, projetos começam a ser realizados.

Para o estudo proteômico, as proteínas são extraídas por metodologias disponíveis na literatura a partir de diferentes amostras biológicas e separadas através da eletroforese bidimensional (2-D)⁽³⁸⁾. Posteriormente, a espectrometria de massa (MS), permite a análise e identificação da proteína isolada do gel, mesmo em baixas concentrações⁽³⁹⁾. Essa integração da espectrometria de massa com a eletroforese 2-D vem sendo descrita com sucesso para a identificação rápida e confiável de proteínas⁽⁴⁰⁾.

A proteômica é, desta maneira, uma ferramenta sensível, efetiva e confiável para identificar e quantificar proteínas envolvidas no desenvolvimento, agressividade e recidiva do colesteatoma.

Na área da otorrinolaringologia, a proteômica foi utilizada para identificação de biomarcadores em poucos estudos e em apenas um deles foi realizada análise de amostras de colesteatoma. Neste estudo, todavia, foram estudadas amostras de somente três pacientes, comparando-as a fragmentos de pele da região retroauricular do mesmo indivíduo. Desta maneira, Kim, JL et al, em 2004, descobriram que a maioria das proteínas aumentadas no colesteatoma em relação à pele normal foram relacionadas à transdução de sinais. Entre estas proteínas, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e o fator 1 de estimulação de osteoclastos (OSF-1) podem

ter papel fundamental na patogênese do colesteatoma, principalmente com relação a sua característica de proliferação celular e destruição óssea⁽⁴¹⁾.

Um outro estudo, também na área da otologia, mas desta vez envolvendo a orelha interna, foi realizado por Chiarella et al, em 2011, que utilizaram a abordagem proteômica para identificar marcadores sanguíneos da Doença de Ménière, entidade com fisiopatologia ainda bastante desconhecida. O plasma foi obtido a partir de sangue total de 16 indivíduos previamente diagnosticados e foi comparado com plasma de doadores saudáveis. Foi possível identificar um conjunto de proteínas cuja expressão parece ser modulada diferencialmente em pacientes acometidos pela enfermidade *versus* controles, em particular, o fator do complemento H e B, fibrinogênio α e γ , β -actina e fator derivado do epitélio pigmentar estavam aumentados; por outro lado, os níveis de beta-2 glicoproteína-1, da proteína de ligação da vitamina D e da apolipoproteína-1 estavam significativamente diminuídos no plasma dos indivíduos com doença de Ménière⁽⁴²⁾.

Preciado et al, em 2010, estudaram as efusões da orelha média em crianças submetidas à miringotomia para inserção de tubo de ventilação e identificaram as mucinas MUC5AC e MUC5B nas efusões da orelha média, embora a MUC5B pareça ser predominante⁽⁴³⁾.

Apesar da pequena quantidade de pesquisas utilizando a abordagem proteômica na área da otologia, já existem alguns trabalhos publicados em rinologia, abrangendo doenças como a rinossinusite crônica, a polipose nasal e a rinite alérgica. Upton et al, em 2011, por exemplo, encontraram mais de trezentas proteínas em um estudo sobre rinossinusite crônica com polipose nasal utilizando abordagem proteômica. Grande parte destas proteínas desempenhava atividade importante na

resposta inflamatória. As proteínas que estavam aumentadas na rinossinusite crônica com polipose em relação aos controles foram lisofosfolipase eosinofílica, inibidor de dissociação 2 e a apolipoproteína A-1. As proteínas diminuídas foram catalase, annexin A1 e a queratina II-8⁽⁴⁴⁾.

Tewfik et al, em 2011, coletaram muco nasal de quatro pacientes com rinossinusite crônica com polipose, bem como de quatro controles saudáveis. Um total de trinta e cinco proteínas foram identificadas, a maioria relacionada a imunidade inata e adquirida. O precursor de lisozima C estava diminuído nos indivíduos com a doença, bem como a proteína de ligação de fosfolípido celular e a antileucoproteínase 1⁽⁴⁵⁾.

A abordagem proteômica também foi utilizada para avaliar o fluido nasal de pacientes com rinite alérgica sazonal e indivíduos saudáveis. Os níveis da forma ácida da alfa-1-antitripsina estavam aumentados nos pacientes com rinite alérgica. A lisofosfolipase eosinofílica foi encontrada em todos os indivíduos com rinite durante a estação alérgica, não foi identificada em nenhum deles antes do período climático de alergia⁽⁴⁶⁾.

Conforme exposto, a proteômica vem, cada vez mais, sendo utilizada como ferramenta no estudo da fisiopatologia das doenças no campo da otorrinolaringologia. Espera-se que os achados daí advindos sirvam para melhorar a nossa compreensão do papel de cada proteína na iniciação e no desenvolvimento das doenças, em particular o colesteatoma, nosso objeto de estudo.

3. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é identificar biomarcadores do colesteatoma adquirido utilizando a plataforma proteômica.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

Hospitais públicos terciários com serviços de referência de otorrinolaringologia no estado de Pernambuco foram os locais onde as amostras de colesteatoma e do fragmento de pele retroauricular foram coletadas dos pacientes submetidos à cirurgia otológica para exérese de colesteatoma, tanto nas timpanomastoidectomias fechadas como nas com técnica aberta. Estas cirurgias foram realizadas pelos médicos residentes do serviço sob a supervisão de um preceptor responsável pelo paciente estudado.

O Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) localizado na Universidade Federal de Pernambuco foi o local onde a análise proteômica foi realizada.

4.2 Delineamento do estudo

No presente trabalho, foi realizado um estudo observacional, transversal e analítico

4.3 Período do estudo

As amostras foram coletadas durante o mês de novembro de 2012.

4.4 Seleção dos pacientes

4.4.1 Critérios de inclusão

Diagnóstico clínico de otite média crônica colesteatomatosa com confirmação intraoperatória, paciente com indicação de timpanomastoidectomia técnica fechada ou aberta, sem distinção de idade, sexo ou etnia.

4.4.2 Critérios de exclusão

Anormalidades craniofaciais, colesteatoma congênito ou presença de colesteatoma do conduto auditivo externo.

Os pacientes com anormalidades craniofaciais foram excluídos para que não houvesse outros fatores influenciando o surgimento do colesteatoma. O colesteatoma congênito foi excluído pelo fato de se acreditar que sua fisiopatologia seja diferente do colesteatoma adquirido. Finalmente o colesteatoma do conduto auditivo externo foi excluído por se tratar de uma entidade nosológica distinta com outros fatores predisponentes.

4.5 Procedimentos técnicos

4.5.1 Coleta das amostras

Foram selecionados 14 indivíduos para participarem do estudo. Destes, inicialmente um paciente foi excluído da pesquisa por ter tido sua cirurgia suspensa. Coletou-se, portanto, amostras de colesteatoma da orelha média e da mastoide e também fragmento de pele da região retroauricular de 13 indivíduos submetidos a cirurgia para remoção do colesteatoma. As amostras foram armazenadas em solução salina e mantidas a -20°C até pesagem tecidual e extração das proteínas. Destes casos,

apenas uma amostra de colesteatoma teve que ser desprezada, por não possuir peso suficiente para análise proteômica adequada, perfazendo um total de 12 indivíduos participantes da pesquisa.

A técnica cirúrgica adotada foi definida pelas características clínicas dos indivíduos, podendo-se optar por timpanomastoidectomia aberta ou fechada dependendo da história clínica, achados otoscópicos, tomográficos, achados intraoperatórios, tamanho da mastoide e a preferência do cirurgião, além das condições socioeconômicas do doente em questão. A escolha da técnica cirúrgica não sofreu influência dos propósitos da pesquisa ou vice-versa.

4.5.2 Extração e dosagem das proteínas totais

A extração de proteínas consistiu da incubação da amostra em um mistura 1:1 de tampão de amostra para eletroforese bidimensional (Ureia-5M, tioureia-7M, CHAPS-2%) e tampão de lise celular (CHAPS-1%, Tris-40mM, 10 μ l/ml de inibidor de protease) seguida de 5 ciclos de sonicação (5 minutos) e banho de gelo (5 minutos). Em seguida, para o isolamento do sobrenadante, as amostras foram submetidas à centrifugação (5000 rpm, 10 minutos, 4°C).

As proteínas totais do sobrenadante foram precipitadas utilizando o kit comercial 2-D Clean-Up (GE Healthcare Corp., USA) seguindo as instruções do fabricante. A dosagem de proteína total foi realizada pelo método de Bradford (1976).

4.5.3 Eletroforese bidimensional

As fitas Immobiline DryStrips (13 cm, pH3-10) foram incubadas (16 horas, 25°C) com solução de reidratação (ureia-7M; tiouréia-2M; CHAPS-4%, ditiotretitol-100

mM; de azul de bromofenol-0,002% e de Pharmalite-2% pH3-10) contendo 300 µg de proteína total. A focalização isoeétrica das amostras embebidas nas fitas ocorreu no aparelho Multiphor II System da Amersham (GE Healthcare Corp., Piscataway, USA). A programação da primeira dimensão consistiu de três etapas: 1) 300 V/ 0,001 KWh; 2) 3500 V/ 2.9 KWh ; 3) 3500V / 12000 KWh. Após a 1ª dimensão, as fitas foram equilibradas com um tampão contendo 6M de ureia, 50mM de tampão Tris-HCl pH 6.8, 30% de glicerol, 2% de SDS e ditioneitol (DTT) (10 mg/ml) durante 15 minutos e a seguir, usando o mesmo tampão e tempo de incubação, com a iodoacetamida (25 mg/ml) em substituição ao DTT. A 2ª dimensão foi realizada pela corrida em gel de poli-acrilamida 12,5% (SDS-PAGE). Os géis foram corados com nitrato de prata utilizando o kit comercial *Silver Staining, Protein* (GE Healthcare Corp., USA) e suas imagens digitalizadas com auxílio de um fotodocumentador (Molecular Imaging, Locus biotecnologia) e analisado usando o software ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare Corp., USA). Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os três géis obtidos tanto das amostras de colesteatoma quanto das da pele foram sobrepostos para determinar sua reprodutibilidade.

4.5.4 Digestão dos Spots

Primeiramente, os spots de interesse foram cortados com auxílio de um bisturi estéril e adicionados a tubos contendo 1 ml de solução de descoloração (ferrocianeto de potássio-30mM e tiosulfato de sódio 100 mM). Após 5 minutos, foi realizada a lavagem com água ultrapura até desaparecimento da coloração amarelada. Em seguida, pela adição de Acetonitrila 100%, iniciou-se a desidratação dos spots. A Acetonitrila foi retirada pelo *Speed Vac* (Concentraton 5301, Eppendorf). A tripsina foi

preparada conforme as instruções do fabricante (Invitrogen Inc, USA) a 20 µg/ml, em tampão NH₄HCO₃ 25mM. Para ativação da enzima, os spots foram incubados a 37°C, durante 16 horas. Após o final da digestão, a enzima foi inativada e iniciou-se a extração orgânica dos peptídeos pela adição de 30 µL de solução 5% TFA:50% ACN. Após 1 hora, a solução contendo os peptídeos extraídos foi transferida para um novo tubo e com o auxílio do *Speed Vac* foi concentrada.

4.5.5 Espectrometria de massa

Neste estudo foi utilizado o espectro de massa Bruker Autoflex III MALDI-TOF (Bruker Corporation) equipado com laser de fase sólida, Nd:YAG (355 nm), refletor de campo quadrático e porta de íon cronometrado. A aquisição dos peptídeos intactos foi realizada em modo *reflection*, com ionização positiva, rejeição de massa 500 m/z, velocidade de aquisição de 200 tiros/seg, potencial de aceleração dos íons de 20 kV, sendo coletado 1000 tiros para cada espectro. Após extração dos peptídeos, as amostras foram diluídas em 10 µL da solução a 1% de ácido trifluoroacético (TFA) e 50% de acetonitrila. Após este procedimento uma alíquota de 2 µL foi misturada com o mesmo volume da matriz ácido 4-a-hidróxido cinâmico (5 mg/ml) e 1 µL foi aplicado sobre o slide com secagem a temperatura ambiente. O slide foi inserido no espectrômetro de massa para obter os espectros. A calibração externa foi feita com o kit de calibração padrão (Bruker Corporation), utilizando os seguintes padrões:

-Angiotensina II	(M+H 1046,5418 monoisotópico),
-Angiotensina I	(M+H 1296,6848 monoisotópico),
-Substância P	(M+H 1347,7354 monoisotópico),
-Bobesina	(M+H 1619,8223 monoisotópico),
-ACTH clip 1-17	(M+H 2093,0862 monoisotópico),
-ACTH clip 18-39	(M+H 2465,1983 monoisotópico) e
-Somatostatina 28	(M+H 3147,4710 monoisotópico).

Os gráficos foram plotados no software Flex Analyses (Bruker Corporation). Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os espectros obtidos foram analisados usando o algoritmo Mascot (Matrix Biosciences) contra os bancos de dados de proteína do NCBI e SwissProt. Os parâmetros utilizados foram: Taxinomia: *Homo sapiens*, modificações fixadas: carbamidometil (C), modificações variáveis: Oxidação (M).

4.6 Procedimentos analíticos

Os géis obtidos na eletroforese bidimensional foram corados com nitrato de prata e suas imagens digitalizadas e analisados usando o software ImageMaster 2D Platinum 6.0. As análises foram realizadas em triplicatas e os três géis obtidos tanto das amostras de colesteatoma quanto das da pele foram sobrepostos para determinar sua reprodutibilidade. O teste estatístico utilizado pelo software acima descrito foi anova, capaz de comparar mais de duas variáveis quantitativas.

Após a identificação das proteínas que caracterizavam o tecido colesteatomatoso, fizemos uma descrição detalhada delas a fim de estabelecer um perfil proteômico da doença.

4.7 Considerações éticas

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco com os números de processos sendo 133346 e 141292. Todos os pacientes incluídos no estudo foram informados do objetivo e dos procedimentos envolvidos na pesquisa e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

Os dados dos pacientes constam no prontuário e os dados referentes à pesquisa no protocolo de pesquisa em arquivo pessoal do pesquisador pelo prazo mínimo de cinco anos. Os dados referentes à pesquisa foram mantidos em sigilo, não permitindo a divulgação com a identificação dos pacientes, garantindo a privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos. O acompanhamento clínico dos indivíduos participantes da pesquisa foi realizado de forma habitual no serviço onde sua cirurgia foi realizada.

5. RESULTADOS

No total quatorze indivíduos atenderam aos critérios de inclusão e exclusão, e concederam a autorização para serem incluídos na pesquisa. Destes, apenas um paciente teve sua cirurgia suspensa no dia do procedimento e ainda não foi reagendada, fato que impossibilitou sua permanência no estudo. Houve também um paciente cuja amostra de colesteatoma teve peso insuficiente para análise, inferior a 10 mg de tecido, sendo, no final, analisadas amostras de colesteatoma de 12 indivíduos.

A idade dos pacientes que tiveram amostras coletadas variou de 09 a 70 anos, sendo a média 29,92 anos. Foram sete mulheres e seis homens.

As amostras de colesteatoma e pele pesaram entre 40-100 mg e toda a peça foi submetida à extração de proteínas totais. As amostras de colesteatoma apresentaram em média 5000 $\mu\text{g/ml}$ e as de pele 3000 $\mu\text{g/ml}$. E alíquotas de 300 μg foram encaminhadas à eletroforese bidimensional.

Neste estudo, a ferramenta da proteômica adotada, eletroforese 2-D, identificou cerca de 500 spots sendo 393 na análise do extrato proteico de colesteatoma adquirido e 108 na amostra de pele (figuras 6 e 7). Os 126 spots considerados mais intensos, dos quais 80 estavam presentes nas amostras de colesteatoma adquirido, foram submetidos à digestão utilizando tripsina para extração dos peptídeos. Estes peptídeos foram levados à espectrometria de massa para obtenção dos espectros. Os espectros obtidos foram então submetidos à análise utilizando o algoritmo Mascot. Dos 80 spots inicialmente obtidos apenas 10 estavam dentro dos parâmetros estatísticos aceitáveis por este processo. (tabela 1).

Dos 126 spots mais intensos, 46 foram obtidos nas amostras da pele da região retroauricular. As proteínas identificadas após análise destes spots presentes na pele foram utilizadas como controle na pesquisa. Após definição das proteínas presentes nas amostras de colesteatoma, utilizou-se este controle para definir quais das moléculas existiam apenas no colesteatoma e não na pele normal, visando, desta maneira, traçar um perfil proteômico mais fidedigno do processo patológico.

Em consequência disto, das 10 proteínas identificadas nas amostras de colesteatoma, uma, a queratina 14, foi excluída devido a sua presença na pele retroauricular. Portanto, por existir também na pele normal, não a consideramos no estudo.

A análise por espectrometria de massa identificou no colesteatoma proteínas envolvidas com a migração celular (β -actina, heparan sulfato glucosamina 3-O-sulfotransferase 3A1 e a cadeia beta do fibrinogênio), controle e regulação da apoptose (fator de necrose tumoral α induzido proteína 8-like 1), processos inflamatórios (lisofosfolipase eosinofílica e cadeia beta do fibrinogênio), vias de sinalização celular (GDP-fucose O-fucosiltransferase 1), cicatrização e reparo tecidual (Heparan sulfato, stanniocalcina), e com a hiperproliferação tecidual (stanniocalcina). Além destas funções, grande parte delas está indiretamente envolvida em processos carcinogênicos, funcionando, algumas vezes, como marcadores tumorais. Também foi identificada a proteína da matriz extracelular 2, importante componente da matriz extracelular.

Ainda encontramos a "putative ankirina repeat domain-containing protein 26-like protein", cuja existência é discutível devido à possibilidade desta proteína ser produto de um pseudogene. Esta última, foi então, excluída da análise.

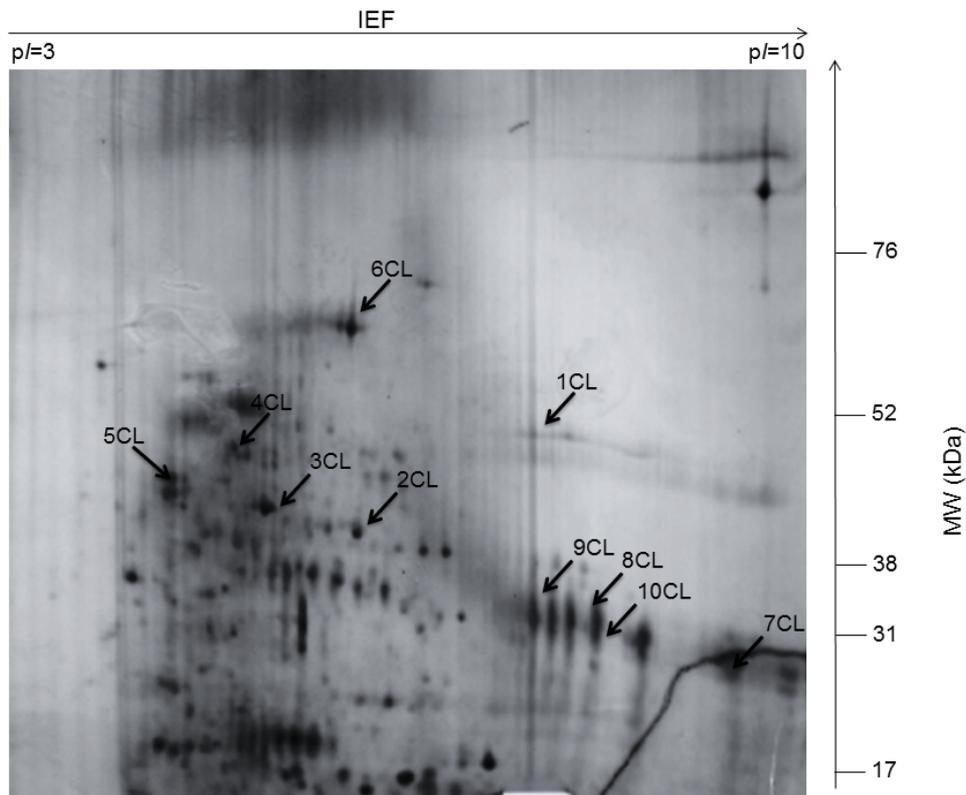


Figura 6. Gel analítico de eletroforese bidimensional de extrato proteico de colesteatoma adquirido corado pelo nitrato de prata. Os spots foram numerados conforme a tabela 1.

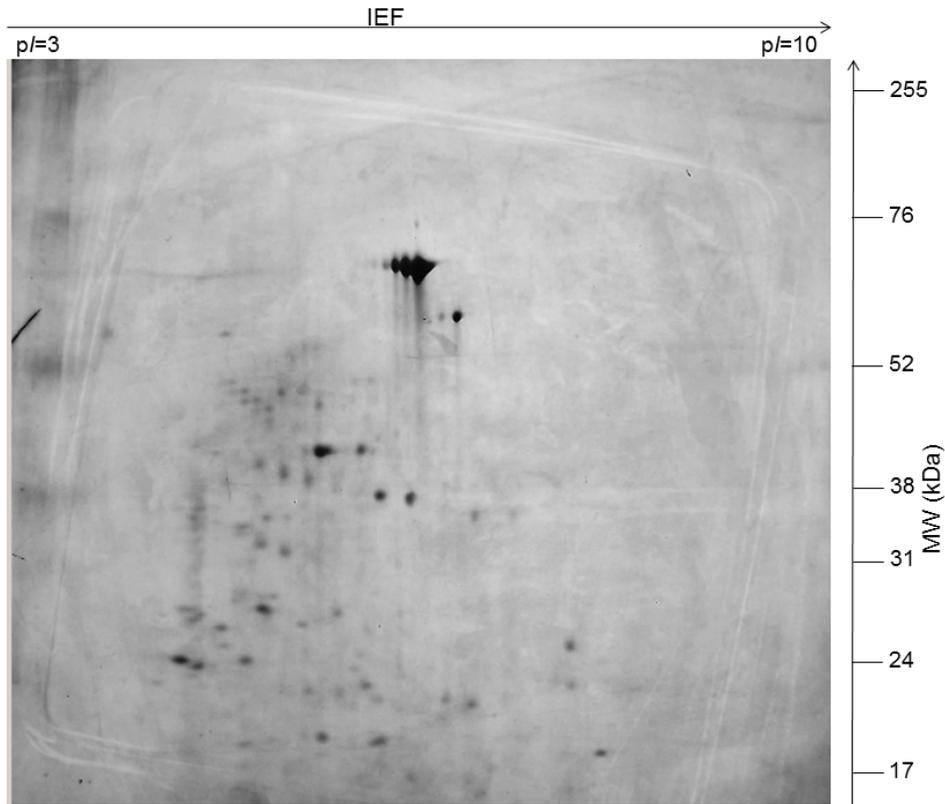


Figura 7. Gel analítico de eletroforese bidimensional de extrato proteico de pele corado pelo nitrato de prata.

Tabela 1. Proteínas identificadas no colesteatoma pelo MALDI-TOF a partir da digestão enzimática dos spots da eletroforese bidimensional.

Nº Spot	Nome da proteína	Coverage	Score	Matches	pI	MW (Da)
1CL	Cadeia beta do Fibrinogênio	63%	95	18	7.57	47543
2CL	Proteína da matriz extracelular 2	20%	66	15	5.36	37020
3CL	Actina, citoplasmática 1	49%	68	15	4.47	38256
4CL	Queratina 14	50%	104	37	4.13	43176
5CL	Heparan sulfato glucosamina 3-O-sulfotransferase 3A1	24%	58	12	3.70	36264
6CL	Putative ankirin repeat domain-containing protein 26-like protein	19%	65	12	5.13	59501
7CL	Fator de necrose tumoral alfa induzido proteína 8-like 1 (TIPE1)	18%	62	9	9.26	31343
8CL	Stanniocalcina-2	21%	62	13	7.55	31516
9CL	Lisofosfolipase eosinofílica	33%	58	48	7.34	32799
10CL	GDP-fucose proteína O-fucosiltransferase 1 (OFUT1)	30%	62	52	7.84	31730

O Score da Proteína maior que 56 são significantes ($p < 0.05$).

6. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm sido realizados a cerca do colesteatoma na tentativa de descobrir novos aspectos da etiopatogenia da doença. Neste contexto, pesquisas dedicadas ao esclarecimento da biologia molecular envolvida no colesteatoma são de grande valia para a compreensão de sua causa, variabilidade de apresentação e agressividade.

Dentre estes estudos, vários trabalhos utilizando métodos imunohistoquímicos possibilitaram a análise mais detalhada de algumas proteínas e sua participação na etiopatogenia do colesteatoma. Este método já trouxe progressos no diagnóstico de diversas doenças, permitindo a identificação de proteínas específicas de um determinado tecido. Atualmente, encontra-se bem estabelecido como rotina em grande parte dos laboratórios de anatomia patológica do mundo, auxiliando no diagnóstico de várias patologias, sobretudo na identificação da origem de tecido metastático⁽⁴⁷⁾.

No entanto, as pesquisas utilizando a imunohistoquímica são limitadas pelo pequeno número de proteínas identificadas. Isto se deve à natureza não global desta abordagem, uma vez que as técnicas classicamente utilizadas são capazes de promover a identificação apenas de proteínas definidas antecipadamente. A comunidade científica vem, portanto, intensificando esforços para a padronização de técnicas mais amplas, utilizando amostras biológicas mais simples e com menor custo para realização.

Nos últimos anos, a ferramenta proteômica vem sendo adotada para avaliar o perfil tecidual e conseqüentemente identificação de biomarcadores para os

determinados processos patológicos.

A proteômica busca relacionar a atividade tecidual ao conjunto de proteínas expressas em determinado momento, uma vez que ela é capaz de identificar diretamente as proteínas. Diferentemente da imunohistoquímica, na análise proteômica não é necessário definir previamente as proteínas que serão pesquisadas. Desta maneira, torna-se possível identificar novas moléculas que indiquem alterações do estado fisiológico normal para o patológico, capazes de funcionar como marcadores do processo de doença. Sem esta técnica, ficaríamos limitados às proteínas já exaustivamente estudadas e com tecnologia disponível e acessível para realização da imunohistoquímica.

Não levando em consideração sua base patogênica, todos os tipos de colesteatomas compartilham das mesmas propriedades. Suas características clínicas comuns são invasão, migração, hiperproliferação, alteração na diferenciação celular, agressividade e tendência à recidiva.

No presente estudo foi avaliado o perfil proteômico do colesteatoma. Para tal propósito foi utilizado a pele normal da região retroauricular como controle. Após eletroforese bidimensional, cerca de 393 spots foram detectados no colesteatoma (figura 6). Utilizando técnicas que seguiam metodologias já bem estabelecidas e rotineiramente executadas no LIKA, a partir destes spots inicialmente obtidos foram identificadas 10 proteínas presentes nas amostras de colesteatoma.

Destas proteínas, a queratina 14 foi excluída devido a sua presença na pele retroauricular utilizada como controle na pesquisa. Portanto, por existir também na pele normal, não a consideramos no estudo. Além desta, foi identificada a *putative ankirina repeat domain-containing protein 26-like protein*, cuja existência é discutível

devido à possibilidade desta proteína ser produto de um pseudogene, sendo portanto também excluída do estudo.

Dentre as proteínas encontradas apenas nas amostras de colesteatoma, inicialmente destacamos a actina citoplasmática 1 também citada como β -actina (3CL). A actina é um componente essencial do citoesqueleto que desempenha papel crítico em uma ampla variedade de processos celulares, incluindo a migração celular, divisão celular e a regulação da expressão genética. Estas funções são atribuídas à capacidade de actina para formar filamentos, que podem rapidamente montar e desmontar de acordo com as necessidades da célula⁽⁴⁸⁾.

Nos vertebrados existem seis isoformas, sendo cada uma delas produto de um gene específico. A β -actina é a principal isoforma e é responsável por dirigir a migração celular, sendo fundamental na embriogênese, na cicatrização e na resposta imune⁽⁴⁸⁾. A migração celular é amplamente guiada pela polimerização da β -actina nas margens da membrana celular, criando forças que empurram esta membrana⁽⁴⁹⁾. A expressão aumentada da β -actina estimula a migração celular e sua concentração é maior nas margens das células migratórias⁽⁵⁰⁾.

Bunnell et al, em 2011, demonstraram, pela primeira vez, que a deleção do gene da β -actina leva a importantes defeitos de migração celular, corroborando com a ideia de que a β -actina é essencial para a motilidade celular⁽⁴⁸⁾.

Dentre as várias teorias propostas para o surgimento do colesteatoma adquirido de orelha média, uma das mais prováveis considera a migração epitelial como a origem da doença. Esta migração começaria a partir das margens de uma perfuração da membrana timpânica, ou a partir de suas retrações⁽¹⁹⁾. A presença da β -actina nas amostras de colesteatoma dá suporte a esta teoria.

O colesteatoma apresenta células da camada basal do epitélio com capacidade de formar pseudópodes e através deles é promovida a migração celular e o crescimento do colesteatoma⁽⁵¹⁾. Sugerimos que a β -actina encontrada nas amostras de colesteatoma adquirido é compatível com a teoria da migração epitelial, uma vez que a sua polimerização guia a migração celular. A presença da β -actina nas amostras de colesteatoma justificaria a maior predisposição do tecido epitelial, nestes pacientes, migrar em direção à orelha média gerando acúmulo de escamas de pele nesta região e, desta maneira, originando o colesteatoma.

A proteína heparan sulfato glucosamina 3-O-sulfotransferase 3A1 ou 3-OST-3A (5CL) também foi encontrada nesse estudo através da plataforma proteômica. Esta se refere a uma enzima responsável pela síntese do heparan sulfato, um glicosaminaglicano, molécula cuja estrutura possui um dos açúcares aminados e normalmente são sulfatadas⁽⁵²⁾. Elas se apresentam normalmente em grupos de duas ou três cadeias unidas a uma proteína central formando proteoglicanos, os quais se mantêm em estreita proximidade com a superfície da célula ou com proteínas da matriz extracelular⁽⁵²⁾.

O proteoglicano de heparan sulfato, encontrado em vários tecidos, é responsável por uma variedade de respostas fisiológicas, como o desenvolvimento e crescimento celular, a migração celular e a cicatrização de feridas⁽⁵³⁾. Esta molécula se liga a uma variedade de proteínas e regula uma imensidão de atividades biológicas, incluindo a angiogênese, a coagulação sanguínea e o surgimento de metástases tumorais. Foi ainda demonstrado que o heparan sulfato pode servir como receptor celular para alguns tipos de vírus como, por exemplo, o herpes vírus simples. Neste caso, a 3-OST-3A forma um sítio de ligação para a glicoproteína D presente neste

vírus⁽⁵³⁾.

Além disto, também já foi demonstrado que, a heparan sulfato glucosamina 3-O-sulfotransferase 3A1, durante os processos inflamatórios, interage com as proteínas de ligação da heparina, desempenhando um papel primordial no extravasamento leucocitário e na quimiotaxia. Exerce ainda a função de promover a liberação, pelos macrófagos, de citocinas, como o TNF- α e o IL-1⁽⁵⁴⁾. Wood et al, em 2012, observou que um aumento da ação da IL-6 desencadeia maior expressão do heparan sulfato glucosamina 3-O-sulfotransferase 3A1⁽⁵⁴⁾.

Como já havia sido reportado, anteriormente, as células do colesteatoma apresentam aumento da IL-6 e do TNF- α , citocinas capazes de agravar a doença devido às atividades biológicas que lhe são atribuídas no sistema mucociliar, na proliferação celular e no metabolismo ósseo⁽⁵⁵⁾. Também já foi demonstrado aumento de IL-1 no colesteatoma⁽¹⁰⁾. Outros autores também já reiteraram a produção destas citocinas pelas células do colesteatoma^(25,56).

A IL-1 estimula a reabsorção óssea, aumentando o número de células precursoras dos osteoclastos, além de estimular a produção de prostaglandinas e colagenases pelos fibroblastos e osteoblastos. A IL-6 também induz à formação de osteoclastos⁽²⁾. Já foi demonstrado que a IL-6 induz a formação de osteoclastos e sua elevada concentração foram associadas à erosão da cadeia ossicular e presença de tecido de granulação intraoperatório⁽¹⁰⁾.

Já o TNF- α , também aumentado na presença da heparan sulfato glucosamina 3-O-sulfotransferase 3A1, age, no colesteatoma, como um mediador nos processos de destruição e remodelação dos tecidos, aumenta a atividade das colagenases, expondo a superfície óssea à ação dos osteoclastos. A concentração de TNF- α é proporcional

ao grau de destruição óssea⁽³¹⁾. Ele também estimula a síntese proteica, proliferação e diferenciação dos queratinócitos, fazendo com que haja um aumento na produção de queratina⁽³²⁾.

Desta maneira, a presença da heparan sulfato glucosamina 3-O-sulfotransferase 3A1 nas amostras de colesteatoma é coerente com os trabalhos anteriormente publicados. Sua ação no aumento da liberação e atuação destas citocinas envolvidas na fisiopatologia do colesteatoma a coloca como potencial biomarcador para esta doença.

Seguindo na investigação de mediadores inflamatórios, encontramos expressão aumentada no colesteatoma do fator de necrose tumoral α induzido proteína 8-like 1 ou TIPE1 (7CL), que parece regular a morte celular, possuindo uma atuação significativa na homeostase imunológica e no desenvolvimento do câncer⁽⁵⁷⁾.

Jian et al, em 2011, examinaram a expressão do TIPE1 em tecidos de roedor e em células humanas utilizando imunohistoquímica, reação em cadeia da polimerase e *Western Blot*. Níveis elevados de TIPE1 foram detectados em linhagens celulares de carcinomas, especialmente em células transformadas por genomas virais⁽⁵⁸⁾. Estes resultados sugerem que TIPE1 pode executar funções de carcinogênese, sobretudo devido à sua atividade na regulação da morte celular.

No colesteatoma, a apoptose está acentuadamente intensificada quando comparada à pele saudável. A hiperproliferação das células epiteliais do colesteatoma é contrabalanceada por este aumento da taxa de morte celular programada, o que o diferencia do carcinoma de células escamosas, no qual a proliferação celular aumentada sem uma elevação compensatório da apoptose pode ser associado com a transformação maligna⁽⁵⁹⁾. Estes dados nos fazem crer que a

presença da TIPE1 nas amostras de colesteatoma pode funcionar como um marcador de morte celular, nos permitindo inferir, futuramente, o grau de hiperproliferação celular e agressividade desta doença.

Outra proteína identificada no “pool” de amostras de colesteatoma e não no “pool” da pele retroauricular dos mesmos indivíduos foi a cadeia beta do fibrinogênio (1CL). Esta proteína é codificada por um gene localizado no cromossomo 4q28 e expressa o fibrinogênio que é uma glicoproteína formada por três pares de cadeias polipeptídicas não-idênticas: as cadeias alfa, beta e gama⁽⁶⁰⁾.

Após a lesão vascular, o fibrinogênio é clivado pela trombina para formar a fibrina, que é o componente mais abundante nos coágulos. Além disto, vários produtos clivados do fibrinogênio e da fibrina regulam a adesão celular e a sua proliferação, possuem atividades vasoconstrictoras e quimiotáticas, além de serem mitógenos para vários tipos celulares⁽⁶¹⁾.

O fibrinogênio é uma proteína abundante no plasma desempenhando papel fundamental na hemostasia, nas reações inflamatórias, no reparo tecidual e na cicatrização. O fibrinogênio estimula a angiogênese melhorando a adesão celular, migração e diferenciação das células endoteliais⁽⁶¹⁾. É sabidamente um marcador de inflamação, bem como proteína C reativa e algumas citocinas pró-inflamatórias. Este fato justifica o aparecimento da cadeia beta do fibrinogênio nas amostras de colesteatoma do nosso estudo, uma vez que o processo inflamatório nesta doença é evidente. Outras citocinas inflamatórias, como o TNF, IL-1 e IL-6, já foram identificadas no colesteatoma anteriormente^(16,55).

Além se sua função como marcador inflamatório, cadeia beta do fibrinogênio apresentou sua concentração diretamente relacionada ao tamanho tumoral nos

pacientes com tumor estromal gastrointestinal, neoplasia mesenquimal mais comum do trato gastrointestinal. Estes achados colocaram a cadeia beta de fibrinogênio como marcador diagnóstico deste tipo de morbidade⁽⁶²⁾.

Outra proteína encontrada no colesteatoma adquirido foi a lisofosfolipase eosinofílica ou proteína dos cristais de Charcot-Leyden (9CL), produzida pela transcrição do gene CLC. É o único constituinte dos eosinófilos humanos que forma cristais hexagonais bipiramidais vistos em tecidos e secreções de sítios de inflamação associada a eosinófilos⁽⁶³⁾. Esta proteína corresponde a aproximadamente 10% do total de proteínas celulares dos eosinófilos e basófilos. A identificação dela em fluidos corporais é considerada um marcador de inflamação alérgica associada aos eosinófilos⁽⁶⁴⁾.

Ghafouri et al, em 2006, examinou o lavado nasal de pacientes com rinite alérgica sazonal e de indivíduos saudáveis. As amostras foram coletadas antes da estação de maior intensidade da alergia e durante esta estação do ano. Foi realizada eletroforese em gel bidimensional e 20 proteínas foram identificadas utilizando a plataforma proteômica. A lisofosfolipase eosinofílica, proteína não anteriormente identificada no lavado nasal, foi encontrada em todas as amostras dos pacientes com rinite alérgica durante a estação de piora da alergia, mas não foi evidenciada em nenhuma amostra antes da temporada alérgica⁽⁴⁶⁾.

Upton et al em 2011, coletaram fragmentos da mucosa nasossinusal de três pacientes com rinosinusite crônica com polipose e de outros três indivíduos submetidos à excisão transesfenoidal de tumores hipofisários utilizados como controle. Através da análise proteômica, mais de trezentas proteínas foram encontradas e identificados, muitas delas envolvidas na resposta inflamatória do

hospedeiro. Um total de quinze proteínas foram identificadas pela espectrometria de massa, das quais oito foram encontradas significativamente aumentadas na polipose nasal em comparação com a mucosa dos controles, enquanto que sete delas estavam diminuídas. Dentre proteínas encontradas em abundância nas amostras estudadas a lisofosfolipase eosinofílica foi a que apresentou maior significância⁽⁴⁴⁾.

Na polipose nasal, o papel dos eosinófilos e de seus mediadores na inflamação subepitelial já está plenamente estabelecido, havendo intensa inflamação eosinofílica subepitelial em mais de 80% dos casos de pólipos nasais. Acredita-se que os mediadores eosinofílicos, como a lisofosfolipase eosinofílica, sejam responsáveis pelo dano epitelial da mucosa dos seios paranasais através de seus efeitos citotóxicos^(44,45).

Além destes efeitos citotóxicos já evidenciados, a função exata da lisofosfolipase eosinofílica na fisiopatologia do colesteatoma ainda carece de investigação, uma vez que, embora já tenha sido descrita em outras doenças otorrinolaringológicas, é a primeira vez que aparece no colesteatoma. O achado desta proteína amplia a perspectiva de pesquisas de novas células e mediadores inflamatórios que possam estar envolvidos na etiopatogenia desta doença. O papel da inflamação eosinofílica, já exaustivamente estudada em outras doenças, como nas doenças de origem alérgica e na polipose nasal, deve ampliar as perspectivas de novos estudos para identificação de seu possível papel na origem dos colesteatomas adquiridos.

Outra proteína encontrada no colesteatoma foi uma glicosiltransferase, a proteína GDP-fucose O-fucosiltransferase 1 ou OFUT1 (10CL), a qual exerce um papel importante na via de sinalização *Notch* através das modificações realizadas nos fatores de crescimento epidérmico constituintes de seus receptores. Proteínas *Notch*

são receptores de superfície para ligações transmembrana, cuja porção extracelular contém trinta e seis repetições de fatores de crescimento epidérmico. Estas repetições, sofrem modificações através da O-fucosilação, além da O-glucosilação⁽⁶⁵⁾.

A sinalização pelas proteínas *Notch* regula alguns mecanismos celulares, exercendo função essencial no desenvolvimento de várias doenças humanas, inclusive determinados tipos de cânceres⁽⁶⁶⁾. Mutações dos receptores *Notch*, bem como dos outros componentes de sua via de sinalização estão implicados em doenças como esclerose múltipla e leucemia⁽⁶⁶⁾.

Experimentos recentes demonstraram um efeito supressor dos receptores transmembrana *Notch* na diferenciação dos osteoblastos e dos osteoclastos. O osso, de uma forma geral, é um tecido composto de células e matriz extracelular. Suas células são classificadas em duas categorias principais: os osteoblastos, capazes de formar tecido ósseo e os osteoclastos, responsáveis por sua reabsorção. O remodelamento ósseo é, portanto, resultado da atividade de coordenação de osteoblastos, os quais formam uma nova matriz, e os osteoclastos, que reabsorvem osso. O efeito supressor dos receptores *Notch* na diferenciação destas células faz com que esta via de sinalização exerça papel importante no processo de desenvolvimento ósseo e de sua neoformação⁽⁶⁷⁾.

Acredita-se que, no colesteatoma, os defeitos ósseos sejam decorrentes de processos ativos de reabsorção⁽¹⁶⁾. O mecanismo desta reabsorção, no entanto, não é completamente entendido. A presença da OFUT1 nas nossas amostras e sua função na via de sinalização *Notch* reafirmam a importante e essencial atividade desta via de sinalização no processo de erosão e remodelamento ósseo tão intensamente observado nos pacientes com colesteatoma.

Postula-se que os osteoclastos exerçam função primordial neste processo de reabsorção óssea no colesteatoma. Hamzei et al, em 2003, confirmaram a presença osteoclastos em amostras de colesteatoma. Eles também demonstraram um aumento considerável do número de células precursoras de osteoclastos na perimatriz do tecido colesteatomatoso⁽⁶⁸⁾.

A presença da OFUT1 nas amostras de colesteatoma e o papel supressor dos receptores *Notch* na diferenciação dos osteoclastos e dos osteoblastos ratificam a função desta proteína como reguladora no remodelamento e neoformação óssea e confirmam sua possível participação na fisiopatologia do colesteatoma. A proteína OFUT1, pode se representar, neste contexto, como um possível marcador de destruição do tecido ósseo subjacente ao colesteatoma adquirido.

Outra proteína detectada nas amostras de colesteatoma, foi a stanniocalcina 2 (8CL), glicoproteína presente em tanto em vertebrados aquáticos quanto terrestres, cuja função exata é ainda desconhecida⁽⁶⁹⁾.

Volland et al em 2009, ao investigar esta glicoproteína em amostras de neuroblastoma, tumor sólido extracraniano comum na infância, observou que esta estava aumentada no estágios metastáticos da doença, no entanto *in vitro* foi demonstrada redução da proliferação celular decorrente do aumento da apoptose⁽⁷⁰⁾. Dados deste artigo também indicam que a stanniocalcina 2 está associada ao aumento do potencial invasivo e a uma maior atividade da matriz metaloproteinase 2 (MMP2)⁽⁷⁰⁾.

As metaloproteinases são enzimas proteolíticas responsáveis pela homeostase óssea apresentando aumento em suas concentrações nas doenças inflamatórias osteolíticas. Em estudo recente, foi evidenciada expressão da MMP2 em

colesteatomas, sendo que os indivíduos que evoluíram com complicações tiveram uma expressão imunohistoquímica de MMP2 mais intensa, sugerindo a possibilidade que esta proteína possa ativar os mecanismos de invasão óssea do colesteatoma⁽²⁶⁾. Outros achados também relacionam a expressão na MMP2 nas amostras de colesteatoma^(25,27,71).

Este efeito positivo da stanniocalcina 2 sobre a expressão da MMP2 e a indicação de aumento desta última nos indivíduos com colesteatoma, inclusive mantendo relação com sua agressividade, confirma a importância do nosso achado da stanniocalcina 2 nas amostras de colesteatoma adquirido, diferentemente do que foi observado na pele retroauricular. A MMP2 como já mencionado acima tem papel importante na invasão e destruição óssea pelo colesteatoma. A stanniocalcina 2 pode, portanto, ser o ponto de partida para deste processo marcado pela erosão óssea progressiva, tendo potencial de se tornar um excelente biomarcador desta enfermidade.

Já foi também demonstrado que os osteoblastos, bem como as células tronco mesenquimais humanas, produzem quantidade significativa de stanniocalcina 2, a qual desempenha importante papel na biologia das células tronco e também na homeostase do cálcio e do fósforo. Ela ainda exerce ação fundamental na diferenciação das células troncos em osteoblastos. Os osteoblastos secretam uma infinidade de proteínas bem como mediadores de mineralização óssea e são responsáveis pela liberação de fatores de crescimento e citocinas que controlam a reabsorção osteoclástica⁽⁷²⁾.

Estes fatores confirmam a função potencial da stanniocalcina 2 como marcador molecular do colesteatoma, uma vez que seu papel no metabolismo ósseo,

essencial na fisiopatologia do colesteatoma, já foi descrito anteriormente pelos autores acima mencionados.

Além deste efeitos no metabolismo ósseo, a stanniocalcina 2 já foi também implicada como marcador de células do câncer de próstata hormônio resistentes, característica não observada em indivíduos com a próstata normal bem como em cânceres prostáticos dependentes de hormônio. Além disso, notou-se que a redução da expressão da stanniocalcina 2 resultou em uma diminuição drástica do crescimentos das células cancerígenas, reforçando sua propriedade oncogênica⁽⁷³⁾.

Outro estudo encontrou aumento de expressão da stanniocalcina 2 em amostras de câncer gástrico e colorretal quando comparadas a mucosas normais⁽⁷⁴⁾. Nestes pacientes, os níveis desta proteína estão diretamente relacionado à frequência de metástase linfonodal, à morte tumoral, ao tamanho do tumor e ao seu estágio de classificação. Observa-se ainda piora nas taxas de sobrevida no pacientes que apresentam níveis aumentados da stanniocalcina 2⁽⁷⁵⁾. Estes estudos corroboram com as evidências de que a stanniocalcina 2 seria um regulador da progressão de tumores. A expressão desta proteína em células sob hipóxia está associada à invasão tumoral e metástase. ⁽⁷⁶⁾.

Ainda nesse trabalho, observou-se que a proteína da matriz extracelular II ou glicoproteína matriz SC1/ECM2 (2CL) também foi encontrada nas amostras de colesteatoma. Esta proteína é um importante componente da matriz extracelular, pertencente à família da “small leucine-rich proteoglycan” e sua função fisiológica está estritamente relacionada à agregação e à adesão celular⁽⁷⁷⁾.

Alterações quantitativas e qualitativas dos componentes da matriz extracelular pode ser induzida por citocinas que modificam o metabolismo celular do

tecido conectivo. Juntamente com imunoglobulinas, é capaz de aumentar a proliferação de células B, além de aumentar a linfopoiese quando expressa como uma proteína transmembrana nos fibroblastos⁽⁷⁸⁾. A produção destes mediadores pode ser deflagrada pela penetração do espaço submucoso pela infecção da orelha média, bem como pela necrose celular.

As proteínas descritas acima encontradas nas amostras de colesteatoma não haviam sido identificadas nesta doença anteriormente. Apesar disso, os trabalhos publicados sobre suas participações no funcionamento celular e tecidual, tornam as características destas proteínas plenamente compatíveis com as teorias já publicadas acerca da fisiopatologia do colesteatoma. Estes achados, portanto, abrem espaço para uma caracterização mais fidedigna dos parâmetros moleculares do colesteatoma e ampliam as possibilidades de novos estudos que nos permitam entender com maior clareza os mecanismos que levam ao surgimento, evolução e perpetuação deste tipo de doença.

7. CONCLUSÃO

O colesteatoma adquirido, apesar dos conhecimentos acumulados desde sua primeira descrição, ainda se mantém como um problema de saúde pública distante de ser solucionado. O entendimento mais profundo de sua patogênese é de extrema importância visto que a natureza desta lesão é destrutiva e causadora de complicações potencialmente graves.

O objetivo deste estudo foi empregar as técnicas proteômicas para verificar as proteínas expressas no colesteatoma. As principais proteínas encontradas no colesteatoma foram a β -actina, a heparan sulfato glucosamina 3-O-sulfotransferase 3A1, a cadeia beta do fibrinogênio, o fator de necrose tumoral alfa induzido proteína 8-like 1, a proteína OFUT1, a stanniocalcina-2, a lisofosfolipase eosinofílica, e a proteína da matriz extracelular 2.

Baseado nestes achados, traçou-se o perfil proteômico do colesteatoma adquirido, identificando proteínas ainda não isoladas nesta patologia e possibilitando uma caracterização mais fidedigna dos seus parâmetros moleculares. Futuramente, espera-se que seja possível, através de novas pesquisas, correlacionar as proteínas identificadas com os achados clínicos da doença.

Há ainda a expectativa de que sejam definidos biomarcadores úteis para o diagnóstico e seguimento das lesões colesteatomatosas, através da utilização de testes enzimáticos séricos ou até mesmo biosensores, como acontece no hemoglicoteste para pacientes diabéticos. Pesquisas continuarão sendo realizadas a fim de permitir uma melhor assistência aos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Zorzetto NL. Anatomia da orelha. Otorrinolaringologia Princípios e Prática. 2006. p. 23–60.
2. Ribeiro FAQ, Pereira CSB. Otite Média Crônica Colesteatomatosa. In: Caldas Neto S, de Mello Junior JF, Martins RHG, Costa SS Da, editors. Tratado de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cervicofacial. 2º ed. Roca; 2011. p. 122–35.
3. Pereira, Celina SB; Almeida, Clemente IR, Vianna MR. Imunoexpressão da citoqueratina 16 e do antígeno nuclear Ki-67 no colesteatoma adquirido da orelha média. Brazilian journal of otorhinolaryngology. 2002;68(4):453–60.
4. Costa SS, Cruz OLM, Oliveira JAA. Otorrinolaringologia Princípios e Prática. 2ª Edição. Otorrinolaringologia Princípios e Prática. São Paulo: Artmed; 2006. p. 309–33.
5. Friedmann I. Epidermoid cholesteatoma and cholesterol granuloma; experimental and human. The Annals of otology rhinology and laryngology. 1959;68(1):57–79.
6. Lim DJ, Saunders WH. Acquired cholesteatoma: light and electron microscopic observations. The Annals of otology rhinology and laryngology. 1972;81(1):1–11.
7. Gyo K, Sasaki Y, Hinohira Y, Yanagihara N. Residue of middle ear cholesteatoma after intact canal wall tympanoplasty: surgical findings at one year. The Annals of otology rhinology and laryngology [Internet]. 1996;105(8):615–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8712631>

8. Aquino JEAP, Cruz Filho NA, de Aquino JNP. Epidemiology of middle ear and mastoid cholesteatomas: study of 1146 cases. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* [Internet]. 2011 Jun;77(3):341-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21739009>
9. Caldas N, Caldas Neto SS. Considerações sobre colesteatomas residuais e iatrogênicos. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 1988;54(2):51-3.
10. Alves AL, Ribeiro FAQ. O papel das citocinas no colesteatoma adquirido da orelha média: revisão da literatura. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2004;70(6):813-8.
11. Singh B, Maharaj TJ. Radical mastoidectomy: its place in otitic intracranial complications. *The Journal of laryngology and otology* [Internet]. 1993;107(12):1113-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8288998>
12. Mustafa A, Heta A, Kastrati B, Dreshaj S. Complications of chronic otitis media with cholesteatoma during a 10-year period in Kosovo. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* [Internet]. 2008 Dec [cited 2012 Dec 3];265(12):1477-82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18478242>
13. Souza G De, Martins Q, Hausen-pinna M, Tsuji RK, Vuono R, Neto DB, et al. Descrição de 34 Pacientes com Otite Média Crônica Colesteatomatosa Complicada. *Arquivos internacionais de Otorrinolaringologia*. 2008;12(3):370-6.

14. House JW, Sheehy JL. Cholesteatoma with intact tympanic membrane: a report of 41 cases. *The Laryngoscope*. 1980. p. 70-6.
15. Levenson MJ, Michaels L, Parisier SC, Juarbe C. Congenital cholesteatomas in children: an embryologic correlation. *The Laryngoscope*. 1988;98(9):949-55.
16. Olszewska E, Wagner M, Bernal-Sprekelsen M, Ebmeyer J, Dazert S, Hildmann H, et al. Etiopathogenesis of cholesteatoma. *European archives of otorhinolaryngology official journal of the European Federation of OtoRhinoLaryngological Societies EUFOS affiliated with the German Society for OtoRhinoLaryngology Head and Neck Surgery* [Internet]. 2004;261(1):6-24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12835944>
17. Tos M. A new pathogenesis of mesotympanic (congenital) cholesteatoma. [Internet]. *The Laryngoscope*. 2000. p. 1890-7. Available from: <http://www.hubmed.org/display.cgi?uids=11081605>
18. Wang EW, Jung JY, Pashia ME, Nason R, Scholnick S, Chole RA. Otopathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains as competent biofilm formers. *Archives of otolaryngologyhead neck surgery* [Internet]. 2005;131(11):983-9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16301370
19. Ghinst MV, Rimmelinck M, Mansbach A, Hassid S, Choufani G. Galectin-1, -3, -7 Expressions in Congenital and Acquired Pediatric Cholesteatomas Compared to External Auditory Canal Skin. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*. 2012;5(2):62-7.
20. Trörltsch A van. *The diseases of the ear their diagnosis and treatment*. 1864.

21. Park K, Park HJ, Chun YM. Immunohistochemical study on proliferative activity of experimental cholesteatoma. *European archives of otorhinolaryngology official journal of the European Federation of OtoRhinoLaryngological Societies EUFOS affiliated with the German Society for OtoRhinoLaryngology Head and Neck Surgery*. 2001;258(3):101-5.
22. Kojima H, Tanaka Y, Tanaka T, Miyazaki H, Shiwa M, Kamide Y, et al. Cell proliferation and apoptosis in human middle ear cholesteatoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* [Internet]. 1998 Mar;124(3):261-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12541781>
23. Olszewska E, Chodyncki S, Chyczewski L, Rogowski M. Some markers of proliferative activity in cholesteatoma epithelium in adults. *Medical science monitor international medical journal of experimental and clinical research* [Internet]. *International Scientific Literatur*; 2006 [cited 2012 Jul 17];12(8). Available from: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=18131303>
24. Schönermark M, Mester B, Kempf HG, Bläser J, Tschesche H, Lenarz T. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in human cholesteatomas. *Acta otolaryngologica*. 1996;116(3):451-6.
25. Rezende CEB, Souto RP Do, Rapoport PB, Campos L De, Generato MB. Cholesteatoma gene expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors by RT-PCR. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* [Internet]. 2012 Jun;78(3):116-21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22714856>
26. Morales DSR, Penido NDO, Silva IDCG Da, Stávale JN, Guilherme A, Fukuda Y. Matriz Metaloproteinase 2: um importante marcador genético para

- colesteatomas. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* [Internet]. 2007 Feb;73(1):55–61. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992007000100009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
27. Suchozebrska-Jesionek D, Szymanski M, Kurzepa J, Gołabek W, Stryjecka-Zimmer M. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 in middle ear cholesteatoma. *Journal of otolaryngology head neck surgery Le Journal otorhinolaryngologie et de chirurgie cervicofaciale* [Internet]. 2008;37(5):628–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19128667
28. Kobayashi H, Asano K, Kanai K, Suzaki H. Suppressive activity of vitamin D3 on matrix metalloproteinase production from cholesteatoma keratinocytes in vitro. *Mediators of inflammation* [Internet]. 2005 Aug 31 [cited 2012 Jul 18];2005(4):210–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1526486&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Ahn JM, Huang CC, Abramson M. Interleukin 1 causing bone destruction in middle ear cholesteatoma. *Otolaryngologyhead and neck surgery official journal of American Academy of OtolaryngologyHead and Neck Surgery*. 1990;103(4):527–36.
30. Albino AP, Kimmelman CP, Parisier SC. Cholesteatoma: a molecular and cellular puzzle. *The American journal of otology* [Internet]. 1998;19(1):7–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9455941>

31. Vitale RF, Ribeiro FDAQ. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* [Internet]. 2007;73(1):117-21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17505610>
32. Vitale RF, Pereira CSB, Alves AL, Fregnani JHTG, Ribeiro FQ. TNF-R2 expression in acquired middle ear cholesteatoma. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* [Internet]. 2011;77(4):531-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21860983>
33. Jin BJ, Min HJ, Jeong JH, Park CW, Lee SH. Expression of EGFR and Microvessel Density in Middle Ear Cholesteatoma. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*. Korean Society of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery; 2011;4(2):67-71.
34. Raffa S, Leone L, Scrofani C, Monini S, Torrisi MR, Barbara M. Cholesteatoma-associated fibroblasts modulate epithelial growth and differentiation through KGF/FGF7 secretion. *Histochemistry and cell biology* [Internet]. 2012 Aug [cited 2012 Nov 10];138(2):251-69. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3407559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
35. Kavallaris M, Marshall GM. Proteomics and disease: opportunities and challenges. *The Medical journal of Australia* [Internet]. 2005;182(11):575-9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15938685

36. Souza MDE, Pinho L. *Biologia Molecular do Câncer Colorretal: Uma Revolução Silenciosa em Andamento Molecular Biology of Colorectal Cancer : A Silent Revolution*. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. 2008;28(3):363 – 368.
37. Dunn MJ. The field of proteomics continues to expand. *Proteomics* [Internet]. 2012 Jan;12(1):1-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22223622>
38. Søreide K, Nedrebø BS, Knapp JC, Glomsaker TB, Søreide JA, Kørner H. Evolving molecular classification by genomic and proteomic biomarkers in colorectal cancer: potential implications for the surgical oncologist. *Surgical oncology* [Internet]. 2009;18(1):31-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18672360>
39. Jurinke C, Denissenko MF, Oeth P, Ehrich M, van den Boom D, Cantor CR. A single nucleotide polymorphism based approach for the identification and characterization of gene expression modulation using MassARRAY. *Mutation research* [Internet]. 2005 Jun 3 [cited 2012 Jul 21];573(1-2):83-95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829239>
40. Flensburg J, Nordvarg H, Rönn O, Öhman J, Marouga R, Lundgren B, et al. A Proteomics Approach to the Study of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2004;15(4):265-75.
41. Kim JL, Jung HH. Proteomic analysis of cholesteatoma. *Acta oto-laryngologica* [Internet]. 2004 Sep [cited 2012 Jul 15];124(7):783-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15370560>
42. Chiarella G, Saccomanno M, Scumaci D, Gaspari M, Faniello MC, Quaresima B, et al. Proteomics in Ménière disease. *Journal of cellular physiology* [Internet].

- 2011;227(1):308–12. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21437900>
43. Preciado D, Goyal S, Rahimi M, Watson AM, Brown KJ, Hathout Y, et al. MUC5B Is the predominant mucin glycoprotein in chronic otitis media fluid. *Pediatric research* [Internet]. 2010 Sep;68(3):231–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20531251>
44. Upton DC, Welham NV, Kuo JS, Walker JW, Pasic TR. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a proteomic analysis. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* [Internet]. 2011 Dec;120(12):780–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22279949>
45. Tewfik MA, Latterich M, DiFalco MR, Samaha M. Proteomics of nasal mucus in chronic rhinosinusitis. *American Journal of Rhinology* [Internet]. 2011;21(6):680–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18201447>
46. Ghafouri B, Irander K, Lindbom J, Tagesson C, Lindahl M. Comparative proteomics of nasal fluid in seasonal allergic rhinitis. *Journal of Proteome Research*. 2006;5(2):330–8.
47. Immunohistochemistry D. Diagnostic immunohistochemistry. *Diagnostic Cytopathology* [Internet]. Wiley-VCH; 2004;27(5):316–316. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1817589>
48. Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, Ervasti JM. β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Molecular biology of the cell* [Internet]. 2011 Nov [cited 2012 Nov 3];22(21):4047–58. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3204067&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
49. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* [Internet]. Elsevier; 2003;112(4):453–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600310>
 50. Peckham M, Miller G, Wells C, Zicha D, Dunn GA. Specific changes to the mechanism of cell locomotion induced by overexpression of beta-actin. *Journal of Cell Science* [Internet]. *Co Biol*; 2001;114(Pt 7):1367–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257002>
 51. Robinson AC, Hawke M. The motility of keratinocytes in cholesteatoma: an ultrastructural approach to epithelial migration. *The Journal of otolaryngology* [Internet]. 1991;20(5):353–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1960792>
 52. Shimabukuro Y, Ichikawa T, Terashima Y, Iwayama T, Oohara H, Kajikawa T, et al. Basic fibroblast growth factor regulates expression of heparan sulfate in human periodontal ligament cells. *Journal of Cellular Physiology* [Internet]. 2008;216(3):232–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18412142>
 53. Wille I, Rek A, Krenn E, Kungl AJ. Biophysical investigation of human heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3A: a mutual effect of enzyme oligomerisation and glycosaminoglycan ligand binding. *Biochimica et Biophysica Acta* [Internet]. 2007;1774(11):1470–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17936096>

54. Wood MW, Breitschwerdt EB, Gookin JL. Autocrine effects of interleukin-6 mediate acute-phase proinflammatory and tissue-reparative transcriptional responses of canine bladder mucosa. *Infection and immunity* [Internet]. 2011 Feb [cited 2012 Nov 21];79(2):708–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3028824&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
55. Kato A, Ohashi Y, Masamoto T, Sakamoto H, Uekawa M, Nakai Y. Interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha synthesized by cholesteatoma cells affect mucociliary function in the eustachian tube. *Acta otolaryngologica Supplementum* [Internet]. 1998;538(15):90–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9879407>
56. Ribeiro F de AQR, Pereira CSB, Almeida R. Estudo comparativo de aspectos histológicos e imunohistoquímicos entre o colesteatoma espontâneo do meato acústico externo e o colesteatoma adquirido da orelha média. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. 2004;70(5):602–7.
57. Lou Y, Liu S. The TIPE (TNFAIP8) family in inflammation, immunity, and cancer. *Molecular Immunology* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;49(1-2):4–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21924498>
58. Cui J, Zhang G, Hao C, Wang Y, Lou Y, Zhang W, et al. The expression of TIPE1 in murine tissues and human cell lines. *Molecular Immunology* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;48(12-13):1548–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15224349>

59. Ergün S, Carlsöö B, Zheng X. Apoptosis in meatal skin, cholesteatoma and squamous cell carcinoma of the ear. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences*. 1999;24(4):280-5.
60. Krajewska E, Lewis CE, Chen YY, Welford a, Tazzyman S, Staton C a. A novel fragment derived from the beta chain of human fibrinogen, beta43-63, is a potent inhibitor of activated endothelial cells in vitro and in vivo. *British journal of cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Feb 2 [cited 2012 Nov 26];102(3):594-601. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2822935&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
61. Daly ME, Makris A, Reed M, Lewis CE. Hemostatic regulators of tumor angiogenesis: a source of antiangiogenic agents for cancer treatment? Hellrich K, editor. *Journal Of The National Cancer Institute* [Internet]. Maxim Integrated Products. www.iButtom.com; 2003;95(22):1660-73. Available from: <http://discovery.ucl.ac.uk/30031/>
62. Cho WCS. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Molecular cancer* [Internet]. 2007 Jan [cited 2012 Nov 18];6:25. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1852117&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
63. Weller PF, Bach D, Austen KF. Human eosinophil lysophospholipase: the sole protein component of Charcot-Leyden crystals. *The Journal of Immunology* [Internet]. 1982;128(3):1346-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6173432>

64. Leonidas DD, Elbert BL, Zhou Z, Leffler H, Ackerman SJ, Acharya KR. Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins. *Structure* London England 1993 [Internet]. 1995;3(12):1379-93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8747464>
65. Vodovar N, Schweisguth F. Functions of O-fucosyltransferase in Notch trafficking and signaling: towards the end of a controversy? *Journal of Biology* [Internet]. 2008 [cited 2012 Oct 25];7(2):7. Available from: <http://jbiol.com/content/7/2/7>
66. Rampal R, Luther KB, Haltiwanger RS. Notch signaling in normal and disease States: possible therapies related to glycosylation. *Current Molecular Medicine* [Internet]. 2007;7(4):427-45. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=17584081&retmode=ref&cmd=prlinks>
67. Canalis E. Notch signaling in osteoblasts. *Science signaling* [Internet]. 2008;1(17):pe17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18445833>
68. Hamzei M, Ventriglia G, Hagnia M, Antonopolous A, Bernal-Sprekelsen M, Dazert S, et al. Osteoclast stimulating and differentiating factors in human cholesteatoma. *The Laryngoscope* [Internet]. 2003;113(3):436-42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12616193>
69. Chang AC-M, Hook J, Lemckert F a, McDonald MM, Nguyen M-AT, Hardeman EC, et al. The murine stanniocalcin 2 gene is a negative regulator of postnatal growth. *Endocrinology* [Internet]. 2008 May [cited 2012 Nov

- 25];149(5):2403–10. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18258678>
70. Volland S, Kugler W, Schweigerer L, Wilting J, Becker J. Stanniocalcin 2 promotes invasion and is associated with metastatic stages in neuroblastoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* [Internet]. 2009;125(9):2049–57. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=19582875
71. Wang H, Xu Z, Tang A, Su J. Detection of the activity of MMP2 and MMP9 in middle ear cholesteatoma. *Journal of clinical otorhinolaryngology*. 2004;18(10):620–2.
72. Kristensen LP, Chen L, Nielsen MO, Qanie DW, Kratchmarova I, Kassem M, et al. Quantification of the hMSC secretome during osteogenesis: Temporal profiling and pulsed SILAC labeling identify novel secreted proteins during. 2012.
73. Tamura K, Furihata M, Chung S-Y, Uemura M, Yoshioka H, Iiyama T, et al. Stanniocalcin 2 overexpression in castration-resistant prostate cancer and aggressive prostate cancer. *Cancer Science*. 2009;100(5):914–9.
74. Yokobori T, Mimori K, Ishii H, Iwatsuki M, Tanaka F, Kamohara Y, et al. Clinical significance of stanniocalcin 2 as a prognostic marker in gastric cancer. *Annals of Surgical Oncology* [Internet]. 2010;17(10):2601–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20422456>
75. Ieta K, Tanaka F, Yokobori T, Kita Y, Haraguchi N, Mimori K, et al. Clinicopathological significance of stanniocalcin 2 gene expression in colorectal

- cancer. International journal of cancer Journal international du cancer [Internet]. 2009;125(4):926–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19415750>
76. Law AYS, Wong CKC. Stanniocalcin-2 promotes epithelial-mesenchymal transition and invasiveness in hypoxic human ovarian cancer cells. Experimental Cell Research [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;316(20):3425–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20619259>
77. Bumke MA, Neri D, Elia G. Modulation of gene expression by extracellular pH variations in human fibroblasts: a transcriptomic and proteomic study. Proteomics [Internet]. 2003;3(5):675–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748947>
78. Kuschel C, Steuer H, Maurer A, Kanzok B, Stoop R, Angres B. Cell adhesion profiling using extracellular matrix protein microarrays. BioTechniques [Internet]. 2006 Apr [cited 2012 Nov 4];40(4):523–31. Available from: <http://www.biotechniques.com/article/06404RR03>

APÊNDICES

Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convido o menor de idade sob sua responsabilidade a participar, como voluntário (a), da pesquisa intitulada “Pesquisa de Biomarcadores do Colesteatoma Adquirido”, que será da responsabilidade da pesquisadora Juliana Gusmão de Araujo, com endereço: Hospital das Clínicas/UFPE - Ambulatório de Otorrinolaringologia - Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária. CEP: 50670-901 - Recife PE Telefone (81) 21263638, Celular (81) 88066330. E-mail: gusmao.juliana@yahoo.com. Também participa da pesquisa como orientador o Prof. Dr. Silvio da Silva Caldas Neto, com endereço: Hospital das Clínicas/UFPE - Ambulatório de Otorrinolaringologia - Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária. CEP: 50670-901 - Recife PE Telefone (81) 21263638, Celular (81)88922699. E-mail: silvio_caldas@oi.com.br

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) senhor (a) não será penalizado de forma algum.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

O Colesteatoma é uma doença potencialmente grave que afeta cerca seis indivíduos a cada 100000 habitantes. O paciente acometido por esta doença apresenta supuração constante no ouvido afetado e perda auditiva variável. Ainda não sabemos, ao certo, por que alguns pacientes desenvolvem este problema e outros não. Da mesma maneira, não se sabe o motivo pelo qual, em alguns pacientes, o colesteatoma se apresenta de maneira bastante agressiva podendo levar a sérias complicações, como abscessos cerebrais e cerebelares, meningite, paralisia facial periférica, labirintite infecciosa, abscesso periosteal e petrosite.

O objetivo deste estudo é identificar proteínas que estejam aumentadas no colesteatoma em relação às encontradas na pele normal. Através da identificação destas proteínas, esperamos encontrar instrumentos que nos permitam entender melhor o surgimento desta doença, bem como os aspectos determinantes da variabilidade de sua apresentação.

A descoberta dos biomarcadores do colesteatoma trará como benefício ao menor a possibilidade de novos tratamentos mais eficazes para esta doença. Há perspectiva de que, no futuro, consigamos também identificar, através destes biomarcadores, se o paciente tem maior probabilidade de desenvolver complicações mais graves e, desta maneira, viabilizarmos o tratamento antes que as complicações aconteçam.

O procedimento de coleta do material será realizado durante a cirurgia, como de rotina, uma vez que amostra do colesteatoma já é usualmente retirada para estudo anatomopatológico (biópsia). Além desta amostra, será retirado pequeno fragmento de pele da própria incisão (corte) operatória para que possa ser realizada a comparação com as proteínas da pele normal. Estes procedimentos de coleta de material não acrescentam nenhum risco adicional à saúde física do indivíduo. Deve-se considerar, no entanto, como risco o possível constrangimento que trazido pelo convite para participar da pesquisa, ficando o senhor (a) livre para recusar.

As informações obtidas nesse estudo serão confidenciais, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. O menor não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. O menor e seu responsável são livres para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento sem nenhum prejuízo no seu tratamento. Os dados referentes à pesquisa serão arquivados no prontuário do paciente e em arquivo pessoal do pesquisador pelo prazo mínimo de cinco anos.

O acompanhamento médico será realizado de forma habitual no serviço onde sua cirurgia será realizada. Sua opção em participar ou não da pesquisa não acarretará em nenhum prejuízo no atendimento pré-operatório, no ato cirúrgico, nem tão pouco no acompanhamento que se faça necessário após o procedimento.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n - 1º Andar, Sala 4, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 21268588 e-mail: cepccs@ufpe.br.

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, portador da identidade número _____, responsável pelo menor _____ autorizo sua participação no estudo acima descrito como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu tratamento.

Nome e assinatura do (a) responsável:

Assinatura do menor:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunha: _____ / _____
Nome Assinatura

Testemunha: _____ / _____
Nome Assinatura

Recife, ___/___/____

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convido o senhor (a) a participar, como voluntário (a), da pesquisa intitulada “Pesquisa de Biomarcadores do Colesteatoma Adquirido”, que será da responsabilidade da pesquisadora Juliana Gusmão de Araujo, com endereço: Hospital das Clínicas/UFPE - Ambulatório de Otorrinolaringologia - Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária. CEP: 50670-901 - Recife PE Telefone (81) 21263638, Celular (81) 88066330. E-mail: gusmao.juliana@yahoo.com. Também participa da pesquisa como orientador o Prof. Dr. Silvio da Silva Caldas Neto, com endereço: Hospital das Clínicas/UFPE - Ambulatório de Otorrinolaringologia - Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária. CEP: 50670-901 - Recife PE Telefone (81) 21263638, Celular (81)88922699. E-mail: silvio_caldas@oi.com.br

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) senhor (a) não será penalizado de forma algum.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

O Colesteatoma é uma doença potencialmente grave que afeta cerca seis indivíduos a cada 100000 habitantes. O paciente acometido por esta doença apresenta supuração constante no ouvido afetado e perda auditiva variável. Ainda não sabemos, ao certo, por que alguns pacientes desenvolvem este problema e outros não. Da mesma maneira, não se sabe o motivo pelo qual, em alguns pacientes, o colesteatoma se apresenta de maneira bastante agressiva podendo levar a sérias complicações, como abscessos cerebrais e cerebelares, meningite, paralisia facial periférica, labirintite infecciosa, abscesso periosteal e petrosite.

O objetivo deste estudo é identificar proteínas que estejam aumentadas no colesteatoma em relação às encontradas na pele normal. Através da identificação destas proteínas, esperamos encontrar instrumentos que nos permitam entender melhor o surgimento desta doença, bem como os aspectos determinantes da variabilidade de sua apresentação.

A descoberta dos biomarcadores do colesteatoma trará como benefício ao senhor (a) a possibilidade de novos tratamentos mais eficazes para esta doença. Há perspectiva de que, no futuro, consigamos também identificar, através destes biomarcadores, se o senhor (a) tem maior probabilidade de desenvolver complicações mais graves e, desta maneira, viabilizarmos o tratamento antes que as complicações aconteçam.

O procedimento de coleta do material será realizado durante a cirurgia, como de rotina, uma vez que amostra do colesteatoma já é usualmente retirada para estudo anatomopatológico (biópsia). Além desta amostra, será retirado pequeno fragmento de pele da própria incisão (corte) operatória para que possa ser realizada a comparação com as proteínas da pele normal. Estes procedimentos de coleta de material não acrescentam nenhum risco adicional à saúde física do indivíduo. Deve-se considerar, no entanto, como risco o possível constrangimento que trazido pelo convite para participar da pesquisa, ficando o senhor (a) livre para recusar.

As informações obtidas nesse estudo serão confidenciais, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento sem nenhum prejuízo no seu tratamento. Os dados

referentes à pesquisa serão arquivados no prontuário do paciente e em arquivo pessoal do pesquisador pelo prazo mínimo de cinco anos.

O seu acompanhamento médico será realizado de forma habitual no serviço onde sua cirurgia será realizada. Sua opção em participar ou não da pesquisa não acarretará em nenhum prejuízo no seu atendimento pré-operatório, no ato cirúrgico, nem tão pouco no acompanhamento que se faça necessário após o procedimento.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n - 1º Andar, Sala 4, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 21268588 e-mail: cepccs@ufpe.br.

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, portador da identidade número _____, concordo em participar do estudo acima descrito como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu tratamento.
Nome e assinatura do (a) responsável:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunha: _____ / _____
Nome Assinatura

Testemunha: _____ / _____
Nome Assinatura

Recife, ___/___/_____

ANEXO

ANEXO A

HOSPITAL AGAMENON
MAGALHÃES - HAM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de Potenciais Biomarcadores no Colesteatoma Adquirido

Pesquisador: JULIANA GUSMÃO DE ARAUJO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07028012.3.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 133.346

Data da Relatoria: 27/09/2012

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa: Identificação de Potenciais Biomarcadores no Colesteatoma Adquirido

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar e caracterizar potenciais biomarcadores no colesteatomas em comparação com a pele saudável utilizando a plataforma proteômica. Além

de tentar correlacionar os potenciais biomarcadores com a agressividade do colesteatoma

Objetivo Secundário:

Identificar proteínas potencialmente envolvidas na reabsorção óssea Identificar marcadores de hiperproliferação celular Identificar quais proteínas poderiam prever a agressividade e crescimento do colesteatoma

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisa não trará riscos adicionais à saúde física dos indivíduos, uma vez que a amostra do colesteatoma coletada já é usualmente retirada para exame anatomopatológico e tomaremos o devido cuidado de continuar destinando a parte necessária para que o diagnóstico histológico seja confirmado. O fragmento de pele saudável será coletado na mesma incisão operatória na região retroauricular, procedimento este que não trará prejuízos para os indivíduos. Entretanto, consideramos, ainda, como risco adicional (emocional), o

Endereço: Estrada do Arraial, 2723

Bairro: Prédio Anexo a Emergência

CEP: 52.051-380

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3048-0117

Fax: (81)3268-0687

E-mail: cepham@hotmail.com.br

**HOSPITAL AGAMENON
MAGALHÃES - HAM**

constrangimento ao qual o indivíduo poderá eventualmente sofrer ao ser solicitado a participar da pesquisa. A técnica cirúrgica utilizada será determinada pelas características clínicas do indivíduo sem que, de nenhuma maneira, haja influência dos interesses da pesquisa. Os dados dos pacientes constarão no prontuário e os dados referentes à pesquisa no protocolo de pesquisa. Os dados serão mantidos em sigilo, pelo período de cinco anos, não permitindo a divulgação com a identificação dos pacientes, garantindo a privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos.

Benefícios:

Espera-se que sejam identificadas proteínas com importância na patogênese do colesteatoma, sobretudo no que se refere à hiperproliferação celular e à destruição óssea. Desta maneira, procura-se definir biomarcadores capazes de fornecer, no futuro, instrumentos para o diagnóstico precoce, informações prognósticas mais confiáveis e prevenção de recidivas, que beneficiarão diretamente os paciente acometidos por esta doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

DE ACORDO COM AS NORMAS EXIGIDAS PELA PLATAFORMA BRASIL

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

FOLHA DE ROSTO: DE ACORDO COM AS EXIGÊNCIAS DA PLATAFORMA

TCLE: DE ACORDO COM O NORMATIVO

Recomendações:

Nenhuma

NENHUMA

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não será necessário

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Estrada do Arraial, 2723
Bairro: Prédio Anexo a Emergência **CEP:** 52.051-380
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)3048-0117 **Fax:** (81)3268-0687 **E-mail:** cepham@hotmail.com.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de Potenciais Biomarcadores no Colesteatoma Adquirido

Pesquisador: JULIANA GUSMÃO DE ARAUJO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07028012.3.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 141.292

Data da Relatoria: 30/10/2012

Apresentação do Projeto:

Idem.

Objetivo da Pesquisa:

Idem.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Idem.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Idem.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Atendeu as solicitações.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br