

INVESTIGACIÓN BÁSICA

ALTERACIONES DE LA MEMBRANA BASAL EN EL COLESTEATOMA DE OÍDO MEDIO

M. BERNAL SPREKELSEN*, J. EBMEYER**, A. ANONOPOULOS**, G. BORKOWSKI**, H. SUDHOFF**

*SERVICIO DE ORL. HOSPITAL CLÍNICO. BARCELONA.

**SERVICIO DE ORL. HOSPITAL ST. ELISABETH. UNIVERSIDAD DEL RUHR. BOCHUM. ALEMANIA.

RESUMEN

El epitelio del colesteatoma se caracteriza por una disregulación de los queratinocitos acompañada de una destrucción de la cadena osicular y de otras partes óseas del hueso temporal. Los métodos inmunohistoquímicos con anticuerpos a la fibronectina, la tenascina y a las metaloproteinasas pueden emplearse para evaluar las alteraciones de los componentes intrínsecos y extrínsecos de la membrana basal. La orientación espacial queda preservada en los cortes histológicos. El colágeno tipo IV, la tenascina, la fibronectina, el factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF) y las metaloproteinasas de la matriz (MMP) están relacionadas con la matriz y perimatrix de tejido normal y alterado, por

los que se estudian inmunohistoquímicamente, en 20 colesteatomas, 8 muestras de piel normal de CAE y 6 biopsias de mucosa normal de oído medio. Los colesteatomas presentaron alteraciones de la membrana basal con la presencia anormal de MMP y una inmunorreactividad lineal para el colágeno tipo IV y la laminina, interrumpida en zonas con una inflamación intensa. El microscopio electrónico evidenció protrusiones, duplicaciones, engrosamientos y rupturas de la lámina densa de la membrana basal. Se concluye, que las MMPs y el bFGF podrían tener un papel importante en el mantenimiento de la actividad proliferativa y del comportamiento agresivo del colesteatoma de oído medio.

PALABRAS CLAVE: Colesteatoma. Inmunohistoquímica. Microscopio electrónico. Oído medio. Metaloproteinasas. Factor básico de crecimiento fibroblástico. Tenascina. Fibronectina. Colágeno tipo IV.

ABSTRACT

ALTERATIONS OF THE BASAL MEMBRANA IN MIDDLE EAR CHOLESTEATOMA

Cholesteatoma epithelium is characterized by a keratinocyte disregulation accompanied by destruction of the ossicles and other bony parts of the temporal bone. Immunohistochemical methods using antibodies to fibronectin, tenascin and metalloproteinases were used to assess the alterations of the intrinsic and extrinsic components of the basement membrane. Spatial orientation of the basement membrane was preserved in histological sections. Collagen type IV, tenascin, fibronectin, basic fibroblastic growth factor (bFGF), and matrix metalloproteinases (MMPs) are related to the matrix, perimatrix of normal or pathological tissues. They were studied immu-

nohistologically in twenty cholesteatomas, eight samples of normal auditory canal skin, and six specimens of normal middle ear mucosa. Cholesteatomas displayed alterations of the basal membrane, with presence of MMPs and a linear immunoreactivity for collagen type IV and laminin, disrupted in areas with intense inflammation. The electronic microscope revealed protrusions, duplications, thickening and disruptions of the lamina densa of the basement membrane. Thus, we conclude, that MMPs and bFGF could play an important role maintaining the proliferative activity and the aggressive behaviour of cholesteatoma in the middle ear.

KEY WORDS: Cholesteatoma. Immunohistochemistry. Electron microscopy. Middle ear. Metalloproteinases. Basic fibroblastic growth factor. Tenascin. Fibronectin. Collagen type IV.

Correspondencia: M. Bernal Sprekelsen. Servicio de ORL. Hospital Clínic. Villarroel, 170. 08036 Barcelona. E-mail: mbernal@clinic.ub.es

Fecha de recepción: 18-8-2000

INTRODUCCIÓN

El estudio de la membrana basal con el microscopio óptico demuestra una capa de matriz extracelular separando el epitelio del tejido conjuntivo¹. A nivel ultraestructural revela que se trata de una estructura compleja compuesta de dos capas: la lámina lúcida o rara y la lámina densa². Desde un punto de vista bioquímico la red de colágeno y elastina es extraordinariamente heterogénea^{1,3}. Sus componentes se encuentran embebidos en una sustancia basal gelatinosa, constituida por proteoglicanos, glucoproteínas, moléculas de adhesión de origen colagénico y no colagénico, como la laminina, la tenascina y la fibronectina²⁻⁷.

La laminina es una glicoproteína producida por las células epiteliales³. Se trata de un complejo flexible de tres cadenas largas de polipéptidos que configuran una cruz asimétrica, sirviendo de proteína adhesiva, capaz de actuar con las superficies celulares y apoyando de esta manera la unión de las células con la membrana basal (MB).

La tenascina parece tener un papel importante en la organización del crecimiento de la matriz extracelular en el proceso de crecimiento tumoral y de metástasis⁸. Se encuentran dos tipos de fibronectina: un multímero insoluble en células y un dímero soluble en plasma⁷. En el proceso cicatricial la fibronectina tiene un papel importante; promueve la distribución de las plaquetas en la herida, la adhesión y migración de los neutrófilos, monocitos, fibroblastos y células endoteliales hacia la zona de la herida o lesión, así como la migración de células epidérmicas a través del tejido de granulación⁶. En la síntesis de la matriz la fibronectina parece involucrada tanto en la organización del tejido de granulación como de la MB⁶.

El factor básico de crecimiento fibroblástico (*basic fibroblast growth factor* -bFGF), otro de los componentes de la MB asociado a los proteoglicanos, es uno de los estimuladores más potentes de la proliferación de células endoteliales y de fibroblastos⁹. El bFGF pertenece a la familia de factores de crecimiento fibroblásticos constituido por polipéptidos diferentes, pero relacionados estructuralmente⁹.

Las metaloproteinasas de la matriz (*matrix metalloproteinases* -MMPs) son enzimas proteolíticas que pueden tener un papel regulador importante en la morfogénesis tisular, la diferenciación celular y la capacidad de invasión de células tumorales^{10,11}. Ellas representan una familia de enzimas relacionadas estructural y funcionalmente siendo responsables de la degradación proteolítica de los componentes de la matriz extracelular, como de la MB o del estroma intersticial. Las MMPs participan activamente en la remodelación del tejido normal, así como en la cicatrización. Estos enzimas proteolíticos atenúan su actividad por la acción de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (*tissue inhibitors of metalloproteinases* -TIMPs)^{10,11}.

núan su actividad por la acción de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (*tissue inhibitors of metalloproteinases* -TIMPs)^{10,11}.

El presente trabajo, realizado en colesteatomas del oído medio, estudia el tipo, la distribución y las modificaciones de los distintos componentes intrínsecos y extrínsecos de la MB, así como las metaloproteinasas de la matriz mediante técnicas inmunohistoquímicas y microscopio electrónico. Se enfoca el trabajo sobre la región de la MB para buscar su posible papel en la patogenia del colesteatoma y se intenta dilucidar el comportamiento alterado de los queratinocitos observado en esta patología¹²⁻¹⁴.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de tejido se obtuvieron de pacientes operados de colesteatoma. En total se estudiaron 20 colesteatomas, 8 biopsias de piel normal de conducto auditivo externo (CAE) y 6 muestras de mucosa de oído medio normal extraída del promontorio en los mismos pacientes intervenidos de colesteatoma. En todos los pacientes se obtuvo el consentimiento informado para tomar una pequeña biopsia, tanto de piel de CAE como de mucosa del promontorio.

Se analizó la expresión de los componentes de la matriz extracelular y las metaloproteinasas de matriz en las biopsias extraídas. El tejido se trató de la siguiente manera: fijación en formalina, colocación en parafina, secciones de 4 μ m y marcaje con el complejo avidina-biotina (ABC). Todas las muestras fueron examinadas de rutina con la tinción hematoxilina-eosina (HE). Las muestras de cinco colesteatomas se investigaron con el microscopio electrónico de transmisión.

Se emplearon los siguientes anticuerpos policlonales y monoclonales (tabla 1). La tinción inmunohistoquímica se realizó con la técnica ABC (Vectastain, Laboratorios Camon, Wiesbaden, Alemania) de acuerdo con el método descrito por Hsu y cols.¹⁵. Los cortes seriados de parafina de 4 μ m se dispusieron sobre cristales con poli-lisina al 10% (Lab. Sigma, Deisenhofen, Wiesbaden), se desparafinaron, hidrataron y secaron en una noche a 37°C. Los anticuerpos (tabla 1) se diluyeron con suero salino fosfatado (PBS, pH 7,4) con 0,1% BSA. La peroxidasa endógena se eliminó mediante el tratamiento con H₂O₂ al 1% a temperatura de habitación durante 10 minutos y una unión con proteína no específica por incubación con suero de GOAT al 10% a 20° C durante 20 minutos. Una vez lavado el PBS, los cortes se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario (Vectastain-Kit, Laboratorios Camon, Wiesbaden Alemania), seguido de una incubación con el complejo avidina y peroxidasa biotinilada durante 30 minutos a temperatu-

Tabla 1

Antígeno	Anticuerpo	Dilución	Fuente
Colágeno tipo IV	anti-human collagen tipo IV, monoclonal	1:40	DAKO, Hamburgo, Alemania
Tenascina	anti-human tenascin, monoclonal	1:40	DAKO, Hamburgo, Alemania
Fibronectina	anti-human fibronectin, monoclonal	1:100	DAKO, Hamburgo, Alemania
Laminina	anti-human laminin, monoclonal (cadena A)	1:40	DAKO, Hamburgo, Alemania
Factor de crecimiento fibroblástico básico	anti-human bFGF, monoclonal	1:40	R&Systems, Wiesbaden, Alemania
Metaloproteinasas de matriz (MMP 1)	anti-human MMP1, monoclonal	1:40	Dianova, Hamburgo, Alemania
Metaloproteinasas de matriz 2 (MMP 2)	anti-human MMP2, monoclonal	1:40	Dianova, Hamburgo, Alemania
Metaloproteinasas de matriz 3 (MMP 3)	anti-human MMP3, monoclonal	1:40	Dianova, Hamburgo, Alemania

ra de habitación y tratamiento con 3-amino-9etilcarbazol (Lab. Camon, Wiesbaden, Alemania), conllevando a un precipitado de color rojo.

La contratinción se realizó con la hematoxilina de Meyer, después se deshidrataron los cortes y se montaron en un medio de montaje sintético. Los sueros preinmunes y la omisión del anticuerpo primario se usaron como controles negativos. La demostración inmunohistoquímica del colágeno tipo IV y de la laminina en la membrana basal endotelial sirvieron como control interno positivo.

Para los estudios ultraestructurales las muestras se fijaron en glutaraldehído al 3,5% con 0,05M de buffer de sodio fosfatado (pH 7,4%) a 4° C durante 1 hora. Después se fijaron en tetróxido de osmio al 1% (pH 7,4) por dos horas y se lavaron tres veces durante 5 minutos con PBS. El tejido se deshidrató con etanol y óxido de propileno y se colocó en durcupan (Balzers, Walluf, Alemania). Los cortes semifinos de 1 µm fueron teñidos con azul de toluidina para una orientación preliminar. Cortes de aproximadamente 90 nm fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de LEAD para los estudios de microscopía electrónica con un Zeiss 910, 50-80 kV.

RESULTADOS

Mucosa normal de oído medio y piel de CAE

El colágeno tipo IV, la laminina y el bFGF mostraron una expresión inmunorreactiva en línea a lo largo de la membrana basal de piel normal de CAE y de oído medio. La fibronectina y la tenascina marcada revelaron también un patrón lineal continuo, pero en el área extrínseca de la zona de la membrana basal. La fibronectina no demostró ninguna inmunorreactividad específica en ambos epitelios. Ninguna de las MMPs investigadas¹⁻³ se detectó en ambos tejidos.

Colesteatoma de oído medio

En 8 de las 20 muestras el colágeno tipo IV y la laminina no se tiñeron en la membrana basal subepitelial, tomando como control positivo los vasos subepiteliales adyacentes. Los doce casos con inmunorreactividad positiva para el anticuerpo contra el colágeno tipo IV y el anticuerpo contra la laminina revelaron una tinción clara lineal de la membrana basal intrínseca con interrupciones focales de la tinción especialmente en áreas con una inflamación subepitelial intensa. En la unión mucocutánea entre el colesteatoma y la mucosa de oído medio se observó una expresión inmunorreactiva interrumpida continuamente para el colágeno tipo IV, que aparecía menos intenso por debajo del epitelio colesteatomatoso (figura 1A).

No obstante, la expresión de fibronectina y de tenascina se encontró llamativamente incrementada en la zona extrínseca de la MB (figura 1B). La expresión de



Figura 1A. Tinción de colágeno tipo IV en la unión mucocutánea. La inmunorreactividad para colágeno tipo IV aparece menos intenso por debajo del epitelio de colesteatoma (x400).



Figura 1B. Inmunorreactividad para tenascina, marcadamente incrementada en la zona extrínseca de la membrana basal y el tejido conjuntivo subepitelial adyacente (x200).



Figura 3. Células inmunorreactivas a MMP 2 en la perimatrix del colesteatoma de oído medio adyacente a la membrana basal (x400).

fibronectina se observa en la superficie de las fibrillas de colágeno, en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, en los fibroblastos y macrófagos. Un patrón reticular de tinción se observaba en el estroma del colesteatoma, con regiones de diferente intensidad de expresión. La tinción inmunohistoquímica de las membranas subepitelial y vascular para bFGF se halló marcadamente reducida con focos de interrupción. Numerosas células del infiltrado celular inmune, presumiblemente monocitos, macrófagos y mastocitos, mostraron en el citoplasma una tinción positiva al anticuerpo anti-bFGF.

La expresión de las metaloproteinasas 1-3 presentó una intensidad diferente en los fibroblastos, células endoteliales y macrófagos. Observamos una estrecha relación entre la tinción inmunohistoquímica de las MMP y el grado de inflamación (figuras 2 y 3).



Figura 2. Demostración inmunohistoquímica de MMP 3 en colesteatoma de oído medio. Tinción positiva de células inflamatorias en el tejido conjuntivo subepitelial (x400).

Microscopía electrónica

La MB del colesteatoma de oído medio exhibía dos capas principales, la lámina rara o lúcida y la densa. Los queratinocitos de la MB demostraban hemidesmosomas distinguidas en número y estructura. En esta área se observó un número marcadamente elevado de tonofilamentos, irradiando desde la base de las células basales hasta la lámina densa. Detectamos una deposición aumentada de colágeno debajo la membrana basal epitelial, demostrando una agregación fibrilar atípica. La lámina fibrorreticular del colesteatoma reveló fibrillas de anclaje y material amorfo disperso de fibrillas finas y fibrillas de colágeno dispuesto irregularmente. En la lámina densa se observaron protrusiones de la MB, reduplicaciones, engrosamientos e interrupciones focales (figura 4).



Figura 4. Imagen al microscopio electrónico de la zona de la membrana basal demostrando fibrillas de anclaje y material amorfo con arreglo irregular de fibrillas de colágeno y fibrillas finas. Protrusiones de la membrana basal, duplicaciones y rupturas focales (flechas) se observan en la lámina densa (x20.000).

DISCUSIÓN

El colesteatoma se caracteriza anatomopatológicamente por la presencia de epitelio escamoso en el espacio del oído medio¹⁶. En los colesteatomas secundarios el epitelio se origina de las células basales de la membrana timpánica o de la piel de CAE adherida a la membrana timpánica. En la piel de CAE las células basales se encuentran en contacto directo con la MB, se sueltan, emigran verticalmente y se diferencian^{17,18}. Por el contrario, durante el desarrollo del colesteatoma los queratinocitos basales emigran lateralmente para sustituir a la mucosa del oído medio y mantenerse en un estado de hiperproliferación¹²⁻¹⁴.

La pérdida de colágeno tipo IV y laminina podría indicar que el epitelio del colesteatoma emigra hacia la caja del oído medio empleando la membrana basal original de la mucosa como estructura guía¹⁹. Nuestros resultados demuestran una expresión continua para colágeno tipo IV y laminina en la membrana basal de muestras menos inflamadas de colesteatoma. Por el contrario, cuanto mayor es la inflamación del colesteatoma la membrana basal revela discontinuidades y una ausencia de la expresión al colágeno tipo IV y a la laminina. Esto podría deberse a un ensamblaje incompleto o a la liberalización del "turnover" de estas proteínas^{19,20}.

La fibronectina y la tenascina son glicoproteínas ampliamente depositadas en las lesiones inflamatorias crónicas que juegan un papel importante en la reparación de heridas o lesiones^{4,21}. Ambas se conocen como mediadoras de la adhesión de fibroblastos y células endoteliales "in vitro" y de apoyar la migración y proliferación de queratinocitos "in vitro"²⁴. La comparación de la cicatrización epitelial en piel y en córnea demuestra patrones similares al desarrollo del colesteatoma¹⁸. El colesteatoma presenta unas cantidades significantes de fibronectina y tenascina en el tejido conjuntivo subepitelial y el tejido de granulación. Dado que la síntesis y los depósitos de fibronectina y de tenascina persisten en el colesteatoma, éste puede definirse como una herida no cicatrizante¹⁹.

El bFGF, como uno de los factores principales de la membrana basal unido a los proteoglicanos, es uno de los factores angiogénicos más potentes^{9,22}. La degradación de la MB observada es el resultado de los bFGF almacenados fisiológicamente, un mecanismo que podría contribuir al aumento de la actividad proliferativa de la matriz^{9,23}.

Abramson y Huang²⁴ encontraron altas concentraciones de colagenasa en el colesteatoma de oído medio. Las rupturas de la MB asociadas a la inflamación probablemente se deba a la liberación de enzimas proteolíticas, como las metaloproteinasas, cuya liberación se conoce en el transcurso de algunos procesos fisiológicos y patológicos, como la angiogénesis, la reparación cicatricial y la inflamación^{10,11}. Las MMP segregadas por células inflamatorias apoyan su migración desde la circulación sanguínea, atravesando endotelios, membranas basales y matriz extracelular, hacia el tejido periférico¹⁰. Nuestros resultados demuestran una expresión incrementada de las MMP investigadas en las células inflamatorias de la perimatriz, que podrían inducir la degradación observada en la MB de colesteatomas. Banerjee y cols.^{25,26} estudian específicamente las metaloproteinasas 2, 3 y 9 no hallando una diferencia significativa entre la piel de CAE y el colesteatoma, mientras sí encuentran un incremento de la metaloproteinasas-1 en colesteatomas y en tejido de granulación²⁶.

El estudio ultraestructural de la MB confirma los resultados mediante la tinción inmunohistoquímica y en colesteatomas inducidos experimentalmente²⁷. El aumento de los depósitos de colágeno por debajo de la membrana basal epitelial y el material amorfo disperso en la lámina fibrorreticular del colesteatoma probablemente sea el resultado de un incremento de la síntesis de colágeno durante la inflamación crónica y una mayor degradación de los componentes de la matriz extracelular. Las proyecciones de la MB y las duplicaciones de la lámina densa podrían estar asociadas a una mayor actividad de los queratinocitos del colesteatoma.

CONCLUSIONES

Se estudian inmunohistoquímica y ultraestructuralmente la membrana basal y sus componentes en piel de CAE normal, mucosa normal de oído medio y en colesteatomas. Nuestros resultados confirman una interacción alterada entre células y matriz extracelular en las muestras de colesteatoma de oído medio. Se propone un papel para los factores de crecimiento básicos fibroblásticos (bFGF) y las metaloproteinasas de la matriz como responsables de la actividad proliferativa mantenida y el comportamiento agresivo en oído medio.

REFERENCIAS

- 1.- Uitto J, Olsen DR, Fazio MJ. Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. *J Invest Dermatol* 1989; 92:61-74.
- 2.- Eady EA. The basement membrane. Interface between epithelium and the dermis: structural features. *Arch Dermatol* 1988; 124:709-712.
- 3.- Hay ED. Role of basement membranes in development and differentiation. In: *Biology and chemistry of basement membranes*. Kefalides, NA (Ed.) Academic Press, New York, 1978.
- 4.- Clark RA, Folkvord JM, Wertz RL. Fibronectin, as well as other

- extracellular matrix proteins, mediate human keratinocyte adherence. *J Invest Dermatol* 1985; 84:378-383.
- 5.- Crouch ED, Sage H, Bornstein P. Structural basis for apparent heterogeneity of collagens in human basement membranes: type IV procollagen contains two distinct chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:745-749.
- 6.- Grinnell F. Fibronectin and wound healing. *J Cell Biochem* 1984; 26:107-116, 1984.
- 7.- Nagata H, Ueki H, Moriguchi T. Fibronectin. *Arch Dermatol* 1985; 121:995-999.
- 8.- Liotta LA. Tumor invasion and metastases - role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 1986; 46:1-7.
- 9.- Baird A, Böhlen, P. Fibroblast growth factors. In: *Peptide growth factors and their receptors I*. (Eds. MB Sporn, AB Roberts), Springer-Verlag, 1990:369-418.
- 10.- Ries C, Petrides, PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1995; 375:345-355.
- 11.- Woessner JF. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 732:11-21.
- 12.- Sudhoff H, Bujia J, Holly A, Kim C, Fisseler-Eckhoff A. Functional characterization of middle ear mucosa residues in cholesteatoma samples. *Am J Otol* 1994; 15: 217 - 221.
- 13.- Sudhoff H, Bujia J, Fisseler-Eckhoff A, Schulz-Flake C, Kastenbauer E, Hildmann H. Expression of the cell-cycle-related antigen (MIB 1) in cholesteatoma and auditory meatal skin. *Laryngoscope* 1995; 105:1227-1231.
- 14.- Bernal M, Ebmeyer J, Buchbinder A, Sudhoff H. Análisis comparativo de la capacidad proliferativa del colesteatoma. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2000; 51:299-307.
- 15.- Hsu SM, Rainc L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29:577-80.
- 16.- Palva T. The pathogenesis and treatment of cholesteatoma. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1990; 109:323-330.
- 17.- Donaldson DJ, Mahan JT. Keratinocyte migration and extracellular matrix. *J Invest Dermatol* 1988; 90:623-628.
- 18.- Stenn KS, Malhorta R. Epithelialization. In: *Wound healing - biochemical & clinical aspects*. Cohen I, Diegelmann RF, Lindblad WJ. (Eds.), WB Saunders, Philadelphia, 115-27, 1992.
- 19.- Sudhoff H, Bujia J, Fisseler-Eckhoff A, Borkowski G, Holly A, Koc C, Hildmann H. Basement membrane in middle ear cholesteatoma. Immunohistochemical and ultrastructural observations. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996; 105:804-10.
- 20.- Ergün S, Zheng X, Carlsöö B. Antigen expression of epithelial markers, collagen IV and Ki67 in middle ear cholesteatoma. *Acta Otolaryngol* 1994; 114:295-302.
- 21.- Igisu K. The role of fibronectin in the process of wound healing. *Throm Res* 1986; 44:455-465.
- 22.- Milewski C, Fedorowski A, Stan AC, Walter GF. Basic fibroblast growth factor – b-FGF- in the perimatrix of cholesteatoma. *HNO* 1998; 46:804-808.
- 23.- Koutnouyan HA, Baird A, Ryan A. Acid and basic FGF mRNA expression in the middle ear mucosa during acute and chronic otitis media. *Laryngoscope* 1994; 104:350-358.
- 24.- Abramson M, Huang CC. Localization of collagenase in human middle ear cholesteatoma. *Laryngoscope* 1977; 87:771-779.
- 25.- Banerjee AR, James R, Narula AA. Matrix metalloproteinase-9 in cholesteatoma and deep meatal skin. *Clin Otolaryngol* 1998; 23:345-347.
- 26.- Banerjee AR, James R, Narula AA, Lee RJ. Matriz metalloproteinase-1 in cholesteatoma, middle ear granulations and deep meatal skin: a comparative analysis. *Clin Otolaryngol* 1998; 23:515-519.
- 27.- Chole RA, Tinling SP. Basal lamina breaks in the histogenesis of cholesteatoma. *Laryngoscope* 1985; 95:270-275